



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0104101
(43) 공개일자 2016년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7023212(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년05월22일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2010-7028713
원출원일자(국제) 2009년05월22일
심사청구일자 2014년05월19일
(85) 번역문제출일자 2016년08월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/003174
(87) 국제공개번호 WO 2009/142759
국제공개일자 2009년11월26일
(30) 우선권주장
61/128,709 2008년05월23일 미국(US)

(71) 출원인
아고스 세라퓨티스, 인코포레이티드
미국 노쓰 캐롤라이나 27704 더럼 테크놀로지 드
라이브 4233
(72) 발명자
브랜드, 스테펜
미국 27516 노쓰캐롤라이나주 채플 힐 볼더 블러
프 213
초우, 치-시옹
캐나다 엔2엘 5비6 온타리오주 워털루 크레이그레
이쓰 드라이브 334
무-영, 머레이
캐나다 엔2제이 4엔4 온타리오주 워털루 블루 스
프링즈 드라이브 14-52
(74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 신규 가용성 CD83 폴리펩티드, 제형 및 사용 방법

(57) 요 약

원치 않는 면역 응답을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 이러한 조성물은 신규 가용성 CD83 (sCD83) 폴리펩티드 및 이같은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 개선된 (sCD83) 제형, 및 이같은 폴리펩티드 및 제형의 알러지, 자가면역 질환 및 이식 거부의 치료 또는 예방에서의 용도에 관한 것이다. 서열 7 또는 서열 7에 대한 동일성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하고, 이때 서열 7의 아미노산 잔기 12, 20, 85 및 92 중 하나 이상이 시스테인 이외의 아미노산이며, 임의로 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4 및 130 중 하나 이상이 없는 sCD83 폴리펩티드가 제공된다.

명세서

청구범위

청구항 1

서열 7의 아미노산 서열 또는 서열 7에 대한 동일성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하고, 이때 서열 7의 아미노산 잔기 12, 20, 85 및 92 중 하나 이상이 없거나 또는 시스테인 이외의 아미노산이며, 임의로 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4 및 130 중 하나 이상이 없는, 단리된 sCD83 폴리펩티드를 포유류 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상체에서 원치 않는 면역 응답을 치료 또는 예방하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 분야

본 발명의 분야는 신규 가용성 CD83 (sCD83) 폴리펩티드 및 이같은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 개선된 (sCD83) 제형, 및 이같은 단백질 및 제형의 알러지, 자가면역 질환 및 이식 거부의 치료 또는 예방에서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 발명의 배경

CD83은 면역글로불린 ("Ig") 수퍼페밀리 단백질들로부터의 분자이다 (예를 들어, [Zhou et al. (1999) J. Immunol. 149: 735-742] 참조; 미국 특허 번호 7,169,898를 또한 참조; 리뷰를 위해 [Fujimoto and Tedder (2006) J. Med. Dent. Sci. 53: 86-91] 참조). CD83은 성숙형 수지상 세포에 대한 차별적인 마커로서의 구실을 한다. CD83의 정확한 기능은 여전히 결정되지 않았지만, 가용성 형태의 CD83은 미성숙형 및 성숙형 수지상 세포 양쪽 모두에 결합하는 것으로 보고되었다 ([Lechmann et al. (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821] 참조). 저자들은 이러한 단백질이 시험관 내에서 성숙된 수지상 세포에 의한 CD80 및 CD83의 발현을 감소시켰고, 시험관 내에서 T 세포를 자극하는 수지상 세포의 능력을 억제하였음을 또한 보고하였다 ([Lechmann et al. (2002) Trends in Immunology 23: 273-275]를 또한 참조). 유사하게, [Kruse et al. (2000) J. Exp. Med. 191: 1581-1589]에서, GC7 (N(1)-구아닐-1,7-디아미노헵탄)이 CD83 mRNA의 핵-세포질 전위를 방해하여, CD83의 표면 발현을 방지하고 이러한 DC에 의한 T 림프구의 활성화를 상당히 억제하였음을 보고되었다. 또다른 이들이 생체 내에서의 가용성 형태의 CD83의 존재를 보고하였다 (예를 들어, [Hock et al. (2002) Int. Immunol. 13: 959-967] 참조). HSV-1-감염 DC를 사용한 연구에서 바이러스 감염이 CD83의 분해 및 CD83 mRNA 전달의 억제에 이른다는 것이 실연되었다; HSV-1에 의한 이러한 가능한 탈출 메커니즘은 DC 생물학에 대한 CD83의 중요성을 추가로 지지한다 (예를 들어, [Kruse et al. (2000) J. Virol. 74: 7127-7136] 참조).

성숙형 CD83은 3개의 구조적 도메인을 포함한다: 세포외 Ig-유사 도메인, 막횡단 도메인 및 세포질 도메인. 인간 CD83 세포외 도메인 (hCD83ext, sCD83의 형태)은 2개 이상의 엑손 (예를 들어, [Zhou et al. (1999) J. Immunol. 149: 735-742] 참조; 진뱅크(GenBank) ID #Z11697)에 의해 코딩되고 성숙형 수지상 세포 ("mDC")의 세포 표면 상에서 강하게 발현되는 단일 Ig-유사 (V-유형) 도메인을 포함한다.

미국 특허 번호 7,169,898에는 인간 CD83 (hCD83) cDNA의 핵산 서열 (서열 1)이 개시되어 있다. 전장 hCD83의 상응하는 아미노산 서열이 서열 2에서 제시된다. 서열 2의 아미노산 잔기 1-19는 신호 서열에 상응하고, 이는 성숙형 단백질 (아미노산 잔기 20-205)로부터 절단된다. hCD83 세포외 도메인 (hCD83ext)은 서열 3에 의해 코딩된다. 상응하는 hCD83ext 아미노산 서열이 서열 4에서 제시되고, 서열 2의 아미노산 잔기 20-144에서 또한 제시된다. 막횡단 도메인 및 세포질 도메인은 각각 서열 2의 아미노산 잔기 145-166 및 서열 2의 아미노산 잔기 167-205에 상응한다. 야생형 hCD83ext는 3개의 글리코실화 부위 (즉, 서열 4의 아미노산 잔기 60, 77 및 98) 및 5개의 시스테인 잔기 (즉, 서열 2의 아미노산 잔기 27, 35, 100, 107, 및 129 (서열 4의 아미노산 잔기 8, 16, 81, 88 및 110에 상응))를 함유한다.

hCD83ext는 DC-매개 T 세포 자극을 억제하고 ([Lechmann et al. J. Exp. Med. (2001) 194:1813-1821]), 다발성 경화증에 대한 마우스 모델을 치료하는데 효과적이다 (실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE); [Zinser et al. (2004)

J. Exp. Med. 200: 345-351]). 이러한 연구들에서, 추가적으로 단백질의 아미노 말단에 트롭빈 절단 부위의 4개의 아미노산 부분 (Gly-Ser-Pro-Gly; 서열 41)을 포함하고, 뿐만 아니라 막횡단 도메인의 첫번째 아미노산 (Ile)을 포함하며, 서열 5에 제시된 hCD83 세포외 도메인이 사용되었다.

[0008] PCT 공보 WO2004/046182에서, 서열 6이 생산되도록 서열 5의 다섯번째 시스테인 잔기가 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 가용성 CD83 돌연변이체 (이하 hCD83ext-m5)가 개시되었고, 자가면역 질환, 예를 들면 다발성 경화증의 치료, 및 이식에서의 hCD83ext-m5 및 야생형 hCD83ext의 용도가 제안되었다. [Zinser et al. Immunobiology (2006) 211:449-453]에는, 야생형 hCD83ext가 동종이량체를 형성하고, 이에 의해 세포외 도메인의 처음 4개의 시스테인 (즉, 서열 2의 아미노산 잔기 27, 35, 100 및 107 (서열 5 및 6의 아미노산 잔기 12, 20, 85 및 92에 상응))은 분자내 디설파드 결합의 형성에 수반되고 다섯번째 시스테인 (즉, 서열 1의 아미노산 잔기 129 또는 서열 5 및 6의 아미노산 잔기 114)은 동종이량체의 분자간 가교를 담당한다는 것이 개시되어 있다. [Zinser et al. 상기 문헌]에는 시험관 내에서 테스트되었을 때 2가지 hCD83ext 이소형(isoform), 즉 야생형 이량체 및 hCD83ext-m5 돌연변이체 단량체의 억제 역량이 비슷하다는 것과 2가지 hCD83ext 이소형의 생물학적 (생체내) 반감기가 유사하며 2시간 내지 3시간 사이였다는 것이 추가로 개시되어 있다. 또한, EAE-모델을 사용하여, [Zinser et al. 상기 문헌]에는 가용성 CD83의 단량체성-돌연변이체 이소형 (즉, hCD83ext-m5)이 이량체성-야생형 hCD83ext 이소형과 비교했을 때 생체내 억제 활성이 비슷하다는 것이 개시되어 있다.

[0009] sCD83의 중요한 치료적 용도의 관점에서, 본 출원인들은 원치 않는 면역 응답, 예를 들면 자가면역 질환, 알러지 및 이식 거부의 치료 또는 예방을 위한 개선된 sCD83 폴리펩티드 및 이의 제형에 대한 요구를 인지하였다. 본 발명은 이러한 요구를 다루고, 추가적인 장점을 또한 제공한다.

서열 목록의 간단한 설명

[0011] 서열 1은 신호 서열을 포함하는, 전장 인간 CD83 단백질을 코딩하는 cDNA를 나타낸다.

[0012] 서열 2는 신호 서열을 포함하는, 전장 인간 CD83 단백질의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0013] 서열 3은 인간 CD83 세포외 도메인 (hCD83ext)의 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA를 나타낸다.

[0014] 서열 4는 인간 CD83 세포외 도메인 (hCD83ext)의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0015] 서열 5는 추가로 아미노산 잔기 (Gly-Ser-Pro-Gly; 서열 41)를 아미노 말단에 포함하고, 막횡단 도메인의 첫번째 아미노산 (Ile)을 카르복시 말단에 포함하는, 인간 CD83 세포외 도메인의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0016] 서열 6은 위치 114의 다섯번째 시스테인 잔기가 세린 잔기로 돌연변이된 서열 5의 변이체를 나타낸다.

[0017] 서열 7은 잔기 Xaa가 임의의 아미노산을 나타내는 서열 5의 변이체를 나타낸다.

[0018] 서열 8은 GST-hCD83ext 융합 단백질을 나타낸다. GST와 hCD83ext 도메인은 트롭빈 절단 부위에 의해 분리된다.

[0019] 서열 9는 막횡단 도메인의 첫번째 아미노산 (Ile)을 추가로 포함하는, 야생형 hCD83 세포외 도메인을 나타낸다.

[0020] 서열 10은 서열 9의 m5 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.

[0021] 서열 11은 서열 9의 m5 C2S 돌연변이체를 나타낸다.

[0022] 서열 12는 서열 9의 m2 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.

[0023] 서열 13은 서열 9의 m2 C2S 돌연변이체를 나타낸다.

[0024] 서열 14는 서열 9의 m3 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.

[0025] 서열 15는 서열 9의 m3 C2S 돌연변이체를 나타낸다.

[0026] 서열 16은 서열 9의 m4 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.

[0027] 서열 17은 서열 9의 m4 C2S 돌연변이체를 나타낸다.

[0028] 서열 18은 서열 9의 m2,3 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.

[0029] 서열 19는 서열 9의 m2,3 C2S 돌연변이체를 나타낸다.

[0030] 서열 20은 서열 9의 m3,4 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.

- [0031] 서열 21은 서열 9의 m3,4 C2S 돌연변이체를 나타낸다.
- [0032] 서열 22는 서열 9의 m2,5 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.
- [0033] 서열 23은 서열 9의 m2,5 C2S 돌연변이체를 나타낸다.
- [0034] 서열 24는 서열 9의 m3,5 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.
- [0035] 서열 25는 서열 9의 m3,5 C2S 돌연변이체를 나타낸다.
- [0036] 서열 26은 서열 9의 m4,5 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.
- [0037] 서열 27은 서열 9의 m4,5 C2S 돌연변이체를 나타낸다.
- [0038] 서열 28은 서열 9의 m2,3,5 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.
- [0039] 서열 29는 서열 9의 m2,3,5 C2S 돌연변이체를 나타낸다.
- [0040] 서열 30은 서열 9의 m3,4,5 C2S 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 나타낸다.
- [0041] 서열 31은 서열 9의 m3,4,5 C2S 돌연변이체를 나타낸다.
- [0042] 서열 32는 서열 9의 두번째 시스테인에서의 C2S 돌연변이유발을 위한 프라이머를 나타낸다.
- [0043] 서열 33은 서열 9의 세번째 시스테인에서의 C2S 돌연변이유발을 위한 프라이머를 나타낸다.
- [0044] 서열 34는 서열 9의 네번째 시스테인에서의 C2S 돌연변이유발을 위한 프라이머를 나타낸다.
- [0045] 서열 35는 판 트로글로디테스(Pan troglodytes) (침팬지)로부터의 CD83 단백질을 나타내고, NCBI 기준 서열(Reference Sequence): XP_518248.2에 상응한다.
- [0046] 서열 36은 카니스 루푸스 파밀리아리스(Canis lupus familiaris) (개)로부터의 CD83 단백질을 나타내고, NCBI 기준 서열: XP_852647.1에 상응한다.
- [0047] 서열 37은 보스 타우루스(Bos taurus) (소)로부터의 CD83 단백질을 나타내고, NCBI 기준 서열: NP_001040055.1에 상응한다.
- [0048] 서열 38은 무스 무스쿨루스(Mus musculus) (마우스)로부터의 CD83 단백질을 나타내고, NCBI 기준 서열: NP_033986.1에 상응한다.
- [0049] 서열 39는 라투스 노르베지쿠스(Rattus norvegicus) (노르웨이(Norway) 래트)로부터의 CD83 단백질을 나타내고, NCBI 기준 서열: XP_341510.2에 상응한다.
- [0050] 서열 40은 갈루스 갈루스(Gallus gallus) (적색야계)로부터의 CD83 단백질을 나타내고, NCBI 기준 서열: XP_41829.1에 상응한다.
- [0051] 서열 41은 Gly-Pro-Ser-Gly에 상응한다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도면의 간단한 설명

도 1은 맥시타이어스(maxitiers) 2의 옵션을 사용하여 MUSCLE 버전 3.6에 의해 생성된 단백질 서열 정렬이다 ([Edgar RC (2004) Nucleic Acids Res 32(5): 1792-7] 참조). NP_00424.1 (서열 2)은 인간 CD83 단백질 (서열 2)이다. XP_518248.2는 침팬지 CD83 단백질 (서열 35)이다. XP_852647.1은 개 CD83 단백질 (서열 37)이다. NP_001040055.1은 소 CD83 (서열 37)이다. NP_033986.1은 마우스 CD83 (서열 38)이다. XP_341510.2는 래트 CD83 (서열 39)이다. XP_41829.1은 적색야계 CD83 (서열 40)이다. 밑줄이 그어진 아미노산 잔기는 임의의 아미노산으로 치환될 수 있다. 밑줄이 그어진 볼드체 아미노산은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환에 의해 치환될 수 있다. 밑줄이 그어지지 않은 아미노산 잔기는 바람직하게는 치환되지 않는다.

도 2는 플라스미드 pGEX2ThCD83ext의 개략도이다.

도 3은 80 (레인 2), 40 (레인 3), 20 (레인 4), 10 (레인 5-8) 또는 5 (레인 9-13) U/ml 트롬빈을 사용한 GST-hCD83ext의 온-칼럼(on-column) 트롬빈 절단 후 용출된 분획들의 SDS-PAGE 분해능을 나타낸다. 레인 7 및 8은 10 U/ml 트롬빈 소화 및 글루타티온 용출 후에 수득된 GST 분획을 나타낸다. 레인 11-13은 5 U/ml 트롬빈

소화 및 글루타티온 용출 후에 수득된 GST 분획을 나타낸다. 레인 1: 분자량 마커. 트롬빈 (Sigma) 내에 존재하는 오염 단백질이 점선 박스 내에 제시된다.

도 4a는 음이온 교환 크로마토그래피를 사용한 hCD83ext의 폴리싱(polishing) 단계에 대한 전형적인 2-피크 크로마토그램이 2개의 주요 피크를 함유한다는 것을 나타낸다. 도 4b는 각각의 폴리싱 분획의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 레인 2-5는 제1 피크를 나타내고, 레인 6-9는 제2 피크를 나타낸다. 레인 1은 폴리싱을 위해 음이온 교환 크로마토그래피 칼럼 내로 로딩된 포스트(post)-GST 샘플을 나타낸다. hCD83ext는 제1 피크 내에 위치하는 한편, 기타 오염 단백질들은 제2 피크 내에 위치함을 주지한다. 질산은으로 젤을 염색하였다.

도 5는 환원형 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색을 사용한 다양한 hCD83ext 샘플 로트들의 분석을 나타낸다. 단백질 샘플들을 -20°C 에서 보관하였고, 20 mM 트리스(Tris), 50 mM NaCl, 50% 글리세롤에서 제형하였으며, 레인-3 샘플은 글리세롤이 없었다. 로트들은 여러 상이한 날짜에 제조되었고, 따라서 분석을 수행하기 전에 상이한 길이의 시간 동안 보관되었다 (즉, 레인 2-10에 대해 각각 4개월, 3개월, 3개월, 2개월, 10.5개월, 9.5개월, 6.5개월, 6개월, 6개월). 화살표는 단량체의 위치를 가리킨다. 또한, 가능하게는 다량체성 형태에 상응하는 더 높은 분자량의 종들을 볼 수 있다. 더 낮은 분자량 형태는 분해 생성물에 상응하거나, 또는 가능하게는 통상적이지 않은 분자내 디설파드 결합에 의해 매개된 변형된 단량체에 상응한다.

도 6은 비-환원형 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색을 사용한 다양한 hCD83ext 샘플 로트들의 분석을 나타내고, 단량체 및 이량체의 이동을 강조한다. 단백질 샘플들을 -20°C 에서 보관하였고, 20 mM 트리스, 50 mM NaCl, 50% 글리세롤에서 제형하였으며, 단 레인-3 샘플은 글리세롤이 없었다. 로트들은 여러 상이한 날짜에 제조되었고, 따라서 분석 수행 시 "숙성도(age)"가 상이하였다 (즉, 레인 2-10에 대해 각각 4개월, 3개월, 3개월, 2개월, 10.5개월, 9.5개월, 6.5개월, 6개월, 6개월). 레인 3, 6, 및 7의 화살표는 통상적이지 않은 분자내 디설파드 결합에 의해 매개되었을 몇몇 드문 hCD83ext 종을 강조한다.

도 7은 (A) 환원형 SDS-PAGE, (B) 비-환원형 SDS-PAGE, 및 (C) 웨스턴 블로팅(Western blotting)으로의 hCD83ext 샘플의 분석을 나타낸다. 더 고차원의 다량체성 종 (예컨대 삼량체 및 사량체)을 가시적이게 만들기 위하여 SDS 젤을 질산은으로 염색하였다. 이러한 종들 모두가 웨스턴 블로팅에 의해 hCD83ext와 관련되는 것으로 확인되었다.

도 8은 hCD83m-2,5에 대한 폴리싱 단계로부터의 피크를 나타내는 AEC 크로마토그램이다.

도 9는 정제된 CD83m-2,5 분획의 환원형 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 10은 정제된 CD83m-2,5 분획의 비-환원형 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 11은 원편광 이색성 (CD)을 사용한 CD83m-2,5의 분광 분석을 나타낸다.

도 12는 CD83m-2,5의 분광형광측정 분석을 나타낸다.

도 13은 원편광 이색성을 사용한 CD83m-2의 분광 분석을 나타낸다.

도 14는 hCD83m-3에 대한 폴리싱 단계로부터의 피크들을 나타내는 AEC 크로마토그램이다.

도 15는 정제된 CD83m-3의 SDS-PAGE 분석이 SDS-PAGE (도 15), CD (도 16 및 17), 및 분광형광측정법 (도 18)을 사용하는 구조적 특성화에 적용되었고, 이때 야생형 hCD83ext 및 CD83m-5에 대해 결과가 비슷하였음을 나타낸다.

도 16은 CD를 사용한 20 mM 트리스, 50 mM NaCl (pH 7.5) 내에 제형된 CD83m-3 및 야생형 CD83 (배치(batch) 004-04)의 분광 분석을 나타낸다.

도 17은 CD를 사용한 CD83m-3 (pH 7.0 또는 7.5로 제형됨)의 분광 분석을 나타낸다.

도 18은 pH 7.0 또는 7.5로 제형된 CD83m-3의 분광형광측정 분석을 나타낸다.

도 19는 단량체성 형태의 hCD83ext-m3, hCD83ext-m5 및 단량체성 및 이량체 형태의 야생형 hCD83ext의 비-환원형 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 20은 디설파드 결합 스크램블링(scrambling)을 방지하기 위해 NEM으로 예비처리된 또는 그렇지 않은, 단량체성 형태의 hCD83ext-m3 (m3), hCD83ext-m5 (m5), 및 상이한 날짜에 제조된 단량체성 및 이량체 형태의 야생형 hCD83ext의 3개의 제제 (004-4, 007 및 023)의 비-환원형 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 21은 hCD83ext-m3, hCD83ext-m5 및 야생형 hCD83ext의 3개의 상이한 제제의 크기 배제 크로마토그래피의 결과를 나타낸다. 모든 제제들을 NEM으로 처리하여 디설피드 결합 스크램블링을 방지하였다. 첫번째 (왼쪽) 피크는 이량체를 나타내는 한편, 두번째 (오른쪽) 피크는 단량체를 나타낸다.

도 22는 hCD83ext-m3 (m3), hCD83ext-m5 (m5) 및 야생형 hCD83ext의 3개의 상이한 제제 (wt 004-4, wt 007 및 wt 023)의 환원형 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 23은 돌연변이체 단량체 hCD83ext-m5, 및 hCD83ext 야생형의 2개의 상이한 제제 (004-4 및 023)의 크기 배제 크로마토그래피의 결과를 나타낸다.

도 24는 hCD83ext-m5의 2개의 상이한 제제 (501 및 502) 및 야생형 hCD83ext의 6개의 상이한 제제 (007, 100, 021, 023, 80 및 90)의 비-환원형 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

도 25는 hCD83ext-m5 및 야생형 hCD83ext의 여러 제제들의 비-환원형 웨스턴 블로트 분석을 나타낸다.

도 26은 TNF α 를 생산하는 단핵구의 백분율에 의해 또는 세포 당 평균 TNF α 생산량에 의해 측정된, LPS/IFN γ -자극 영장류 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 야생형 hCD83ext, hCD83ext-m3 및 hCD83ext-m5의 다양한 제형의 능력을 나타낸다.

도 27은 TNF α 를 생산하는 단핵구의 백분율에 의해 또는 세포 당 평균 TNF α 생산량 (MFU)에 의해 측정된, LPS/IFN γ -자극 영장류 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 야생형 hCD83ext, hCD83ext-m3 및 hCD83ext-m5 (모두 pH 7.6에서 제형됨)의 능력을 나타낸다.

도 28은 TNF α 를 생산하는 단핵구의 백분율에 의해 또는 세포 당 평균 TNF α 생산량 (MFU)에 의해 측정된, LPS/IFN γ -자극 영장류 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 야생형 hCD83ext (pH 4.5 또는 5.5에서 제형됨) 및 hCD83ext-m5 (pH 7.6에서 제형됨)의 능력을 나타낸다.

도 29는 TNF α 를 생산하는 단핵구의 백분율에 의해 또는 세포 당 평균 TNF α 생산량 (MFU)에 의해 측정된, LPS/IFN γ -자극 영장류 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 야생형 hCD83ext (pH 4.5 또는 5.5에서 제형됨), 또는 돌연변이체 형태의 hCD83ext-m3 (pH 5.5에서 제형됨) 및 2개의 hCD83ext-m5 제제 (pH 7.6에서 제형됨)의 능력에서의 차이를 나타낸다.

도 30은 TNF α 를 생산하는 단핵구의 백분율에 의해 측정된, LPS/IFN γ -자극 인간 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 야생형 hCD83ext (배치 ARG-021; pH 7.6에서 제형됨) 및 단량체성 돌연변이체 hCD83ext-m3의 4개의 제제 (pH 4.5 또는 5.5에서 제형됨)의 능력에서의 차이를 나타낸다.

도 31-35는 비-환원형 (왼쪽 레인) 및 환원형 (오른쪽 레인) SDS-PAGE에 의해 분석된, 야생형 hCD83ext (로트 021)에 대한 pH 및 온도의 효과를 나타낸다.

도 36은 POD 140의 래트 신장 동종이식편의 병리학적 등급결정을 나타내는 그래프이다. 중앙값 점수: 0 = 정상; 1 = 최소 변화; 2 = 경미한 변화; 3 = 중간 정도의 변화; 4 = 현저한 변화.

도 37은 POD 140의 래트 신장 동종이식편의 면역조직화학 등급결정을 나타내는 그래프이다. 중앙값 점수: 0 = 정상; 1 = 최소 변화; 2 = 경미한 변화; 3 = 중간 정도의 변화; 4 = 현저한 변화.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053]

발명의 개요

[0054]

안정성이 개선된 신규 가용성 CD83 (sCD83) 폴리펩티드가 제공된다. 한 국면에서, 서열 7의 아미노산 서열 또는 서열 7에 대한 동일성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하고, 이때 임의로 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4 및 130 중 하나 이상이 없고, 아미노산 잔기 12, 20, 85, 92 및 114는 표 1의 임의의 한 행에 상술된 아미노산인 단리된 sCD83 폴리펩티드가 제공된다. 바람직하게는, 아미노산 잔기 85는 시스테인 이외의 아미노산이고, 가장 바람직하게는 아미노산 잔기 85는 세린이다.

[0055]

또다른 국면에서, 서열 7 또는 서열 7에 대한 동일성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하고, 이때 서열 7의 아미노산 잔기 12, 20, 85 및 92 중 하나 이상이 없거나 또는 시스테인 이외의 아미노산이며, 임의로 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4 및 130 중 하나 이상이 없는 단리된 sCD83 폴리펩티드.

[0056]

바람직하게는, 이러한 단리된 sCD83 폴리펩티드는 서열 13, 서열 15, 서열 17, 서열 19, 서열 21, 서열 23, 서

열 25, 서열 27, 서열 29 및 서열 31로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때 임의로 아미노산 잔기 126이 없다.

[0057] 또다른 국면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 핵산, 뿐만 아니라 이같은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 세포가 제공된다. 이러한 벡터 및 세포는 본원에 개시된 sCD83 조성물을 생산하는데 유용하다.

[0058] 본원에서 제공되는 sCD83 폴리펩티드는 대상체에서의 원치 않는 면역 응답, 예를 들면 자가면역 질환, 이식 거부 및 알러지의 치료 또는 예방에 유용하다. 따라서, 신규 sCD83 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물, 뿐만 아니라 자가면역 질환, 이식 거부 및 알러지의 치료를 위해 신규 sCD83 폴리펩티드 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

[0059] 또다른 국면에서, 포유류 이식 수용자에게 치료 유효량의 앞서 언급된 sCD83 폴리펩티드 및 하나 이상의 면역억제제를 투여하는 단계를 포함하고, 이때 면역억제제가 상기 폴리펩티드와 상승적으로 작용하여 이식 결과를 개선하는, 포유류 이식 수용자에서의 이식 결과를 개선하는 방법이 제공된다.

상세한 설명

[0061] 본 발명가들은 가용성 CD83 (sCD83), 특히 서열 5 및 6에 상응하는 hCD83ext 폴리펩티드가 보관 동안 안정성을 잃는다는 것을 발견하였다. 놀랍게도, hCD83ext의 세번째 시스테인 잔기의 돌연변이가 개선된 안정성 및 필적하는 생활성(bioactivity)을 초래한다는 것이 발견되었다. 이러한 결과는 예상외였는데, 상기 논의된 바와 같이, [Zinser et al. Immunobiology (2006) 211:449-453]에서 hCD83ext가 동종이량체를 형성하고 이에 의해 hCD83ext의 처음 4개의 시스테인이 분자내 디설피드 결합의 형성에 수반되는 것으로 개시되었기 때문이다. 따라서, [Zinser, 상기 문헌]을 고려하여, hCD83ext의 처음 4개의 시스테인 각각이 세포외 도메인의 정확한 형상을 유지하는데 결정적일 것으로 예상할 것이다. 예상외로, 이러한 시스테인 잔기들에 대한 돌연변이가 안정성을 개선시킬 수 있다. 또한, 낮은 pH, 바람직하게는 pH 4.0 내지 5.0, 가장 바람직하게는 약 4.5의 pH에서 완충되는 경우 안정성이 추가로 강화되는 것으로 발견되었다. 야생형 sCD83 단백질은 온도, pH, 텔아미드화 및 가수분해에 영향을 미치는 조건들에 대해 감수성이고 불안정한 것으로 보인다.

[0062] hCD83ext 내의 5개의 시스테인 잔기 중 하나 이상에 대한 아미노산 치환이 있는 본 발명의 신규 sCD83 폴리펩티드들 중 일부가 표 1에서 제시된다. 용어 "Cys 아님"은 시스테인 이외의 임의의 표준 또는 비-표준 아미노산을 지칭한다. 바람직하게는, 시스테인 잔기에 대한 치환은 전하를 띠지 않는 극성 R 기가 있는 아미노산 (예를 들어, 세린, 트레오닌, 메티오닌, 아스파라긴, 글루타민, 및 비-표준 아미노산 셀레노시스테인)이 시스테인을 교체하는 보존적 치환이다. 별법적으로, 시스테인 잔기가 교체되지 않고 결실될 수 있다. 표 1은 시스테인 잔기의 치환 또는 결실에 대한 가능한 부위들인 서열 7 내의 5개의 아미노산 위치를 나타낸다. 서열 7은 서열 5 내의 5개의 시스테인 잔기 (즉, 잔기 12, 20, 85, 92 및 114) 중 하나 이상이 결실되거나 별법적인 아미노산으로 치환될 수 있는 서열 5의 변이체이다.

표 1

서열 7의 CD83ext변이체의 비제한적인 예

돌연변이체 hCD83ext의 명칭	아미노산 잔기 #12	아미노산 잔기 #20	아미노산 잔기 #85	아미노산 잔기 #92	아미노산 잔기 #114
m1	Cys 아님	Cys	Cys	Cys	Cys
m2	Cys	Cys 아님	Cys	Cys	Cys
m3	Cys	Cys	Cys 아님	Cys	Cys
m4	Cys	Cys	Cys	Cys 아님	Cys
m1,2	Cys 아님	Cys 아님	Cys	Cys	Cys
m1,3	Cys 아님	Cys	Cys 아님	Cys	Cys
m1,4	Cys 아님	Cys	Cys	Cys 아님	Cys
m1,5	Cys 아님	Cys	Cys	Cys	Cys 아님
m2,3	Cys	Cys 아님	Cys 아님	Cys	Cys
m2,4	Cys	Cys 아님	Cys	Cys 아님	Cys
m2,5	Cys	Cys 아님	Cys	Cys	Cys 아님
m3,4	Cys	Cys	Cys 아님	Cys 아님	Cys
m3,5	Cys	Cys	Cys 아님	Cys	Cys 아님
m4,5	Cys	Cys	Cys	Cys 아님	Cys 아님
m1,2,3	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님	Cys	Cys
m1,2,4	Cys 아님	Cys 아님	Cys	Cys 아님	Cys
m1,2,5	Cys 아님	Cys 아님	Cys	Cys	Cys 아님
m1,3,4	Cys 아님	Cys	Cys 아님	Cys 아님	Cys
m1,3,5	Cys 아님	Cys	Cys 아님	Cys	Cys 아님
m1,4,5	Cys 아님	Cys	Cys	Cys 아님	Cys 아님
m2,3,4	Cys	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님	Cys
m2,3,5	Cys	Cys 아님	Cys 아님	Cys	Cys 아님
m3,4,5	Cys	Cys	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님
m1,2,3,4	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님	Cys
m1,2,3,5	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님	Cys	Cys 아님
m1,2,4,5	Cys 아님	Cys 아님	Cys	Cys 아님	Cys 아님
m1,3,4,5	Cys 아님	Cys	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님
m2,3,4,5	Cys	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님	Cys 아님
m1,2,3,4,5	Cys 아님				

*Cys 아님 = 시스테인 이외의 임의의 아미노산.

** 아미노산 잔기 12, 20, 85, 92 및 114는 서열 7에 의해 표시되는 hCD83 세포의 도메인의 첫번째, 두번째, 세번째, 네번째 및 다섯번째 시스테인 잔기의 위치에 상응하고, 이때 이러한 잔기들의 번호매김은 서열 7의 N-말단에서의 Gly-Ser-Pro-Gly (서열 41) 잔기의 부가로 인해 서열 4와 비교하여 +4만큼 이동된다.

[0063]

[0064] 표 2는 서열 2 및 4 내지 8 내의 5개의 시스테인 잔기 (또는 다른 아미노산 잔기가 시스테인 잔기를 치환할 수 있는 부위)의 번호매김의 상관관계를 나타낸다. 상이한 N-말단 융합 모이어티(moiety)의 존재 또는 부재로 인해 번호매김이 변한다. 예를 들어, 서열 2는 전장 hCD83 서열이고, N-말단의 아미노산 19개의 신호 서열, 뿐만 아니라 막횡단 및 세포질 도메인을 함유하고, 이들은 서열 4-8에는 없다. hCD83 세포의 도메인의 첫번째 아미노산 잔기 (Thr)은 서열 2의 아미노산 잔기 20이다. 서열 4는 hCD83 단백질의 아미노산 125개의 세포의 도메인이고, 서열 2의 아미노산 잔기 20-144에 상응한다. 서열 5-7은 hCD83ext 도메인 (아미노산 잔기 5-129)에 융합된 아미노산 4개의 N-말단 서열 (Gly-Ser-Pro-Gly; 서열 41)을 포함하고, 상기 hCD83ext 도메인에 막횡단 도메인의 첫번째 아미노산 잔기 (아미노산 잔기 130의 Ile)가 이어진다. 서열 8은 hCD83ext 도메인 (아미노산 잔기 14-138에서 시작됨)에 융합된 N-말단 GST-태그(tag) 및 트롬빈 절단 부위 (아미노산 잔기 1-13)를 함유하고, 상기 hCD83ext 도메인에 막횡단 도메인의 첫번째 아미노산 잔기 (아미노산 잔기 139의 Ile)가 이어진다.

표 2

다양한 전장 또는 가용성 CD83 서열의 시스테인 또는 Xaa 잔기의 정렬

서열 번호	서열 내의 아미노산 잔기의 개수	hCD83 세포의 도메인의 첫번째 트레오닌 잔기의 위치	hCD83 세포의 도메인의 첫번째 시스테인 또는 Xaa 잔기의 위치	hCD83 세포의 도메인의 두번째 시스테인 또는 Xaa 잔기의 위치	hCD83 세포의 도메인의 세번째 시스테인 또는 Xaa 잔기의 위치	hCD83 세포의 도메인의 네번째 시스테인 또는 Xaa 잔기의 위치	hCD83 세포의 도메인의 다섯번째 시스테인 또는 Xaa 잔기의 위치
2	205 (전장 hCD83)	20	27	35	100	107	129
4	125	1	8	16	81	88	110
5	130	5	12	20	85	92	114
6	130	5	12	20	85	92	114
7	130	5	12	20	85	92	114
8	139	14	21	29	94	101	123

[0065]

도 1은 인간 (NP_004224.1; 서열 2), 침팬지 (XP_518248.2; 서열 35), 개 (XP_852647.1; 서열 36), 소 (NP_001040055.1; 서열 37), 마우스 (NP_033986.1; 서열 38), 래트 (XP_341510.2; 서열 39) 및 쥐색야계 (XP_418929.1; 서열 40)로부터의 CD83 폴리펩티드의 정렬을 나타낸다. 도 1에 제시된 인간 CD83 서열과 관련하여, 세포외 도메인은 아미노산 잔기 20-144에 상응한다. 밀줄이 그어진 잔기는 정렬된 포유류 CD83 폴리펩티드들의 세포외 도메인 및 막횡단의 첫번째 아미노산 잔기 내의 비-보존적 및 보존적 아미노산 치환 또는 결실이 발생하는 위치들을 나타낸다. 밀줄이 그어진 볼드체 잔기는 보존적 아미노산 치환 또는 결실이 발생하는 위치를 나타낸다. 마우스 및 인간 CD83 단백질은 서열 동일성이 63%이다. 마우스, 래트 및 비-인간 영장류에서 이식 거부를 억제하는 인간 CD83ext 폴리펩티드들 (예를 들어, 야생형 (wt) 또는 m3)의 능력 (실시예 참조)은 포유류 종들 간의 CD83 구조 및 기능의 보존을 가리킨다.

[0067]

따라서, 한 국면에서, 서열 7의 아미노산 서열 또는 서열 7에 대한 동일성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하고, 이때 아미노산 잔기 12, 20, 85, 92 및 114는 표 1의 임의의 한 행에 상술된 아미노산이고, 임의로 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4 및 130 중 하나 이상이 없는, 단리된 sCD83 폴리펩티드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 단리된 sCD83 폴리펩티드는 앞서 언급된 아미노산 서열로 본질적으로 구성되거나 이러한 서열로 구성된다. 바람직하게는, 아미노산 85는 세린이고, 아미노산 12, 20, 92 및 144는 시스테인이다.

[0068]

또다른 국면에서, 서열 7의 아미노산 서열 또는 서열 7에 대한 동일성이 70% 이상인 아미노산 서열을 포함하고, 이때 아미노산 잔기 12, 20, 85 및 92 중 하나 이상이 없거나 또는 시스테인 이외의 아미노산이며, 임의로 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4 및 130 중 하나 이상이 없는 sCD83 폴리펩티드가 제공된다. 바람직하게는, 아미노산 잔기 85는 시스테인 이외의 아미노산이고, 아미노산 잔기 12, 20, 92 및 114는 시스테인이다. 가장 바람직하게는, 아미노산 잔기 85는 세린이다. 일부 실시양태에서, 단리된 sCD83 폴리펩티드는 앞서 언급된 아미노산 서열로 본질적으로 구성되거나 이러한 서열로 구성된다. 바람직한 실시양태에서, sCD83 폴리펩티드는 서열 7, 서열 7의 아미노산 잔기 1 내지 129, 서열 7의 아미노산 잔기 5 내지 129 또는 서열 7의 아미노산 잔기 5 내지 130으로 구성된다.

[0069]

일부 실시양태에서, 단리된 sCD83 폴리펩티드는 서열 13, 서열 15, 서열 17, 서열 19, 서열 21, 서열 23, 서열 25, 서열 27, 서열 29 및 서열 31로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 이때 임의로 아미노산 잔기 126이 없다.

[0070]

본 발명의 신규 sCD83 폴리펩티드와 서열 7의 서열 동일성은 70% 내지 100%일 수 있다. 바람직하게는, 서열 동일성은 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 적어도 99%일 수 있다. 서열 7 내의 아미노산 잔기는 보존적으로 또는 비-보존적으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 치환은 보존적이다. 서열

7의 아미노산 잔기 12, 20, 85, 92 및 114 중 하나 이상이 시스테인이 아닌 경우, 바람직하게는 이들은 소형 및 /또는 극성 아미노산, 예를 들면 알라닌, 글리신, 발린, 트레오닌, 메티오닌, 리신, 아르기닌, 글루타민, 아스파라긴, 글루타메이트, 아스파르테이트의 군으로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 세린이다.

[0071] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 이종성 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합된 임의의 본원에 기술된 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자를 제공한다. 이같은 키메라 분자의 비-제한적인 예는 N-말단 또는 C-말단에서 추가적인 기능성, 안정성 또는 귀소 성질을 부여하는 아미노산 서열에 융합된 임의의 본원에 기술된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 sCD83 폴리펩티드는, N-말단 또는 C-말단에, 신호 서열 및/또는 단백질 단리에 유용한 하나 이상의 아미노산 서열 (예를 들어, 친화성 태그, 예를 들면 글루타티온-S-트랜스퍼레이스, 폴리-His, FLAG, 셀룰로스 결합 도메인, Fc 도메인, Ig 등), 또는 단백질의 프로세싱 후 잔존할 수 있는 이 같은 서열의 일부분을 포함한다. 정체를 용이하게 하기 위해 부가된 웨프티드는 폴리펩티드의 최종 제조 전에 임의로 제거될 수 있다. 비-제한적인 예로서, sCD83 폴리펩티드는, N 말단에서 시작하여, GST-태그, 트롬빈 절단 부위 및 hCD83ext 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 서열 8 참조). 이러한 GST-태그부착 융합 폴리펩티드는 고정된 글루타티온에의 결합에 의해 단리될 수 있고, 그후 트롬빈으로 절단될 수 있다. 그후, 절단 생성물은 hCD83ext의 N-말단에 융합된 트롬빈 절단 부위의 카르복시 부분 (예를 들어, Gly-Ser-Pro-Gly; 서열 41)을 함유 할 것이다. 다양한 친화성 태그 및 단백질 정제에서의 이의 사용 방법이 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, [Terpe (2003) App1. Microbiol. Biotechnol. 60:523-533] 참조.

[0072] 키메라 sCD83 폴리펩티드의 일부 실시양태에서, sCD83 폴리펩티드는 면역글로불린 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgGA2), 바람직하게는 인간 면역글로불린의 Ig 또는 Fc 도메인에 융합된다. 이같은 융합 단백질의 제조 방법은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 5,428,130 및 EPA 0 464 533 참조). 키메라 sCD83-Fc 또는 sCD83-Ig 융합 단백질은 약동학 성질이 개선될 수 있다 (EPA 0 232 262).

[0073] 본원에서 사용된 용어 "가용성 CD83", "sCD83", 및 "CD83ext"는 CD83 단백질 패밀리의 구성원의 세포외 도메인의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드를 지칭하고, 이때 가용성 CD83 폴리펩티드에는 상기 분자가 발현되는 세포의 막에 이를 고정시킬 수 있는 CD83 막횡단 도메인이 없다. 그러나, 가용성 CD83 폴리펩티드는 세포외 도메인의 바깥쪽에 있는 전장 천연 CD83 단백질의 추가적인 잔기, 예를 들면 가용성 CD83 단백질을 이러한 단백질이 발현되는 세포의 막에 고정시키는데 충분하지 않은 막횡단 도메인의 일부분을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 sCD83 폴리펩티드는 sCD83 활성을 지닌다.

[0074] sCD83 폴리펩티드는 임의의 적절한 분석법에 의해 측정 시 서열 5의 sCD83 폴리펩티드의 1가지 이상의 활성을 나타내는 경우 "sCD83 활성"을 지니는 것으로 언급된다. sCD83 폴리펩티드는 동일한 분석법에서 측정 시 서열 5의 sCD83 폴리펩티드의 활성의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상을 지니는 경우 "sCD83 활성"을 지니는 것으로 언급된다. 바람직하게는, 본 발명의 sCD83 폴리펩티드는 성숙형 면역자극 수지상 세포에 결합할 수 있고, T-세포 증식을 자극하는 이러한 수지상 세포의 능력을 감소시킬 수 있다. sCD83 활성은 직접적으로 또는 간접적으로 평가될 수 있고, 생체 내에서 또는 시험관 내에서 측정될 수 있다; 적절한 분석법들이 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, [Kruse et al. (2000) J. Virol. 74: 7127-7136]; [Lechmann et al. (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821] (T 세포에 대한 수지상 세포의 결합 및 수지상 세포-T 세포 클러스터의 형성을 결정하기 위한 바람직한 분석법이 개시되어 있음) 참조). 거명에 의해 내용이 포함되는 미국 특허 공보 20040110673에는 sCD83 활성, 예를 들면 1) 성숙 칙테일의 존재 하에 미성숙 DC가 성숙형 DC로 성숙하는 것의 억제; 2) sCD83과 함께 배양 시 성숙형 DC에 의한 CD80 및 CD83 발현의 손실; 3) MLR 분석법에서 T 세포 증식을 자극하는 성숙형 DC의 능력의 억제; 4) DC에 의한 전형적인 클러스터 형성 및 T 세포 증식의 억제 및 5) 마우스에서의 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE)의 억제에 대한 분석법들이 개시되어 있다. 본 출원의 실시예 4에는 LPS/IFN γ -자극 PBMC에 의한 TNF- α 의 생산을 감소시키는 sCD83의 능력을 측정하는 sCD83 활성에 대한 분석법이 개시되어 있다.

[0075] 따라서, 본 발명의 sCD83 폴리펩티드는 적합한 대조군, 예를 들어, sCD83의 부재 하에서의 성숙형 면역자극 수지상 세포와 T-세포 간의 상호작용과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 또는 그 이상 만큼 T-세포 증식을 자극하는 성숙형 면역자극 수지상 세포의 능력을 감소시킬 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 본 발명의 sCD83 단백질은 적합한 대조군과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 또는 그 이상 만큼 성숙 프로세스의 1개 이상의 단계 동안 가용성 CD83의 존재 하에 시험관 내에서 성숙된 면역자극 수지상 세포에 의한 TNF- α , CD80 및/또는 CD83의 발현을 감소시킬 수 있다 (예를 들어, [Lechmann et al. (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821]; WO 2004/046182; 실시예 4

참조). 예를 들어, 미성숙 수지상 세포에 sCD83을 첨가하는 것은 CD80 및 CD83 발현이 감소되도록 표면 발현을 변경시킨다. sCD83을 성숙형 수지상 세포에 첨가하는 것은 CD83 발현을 감소시키고, sCD83으로 처리된 DC는 T-세포 증식을 자극하는 능력을 잃는다. 이러한 방식으로, sCD83은 처리된 세포의 면역표현형을 변경시킨 것으로 언급될 수 있다. 세포 표면 마커의 발현의 분석을 위한 통상적으로 사용되는 기술 (예를 들어, FACS 분석)에서 세포들의 혼합 집단을 나타내는 데이터가 때때로 산출되고, 어떠한 집단이 특정 데이터 세트에서 나타날 수 있는지를 확인하기 위해 주의하여야 하는 것으로 당업자에게 이해된다.

[0077] 본 발명에 따르면, sCD83 폴리펩티드의 유도체는 측쇄가 변경된 아미노산이 1개 이상 있을 수 있다. 이같은 유도체화 폴리펩티드에는, 예를 들어, 유리 아미노 기가 아민 히드로클로라이드, p-톨루엔 살포닐 기, 카르보벤즈 옥시 기를 형성하거나, 유리 카르복시 기가 염, 메틸 및 에틸 에스테르를 형성하거나, 유리 하이드록실 기가 O-아실 또는 O-알킬 유도체를 형성한 아미노산, 뿐만 아니라 천연 발생 아미노산 유도체, 예를 들어, 프롤린에 대한 4-하이드록시프롤린, 리신에 대한 5-하이드록시리신, 세린에 대한 호모세린, 리신에 대한 오르니틴 등을 포함하는 것들이 포함된다. 공유 결합, 예를 들어, 고리화 폴리펩티드가 생산되도록 2개의 시스테인 잔기 사이에 형성된 디설피드 연결을 변경시킬 수 있는 아미노산 유도체가 또한 포함된다. 가용성 sCD83 폴리펩티드 또는 이의 유도체는 CD83 문자의 천연 글리코실화 패턴 또는 변경된 글리코실화 패턴을 지닐 수 있거나, 또는 글리코실화되지 않을 수 있다.

[0078] 본 발명의 sCD83 폴리펩티드는 sCD83 폴리펩티드의 단량체, 이량체 또는 다량체일 수 있다. 단량체성 형태의 sCD83 단백질 내에 존재하는 시스테인 잔기들 (예를 들어, 서열 5의 위치 12, 20, 85, 92 및 114에 존재함) 간의 하나 이상의 디설피드 결합의 형성을 통해, 또는 단량체성 형태의 sCD83 폴리펩티드 내의 동일하거나 상이한 기능성 모이어티들 (예를 들어, 카르복시 기, 아미노 기, 하이드록시 기, 티오 기 등)을 연결하는 2관능성 링커 (linker) 문자 (예를 들어, 디아민, 디카르복실산 화합물 등)에 의해 이량체화 또는 다량체화가 달성될 수 있다. 후자는 재조합 기술에 의해 직접적으로 생산될 수 있는 이량체성 구조물이 산출되도록 폴리펩티드 링커, 예를 들어, $-[Gly]_x[Ser]_y-$ (식중 x는, 예를 들어, 3 또는 4이고, y는, 예를 들어, 1 내지 5이다)와 같은 소형 극성 아미노산 잔기를 사용하는 것을 또한 포함한다. 바람직한 실시양태에서, sCD83은 단량체이다.

[0079] sCD83 폴리펩티드는, 융합 단백질이 하나 이상의 본원에서 정의된 바와 같은 sCD83 활성을 유지하는 한, CD83 및 유도체의 세포외 도메인의 적어도 일부분의 융합 단백질일 수 있다 (예를 들어, WO 2004/046182 참조). 일부 실시양태에서, 세포외 도메인 바깥쪽의 CD83의 추가적인 잔기를 포함하는 단백질이 용어 "가용성 CD83"에 포함된다. 따라서, 적절한 유도체에는 C- 또는 N-말단에 추가적인 서열이 부착된 단백질, 예를 들어, 막횡단 도메인의 일부분을 C-말단에 보유하거나, 또는, 예를 들어, 조작된 융합 단백질의 생성물로서 트롬빈에 의한 트롬빈 부위의 절단으로부터 초래될 수 있는 짧은 웨프티드 (예를 들어, Gly-Ser-Pro-Gly (서열 41)) 또는 융합 단백질의 절단 후에 GST의 단편으로부터 초래된 짧은 웨프티드를 N-말단에 보유하는 것들, 뿐만 아니라 Ig 및 Fc 융합물이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0080] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 sCD83 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 따라서, 한 실시양태는 서열 7 또는 서열 7에 대한 서열 동일성이 70% 이상인 아미노산을 포함할 수 있거나, 이것으로 구성될 수 있거나, 또는 본질적으로 이것으로 구성될 수 있고, 이때 아미노산 잔기 12, 20, 85 및 92 중 하나 이상이 없거나 또는 시스테인 이외의 아미노산이고, 임의로 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4 및 130 중 하나 이상이 없는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 바람직하게는, 아미노산 잔기 85는 시스테인 이외의 아미노산이고, 아미노산 잔기 12, 20, 92 및 114는 시스테인이다. 가장 바람직하게는, 아미노산 잔기 85는 세린이다. 바람직하게는, 서열 동일성은 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 적어도 99%이다. 유전자 코드를 사용하여, 소정의 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임 (open reading frame)에 상응하는 핵산 모두를 쉽게 구상할 수 있다.

[0081] 또다른 국면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 뿐만 아니라 이같은 벡터를 포함하는 세포가 제공된다. 이러한 벡터 및 세포는 본원에 개시된 CD83ext 조성물을 생산하는데 유용하다.

[0082] CD83 단백질, 핵산 서열, 및 구조가 당업계에 공지되어 있다. 인간 CD83 cDNA의 핵산 서열 (진뱅크 접속 번호 (Accession No.) Z11697)이 서열 1에 기재된다. 이러한 서열은 서열 1의 위치 11에서 628까지의 코딩 서열 (정지 코돈 포함)을 포함한다. 신호 서열은 서열 1의 위치 11 내지 67에 의해 코딩된다. 성숙형 CD83 웨프티드를 코딩하는 서열은 위치 68에서 625까지에 이른다. 제한 효소 인식 부위가 서열 1의 시작부 및 끝부분에 존재한다 (위치 1 내지 6 및 1755 내지 1760). 인간 CD83의 아미노산 서열 (진뱅크 접속 번호 Q01151에 기재되고, 서열 1에 기재된 핵산 서열에 의해 코딩됨)이 서열 2에 기재된다. 또다른 인간 CD83 서열들이 진뱅크 접속 번

호 NP_001035370 [CD83 항원 이소형 b, 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)]: 서열 2]; NP_004224 [CD83 항원 이소형 a, 호모 사피엔스]; EAW55353 [CD83 항원 이소형 CRA_c 호모 사피엔스]; EAW55352 [CD83 항원 이소형 CRA_b 호모 사피엔스]; EAW55351 [CD83 항원 이소형 CRA_a, 호모 사피엔스]로부터 입수가능하다. 이같은 서열들을 정렬하여 보존 도메인을 결정할 수 있다.

[0083] 또다른 생물들로부터의 CD83 서열이 하기의 진뱅크 접속 번호에서 입수가능하다: ABC68619 [살모 살라르(*Salmo salar*)]; CAB63843 및 NP_033986.1 (서열 38 [무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)]; ABM67085 [스파루스 아우라타(*Sparus aurata*)]; AAP93912 [옹코린쿠스 마이키스(*Oncorhynchus mykiss*)]; AA062993 [징글리모스토마 시라툼(*Ginglymostoma cirratum*)]; NP_001040055 [보스 타우루스(*Bos taurus*); 서열 37]; XP_518248 [판 트로글로디테스(*Pan troglodytes*); 서열 35]; XP_001093364 [마카카 물라타(*Macaca mulatta*)]; XP_418929 [갈루스 갈루스(*Gallus gallus*); 서열 40]; NP_001101880 및 XP_341510.2 [라투스 노르베지쿠스(*Rattus norvegicus*); 서열 39]; AAZ06133 [메소크리세투스 아우라투스(*Mesocricetus auratus*)]; ACC60995 [마르모타 모냑스(*Marmota monax*)] 및 XP_852647 [카니스 패밀리아리스(*Canis familiaris*); 서열 36].

[0084] 세포외 부분을 코딩하는 인간 CD83 코딩 영역의 전체 또는 일부분을 예를 들어 포함하는 핵산을 다른 동물, 예를 들면 포유동물로부터의 또는 동일한 생물의 다른 조직으로부터의 다양한 핵산 공급원 (예를 들어, 게놈 DNA, cDNA, 또는 RNA)에 혼성화시킴으로써 CD83 단백질 패밀리의 또다른 구성원이 수득될 수 있다. sCD83 폴리펩티드를 코딩하는 추가적인 폴리뉴클레오티드를 공지 및/또는 단리된 sCD83 폴리뉴클레오티드의 시험관내 또는 생체내 돌연변이에 의해 제조할 수 있거나, 또는 이같은 폴리뉴클레오티드 서열을 시험관 내에서 합성할 수 있다.

[0085] 일단 천연 발생 CD83 단백질을 코딩하는 핵산의 서열이 결정되면, 공지된 CD83 분자의 세포외 도메인을 클로닝된 CD83 서열의 것과 비교함으로써 세포외 도메인을 결정할 수 있다. 그후, 가용성 형태의 소정의 천연 발생 CD83 단백질이 본원에 기술된 바와 같은 기술을 사용하여 재조합적으로 발현될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술되고 당업계에 추가로 공지되어 있는 주지된 기술을 사용하여 본 발명의 가용성 CD83을 코딩하는 핵산이 생산되어, 벡터 내로 삽입되고, 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포 내로 형질전환될 수 있다 ([Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989]).

[0086] 본 발명에 따라 사용하기 위한 CD83 단백질 패밀리의 가용성 형태의 구성원을 코딩하는 핵산을 시험관 내에서의 발현을 위한 발현 벡터 내로 삽입할 수 있거나 (예를 들어, 시험관내 전사/번역 분석법 또는 시판되는 키트를 사용함), 또는 적절한 세포 내로의 발현 벡터의 전달에 의해 원핵생물 또는 진핵생물에서의 전사 및/또는 번역을 용이하게 하는 프로모터 서열을 함유하는 발현 벡터 내로 삽입할 수 있다. 용어 "벡터"는 폴리뉴클레오티드의 삽입 또는 혼입에 의해 조작될 수 있는 당업계에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 비히클(vehicle)을 지칭한다. 이같은 벡터는 유전자 조작에 사용될 수 있거나 (즉, "클로닝 벡터"), 또는 삽입된 폴리뉴클레오티드의 전사 또는 번역에 사용될 수 있다 ("발현 벡터"). 일반적으로 벡터는 적어도 세포 내에서의 증식을 위한 복제 기원 및 프로모터를 함유한다. 발현 벡터 내에 존재하는 제어 요소 (본원에 기재된 바와 같은 발현 제어 요소 포함)는 적합한 전사 및 번역을 용이하게 하도록 포함된다 (예를 들어, 인트론에 대한 스플라이싱(splicing) 신호, mRNA의 인-프레임(in-frame) 번역을 허용하기 위한 유전자의 정확한 리딩 프레임의 유지, 및 정지 코돈 등). 용어 "제어 요소"는, 최소한, 성분의 존재가 발현에 영향을 미칠 수 있는 성분을 하나 이상 포함하도록 의도되고, 추가적인 성분, 예를 들어, 리더(leader) 서열 및 융합 파트너 서열을 또한 포함할 수 있다.

[0087] 벡터가 내부로 전파될 수 있고 벡터의 핵산이 전사되거나 코딩된 폴리펩티드가 발현될 수 있는 세포가 본원에서 "숙주 세포"로 지칭된다. 이 용어는 대상 숙주 세포의 임의의 자손을 또한 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 관심 핵산이 체세포 유전자 요법을 위한 생체내 발현을 위해 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 이러한 벡터들, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 플라스미드 발현 벡터를 사용하여, DC 내로의 벡터 감염/도입 시 본 발명의 핵산이 발현된다.

[0088] 숙주 세포에는 미생물, 예를 들면 박테리아, 효모, 곤충 및 포유류 생물이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 숙주 세포는 대장균이다. 예를 들어, 관심 핵산을 함유하는 재조합 박테리오파지 핵산, 플라스미드 핵산 또는 코스미드 핵산 발현 벡터로 형질전환된 박테리아; 관심 핵산을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 컬리플라워 모자이크 바이러스(CaMV); 담배 모자이크 바이러스 (TMV))로 감염되었거나 또는 관심 핵산을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 관심 핵산을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 배콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 또는 관심 핵산을 함유하는 재조합 바이러스 발

현 벡터 (예를 들어, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 우두 바이러스)로 감염된 동물 세포 시스템, 또는 안정적인 발현을 위해 조작된 형질전환된 동물 세포 시스템.

[0089] 숙주 세포 내에서의 CD83 단백질 패밀리의 가용성 형태의 구성원의 장기 발현을 위해, 안정적인 발현이 바람직하다. 따라서, 예를 들어, 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하여, 적합한 제어 요소 (예를 들어, 프로모터/인핸서 서열, 전사 종결인자, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 제어되는 관심 핵산으로 세포가 형질전환될 수 있다. 임의로, 발현 벡터는 선별성 압박에 대한 저항성을 부여함으로서 벡터가 있는 세포가 확인, 성장 및 확장되도록 허용하는 선별성 또는 확인성 마커를 코딩하는 핵산을 또한 함유할 수 있다. 별법적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 함유하는 제1 벡터와 함께 숙주 세포 내로 공동-형질감염되는 제2 벡터 상에 선별성 마커가 있을 수 있다.

[0090] 각각 tk, hgprt 또는 aprt 세포에서 사용될 수 있는 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 카이네이스 유전자, 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼레이스 유전자, 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼레이스 유전자를 포함하지만 이에 한정되지는 않는 다수의 선별 시스템이 사용될 수 있다. 추가적으로, 항대사물질 저항성이 메토트렉세이트에 대한 저항성을 부여하는 dhfr; 마이코페놀산에 대한 저항성을 부여하는 gpt 유전자; 아미노글리코시드 G-418에 대한 저항성을 부여하는 네오마이신 유전자; 및 히그로마이신에 대한 저항성을 부여하는 히그로마이신 유전자에 대한 선별의 기초로 사용될 수 있다. 추가적인 선별성 유전자들, 즉 세포가 트립토판 대신 인돌을 활용하도록 하는 trpB; 세포가 히스티딘 대신 히스티놀을 활용하도록 하는 hisD; 및 오르니틴 디카르복실레이스 억제제인 2-(디플루오로메틸)-DL-오르니틴 (DFMO)에 대한 저항성을 부여하는 ODC (오르니틴 디카르복실레이스)가 기술되어 있다.

[0091] 본 발명의 sCD83 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로 원핵생물 및 진핵생물 세포를 형질전환시키는 방법이 당업자에게 공지되어 있다. 형질전환 후, 가용성 형태의 CD83을 통상적인 방법에 따라 단리 및 정제할 수 있다. 다양한 단백질 및 이의 유도체, 뿐만 아니라 이들을 코딩하는 핵산을 생산, 정제 및 조작하는 방법들 또한 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.)] 참조; 미국 특허 번호 7,169,898; 미국 특허 출원 번호 10/382,397; 및 미국 특허 출원 번호 10/535,522를 또한 참조. 예를 들어, 발현 숙주 (예를 들어, 박테리아)로부터 제조된 용해물을 HPLC, 크기 배제 크로마토그래피, 젤 전기영동, 친화성 크로마토그래피, 또는 기타 정제 기술을 사용하여 정제할 수 있다. 펩티드 합성기 (예를 들어, 어플라이드 바이오시스템 인코포레이티드(Applied Biosystems, Inc.) (Foster City, Calif.)의 430A 모델 등)를 사용하여 화학적 합성에 의해 실질적으로 순수한 단백질을 또한 수득할 수 있다.

sCD83 제형

[0093] 다양한 적응증 및 투여 경로 유형에 적절한 의약 형태를 제공하도록 적절한 제약상 허용가능한 보조제 및/또는 담체와 함께 CD83ext 조성물이 가공될 수 있다. 적절한 제약 조성물은 담체, 임의의 적절한 생리 용액 또는 분산제 등, 가용화제, 보조제, 안정화제, 방부제, 지속 방출 제형 등을 포함할 수 있다. 생리 용액은 임의의 허용가능한 용액 또는 분산 매질, 예를 들면 염수 또는 완충 염수를 포함한다. 담체는 항균 및 항진균 작용제, 등장성 및 흡착 지연제 등을 또한 포함할 수 있다. 임의의 통상적인 매질, 담체 또는 작용제가 활성 성분과 비 혼화성이지 않는 한, 이의 사용이 고려된다. 담체는 사이토카인, 예를 들어, 인터루킨-10 (IL-10) 및 TGF- β 를 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 추가적인 화합물을 추가로 포함할 수 있다. 이같은 제형 및 이들의 제조 방법의 예가 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1985) Mack Pub. Co., Easton, PA, U.S.] 참조).

[0094] PCT 공보 WO2004/046182에는 pH 7.6의 포스페이트 완충 염수 (PBS) 내에 제형된 정제된 hCD83ext 야생형 및 hCD83m-5 폴리펩티드 (각각 서열 5 및 6)가 기술되어 있다. 그러나, 본원에 개시된 바와 같이, CD83ext 및 이의 변이체는 더 낮은 pH에서 제형되는 경우에 안정성이 더 크다. 예를 들어, 정제된 hCD83ext 폴리펩티드, 예를 들면 서열 5의 폴리펩티드는 실시예 1에 기술된 방법에 따라 처음 정제되었을 때 주로 단량체성 형태이다. pH 7.3-7.6의 PBS에서의 보관 시, 단백질이 점진적으로 이량체화되고, 생활성을 잃는다. 반면에, 더 낮은 pH에서 저장된 hCD83ext는 동일한 활성 손실에 적용되지 않았다. 놀랍게도, CD83ext-m5 (서열 6)는 야생형 등가물 (서열 5)보다 높은 pH에 대해 덜 감수성이었다.

[0095] 따라서, CD83ext 폴리펩티드 및 pH가 4.0 내지 5.0인 생리학적으로 허용가능한 완충제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 바람직하게는, pH는 4.3 내지 4.7이다. 가장 바람직하게는, pH는 약 4.5이다. 바람직한 실시양태에서, CD83ext 폴리펩티드는 서열 4, 5, 6 또는 7의 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 완충제는 아세테이트 완

충제이고, 가장 바람직하게는 pH 약 4.5의 20 mM 아세테이트 완충제이다.

[0096] 출원인은 트레할로스를 포함하는 조성물에서의 제형에 의해 hCD83ext의 안정성 및 생활성이 개선된다는 것을 또 한 발견하였다. 따라서, 1-15% (w/v) 트레할로스 내에 제형된 sCD83 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 제공된다. 트레할로스는 바람직하게는 약 5 내지 12% w/v, 가장 바람직하게는 약 10% w/v로 존재한다.

[0097] 일부 실시양태에서, 본 발명의 sCD83 조성물은 완충제, 염, 계면활성제, 폴리-알코올, 다가 금속 당, 점도 개질제, 항산화제 및 동결방지제 및 이들의 조합물과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 이같은 부형제들에는 글리신, 히스티딘, Fe(3+), Mg(2+), 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E, EDTA, 및 아르기닌 + 글루탐산의 조합물이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0098] 바람직한 실시양태에서, CD83ext 폴리펩티드는 20 mM 아세테이트 완충제 (pH 4.5), 10% w/v 트레할로스, 0.5% w/v 아스코르브산, 및 임의적인 50 mM 아르기닌 + 50 mM 글루탐산 내에 1.5 내지 2.5 (바람직하게는 2.0) mg/ml로 제형되고, 동결 보관된다 (바람직하게는 약 -20°C). 이같은 제형은 다중 동결-해동 주기 후에 안정적이고, 대상체에게 투여하는 것에 적절하다. 모든 바람직한 부형제들은 불활성 성분들의 FDA 목록 내에 있거나, 또는 허가된 정맥내 약품 내에 존재한다.

[0099] 경피, 피내 (i.c.), 복강내 (i.p.), 피하 (s.c), 근육내 (i.m.), 정맥내 (i.v.), 결절간 (i.n.) 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 투여 경로가 사용될 수 있고, CD83ext 및 이의 유도체의 전달용으로 선택될 수 있다. 바람직하게는, CD83ext는 정맥내 투여된다. 당업자는 상이한 화합물 및/또는 적응증에 대해 상이한 투여 형태가 적절할 것이고, 가장 적합한 투여 방법을 선택할 수 있을 것임을 이해할 것이다. 예를 들어, 건선은 피부에의 투여에 적절한 제형으로 국소적으로 치료될 수 있는 한편, 전신 홍반성 루푸스는 복강내 주사에 적절한 제형을 대상체에게 투여함으로써 치료될 수 있다. 당업계의 기술이 있는 진료의는 화합물의 투여량 및 투여의 조정을 위한 기준 및 방법, 예를 들어, 통상적인 임상 및 실험 테스트 (생화학적 및 면역학적 분석법 포함)로부터의 결과의 평가에 익숙하다. 적합한 경우, 의약의 성분들이 따로따로 투여될 수 있다.

[0100] 치료적 또는 예방적 용도를 위해, 본 발명의 화합물이, 단독으로 또는 또다른 면역 조정 화합물 (예를 들어 내성 유도 항원, 시클로스포린(Cyclosporin) A, FK506 + MMF, 라파마이신 + CD45RB, 코르티코스테로이드 등)과 조합되어, 의학적 적응증에 적합한 방식으로 치료 또는 예방을 위해 대상체, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간 환자에게 투여된다.

[0101] 일부 실시양태에서, 대상체에게 sCD83 단백질을 코딩하는 핵산을 제공함으로써 sCD83이 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 서열 7의 sCD83 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 mRNA로서 sCD83이 대상체에게 투여될 수 있다. 유사하게, 일부 실시양태에서, 숙주 세포 (즉, 세포)를 sCD83 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킴으로써 시험관 내에서 또는 생체 내에서 sCD83이 세포에 제공된다; 그후, 형질전환된 숙주 세포가 sCD83 단백질을 발현할 수 있고, 이에 의해 sCD83 단백질이 자신 (즉, 형질전환된 숙주 세포), 뿐만 아니라 다른 세포에게 제공된다. 이같은 실시양태에서, 적절한 숙주 세포에는 수지상 세포가 포함된다. sCD83이 CD83 단백질을 코딩하는 핵산으로 제공되는 실시양태에서, 용어 "sCD83"은 sCD83 단백질을 코딩하는 핵산을 또한 지칭할 수 있다. CD83 단백질을 코딩하는 한, DNA, RNA, 또는 합성 핵산이 포함되는 임의의 적절한 핵산이 사용될 수 있다. 핵산은 코딩된 단백질 또는 단백질 단편의 발현을 위한 적절한 벡터 내에서 제공될 수 있다. 적절한 벡터 및 이의 생산 방법이 당업계에 주지되어 있다.

0102 sCD83의 치료적 용도

[0103] 본원에 개시된 sCD83 조성물은 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 예방, 치유, 감소 및/또는 완화에 유용하다. 예를 들어, 서열 5의 hCD83ext 폴리펩티드가 다수의 동물 모델에서 평가되었다. 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE) 마우스 모델 (인간 다발성 경화증에 대한 모델)을 사용하여, 치료전(pre-treatment) 및 실제 치료(active-treatment) 환경 양쪽 모두에서 sCD83에 의해 마비가 억제될 수 있었다. 최근의 데이터에서, sCD83이 마우스에서 심장 및 피부 이식편 생존을 연장시킬 수 있고, 치료 용량보다 낮은 용량의 잘 특성화된 면역억제제와 조합되어 사용되는 경우, sCD83이 뮤린(murine) 심장 이식 모델에서 장기(長期) 이식편 생존을 달성할 수 있다는 것이 또한 실연되었다. 실험 데이터는 sCD83이 제1형 마우스 모델에서 당뇨병의 발병을 억제할 수 있다는 것을 또한 가리킨다. 또한, sCD83으로의 치료가 전체적인 면역억제를 초래하지 않는다는 것을 시사하는 결과들이 입수 가능하다. 본원의 실시예들에서, 서열 7의 CD83ext 폴리펩티드 (식중 아미노산 잔기 1, 2, 3, 4 및 130이 존재하고, 아미노산 잔기 85는 Ser이며, 아미노산 잔기 12, 20, 92 및 114는 Cys이다)가 심장 및 신장 이식의 포유류 모델에서 이식편 거부를 예방하는데 효과

적이라는 것이 실연된다.

[0104] 따라서, 일부 실시양태는 본 발명의 sCD83 폴리펩티드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에는 자가면역 질환, 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 및 알러지가 포함된다. 본 발명의 신규 sCD83 폴리펩티드를 사용하여 치료될 수 있는 자가면역 질환에는 전신 홍반성 루푸스, 자가면역 (제I형) 당뇨병, 천포창, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 중증 근무력증, 자가심근염, 다발성 경화증, 류머티스성 관절염, 건선, 자가면역 포도막-망막염, 혈관염, 만성 염증성 장 질환, 예를 들면 크론병 또는 궤양성 대장염, HLA B27-관련 자가면역증, 예를 들면 베크테레프병(Morbus Bechterew), 폐쇄성 폐질환 (COPD), 강직성 척추염 및 AIDS가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0105] 따라서, 본 발명의 가용성 CD83 폴리펩티드 및/또는 이같은 sCD83 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 의약의 생산에 사용될 수 있다. 예를 들어, 이같은 의약이 자가면역 질환, 알러지, 천식, 조직 또는 장기 이식 거부, 또는 치료 조성물에 대한 원치 않는 면역 응답의 예방 또는 치료에 사용될 수 있어, 이러한 원치 않는 면역 응답이 억제된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 원치 않는 면역 응답이 치료 조성물에 대해 지시되고, 본 발명의 목적은 대상체를 이같은 치료 조성물에 대해 내성화시키는 것이다. 이러한 목적을 중 하나 이상이 달성되면 대상체가 내성화되고/되었거나 면역억제된 것으로 간주된다 (즉, 면역 내성이 유도 또는 취득된 것으로 간주된다).

[0107] 본원에서 사용된, "면역억제"를 유도하는 것 또는 대상체를 "내성화"시키는 것은 수지상 세포, B 세포, 또는 T 세포를 수반하는 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상이 치료되지 않은 대조군 또는 기타 적합한 대조군과 비교하여 (예를 들어, 치료가 면역 응답의 발달을 예방하거나 또는 면역 응답의 중증도를 감소시키도록 의도되는 경우, 치료 전의 증상 또는 치료 부재 시의 예상되는 증상 중증도와 비교하여) 예방, 치유, 감소 또는 완화되는 것을 의미한다. 당업자는 증상의 측정 및 평가 방법의 선택 및 응용, 뿐만 아니라 적합한 대조군의 선택에 익숙하다.

[0108] 따라서, 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 장애가 적합한 대조군과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100%만큼 감소 또는 완화된 경우에 대상체가 내성화된 것으로 간주되고/되었거나 면역억제가 발생한 것으로 간주된다. 치료가 자가면역 장애가 발달되는 것에 대해 대상체의 위험을 감소시키도록 의도되는 실시양태에서, 이러한 위험이 적합한 대조군과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100%만큼 감소 또는 완화된다; 이러한 평가는 대상체들의 집단 상에서 통계적으로 수행될 수 있다. 치료가 치료 조성물에 대해 대상체를 내성화시키도록 의도되는 실시양태에서, 면역 응답의 원치 않는 기능이 적합한 대조군과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100%만큼 감소된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 목적은 내성생성(tolerogenic) 수지상 세포의 생산을 포함한다; 이러한 실시양태에서, "증상"은 생체 내 또는 시험관 내에서의 세포 거동의 파라미터를 지칭한다.

[0109] 본 발명의 방법은 치료 목적에 유용하고, 따라서 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 예방, 치유 또는 완화하도록 의도된다. 적합한 대조군과 비교하여, 예를 들면 치료 전의 증상과 비교하여 또는 예상되는 증상 중증도와 비교하여 (치료가 예방적이도록 의도되는 경우), 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% 또는 이를 초과하는 만큼 증상이 적합하게 저하, 증가 또는 개선된 경우에 질환 또는 장애의 증상이 감소 또는 완화된 것으로 간주된다. 당업자는 증상에서의 변화를 평가하기 위한 기술 및 기준에 익숙하다. 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 증상들은 당업자에게 공지되어 있고, 여기에는 하기의 것들이 포함된다: 이식된 조직의 비정상적인 조직학; 이식된 조직의 비정상적인 기능; 진단 또는 이식과 같은 이벤트 후의 짧은 길이의 생존 기간; 비정상적으로 또는 바람직하지 않게 높거나 낮은 수준 또는 개수의 혈액 내의 지표 단백질(들) 또는 기타 화합물(들), 예를 들면 원치 않는 항체 또는 원치 않는 세포 (예를 들어, 항원-특이적 수지상 세포 또는 T 세포); 비정상적으로 또는 바람직하지 않게 높거나 낮은 수준 또는 개수의 혈액 또는 신체 내 다른 곳 내의 지표 세포, 예를 들어, 원치 않는 면역 응답이 개시 또는 유지되도록 하는 바람직하지 않게 낮은 수준 또는 개수의 조절 T 세포.

[0110] 적합하게는, 시험관내 분석법을 사용하여, 예를 들어, 대상체로부터 단리된 세포를 사용하는 혼합 림프구 반응에서, 생체내 내성화 또는 내성 및/또는 면역억제를 측정할 수 있다. 유사하게, 다양한 유형의 세포, 예를 들어, 수지상 세포, T 세포, 또는 B 세포를 사용하는 생체외 분석법에서, 생체 외에서 세포에서 달성된 내성화 또는 내성 및/또는 면역억제를 또한 측정할 수 있다. 내성화 또는 내성 및/또는 면역억제가 생체외 방법을 사용

하여 측정되는 경우, 면역 자극에 대한 세포의 응답이 적합한 대조군과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% 또는 이를 초과하는 만큼 감소되면 내성화 또는 내성이 발생한 것으로 간주된다. 적절한 분석법들이 면역 응답을 직접적으로 또는 간접적으로 측정하고, 당업계에 공지되어 있다; 여기에는 혼합 림프구 반응 분석법; 세포독성 분석법; 항체 역가 분석법; IL-10 생산에 대한 분석법; TGF- β 생산에 대한 분석법; 세포 표면 마커의 평가; 및 Foxp3의 발현에 대한 분석법이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0111] 본 발명의 sCD83 단백질은 또 다른 면역억제 화합물과 공동-투여될 수 있다. 용어 "면역억제 화합물"은 림프구의 T 및/또는 B кл론의 집단의 크기를 격감시킬 수 있거나 또는 이의 반응성, 확장 또는 분화를 억제할 수 있는 화합물을 지칭한다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 면역억제 화합물에는 하기의 것들이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다: 시클로스포린 ("CsA"로 또한 알려져 있고, Neoral® 또는 Sandimmune®로 판매됨) 및 타크롤리무스 ("FK.506"로 또한 알려져 있고, Prograf®로 판매됨)이 포함되는 칼시뉴린 억제제; 퓨린 대사 억제제, 예를 들면 마이코페놀레이트 모페틸 ("MMF"로 또한 알려져 있고, Cellcept®로 판매됨) 및 아자티오프린 (Azasan® 또는 Imuran®로 판매됨); 중식 억제제, 예를 들면 에베리리무스 (Certican®로 판매됨) 및 시클리무스 ("라파마이신" 또는 "Rapa"로 또한 알려져 있고, Rapamune®로 판매됨); 모노클로날 항체 ("mAb"), 예를 들면 항-CD45 및 항-CD45RB (예를 들어, 미국 특허 번호 7,160,987 참조); T-세포에 대해 지시된 모노클로날 항체, 예를 들면 OKT3; IL-2 수용체에 대해 지시된 모노클로날 항체 (인간화 항-TaT 항체 포함), 예를 들면 바실릭사맙 및 다클리주맙; T-세포 공동-자극 경로를 차단하는 물질, 예를 들면 CTLA-4-Ig1 융합 단백질; 키메라 혼성 (즉, 이식 조직이 자가물로 인식되는, 제공자 및 수용자 면역 세포의 공존)을 유도할 수 있는 물질; 및 비-골수체거성(non-myeloblastic) 이식전 치료, 예를 들면 시클로포스파미드 (Cytoxan®로 판매됨). 면역억제제 및 이들의 표적의 논의에 대해, 예를 들어, [Stepkowsky (2000) Expert Rev. Mol. Med. June 21, 2000: 1-23]을 참조한다

[0112] 물질의 "유효량"은 이러한 양이 본 발명의 방법에 따라 대상체에게 투여되는 경우 하나 이상의 본 발명의 목적을 달성하는데 적어도 충분하다는 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 치료적 sCD83 조성물의 "유효량"은 치료 조성물이 대상체에게 CD83과 함께 공동 투여될 때 대상체를 내성화시키는데 또는 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상에 대한 측정가능한 효과를 일으키는데 적어도 충분하다. 면역억제 sCD83 화합물의 유효량은 개별적인 대상체가 나타내는 증상들과 관련하여 결정될 수 있거나, 또는 임상 연구로부터 결정되거나 모델 시스템에서의 적합한 연구로부터 추정될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 면역억제 sCD83 화합물의 유효량은 본 발명의 방법을 이용하는 임상 연구에서 결정된 투여량 범위를 기초로 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상에 대한 측정가능한 효과를 일으킬 것으로 예상되는 양을 포함한다.

[0113] 1회 이상의 투여, 적용 또는 투여량으로 유효량이 투여될 수 있다. 적절한 투여, 적용 및 투여량은 조성물의 비활성; 조성물의 제형; 치료될 대상체의 체중, 연령, 건강, 질환 및 용태; 및 대상체 내로의 조성물의 투여 경로를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 요인에 따라 변할 것이다. 일부 예에서, 유효량이 되기에 요구되는 sCD83의 최소량이 기준의 가용성 CD83이 환자 내에 존재하는 것으로 인해 감소될 수 있다 (예를 들어, [Hock et al. (2006) (Tissue Antigens 67: 57-60)] 참조); 당업자는 최상의 결과를 수득하기 위해 투여량 및 투여 등을 쉽게 조정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 70, 100, 200, 500, 또는 700 mg/kg, 또는 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 또는 100 g/kg의 하한; 및 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 70, 100, 200, 500, 또는 700 mg/kg, 또는 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 100, 또는 200 g/kg의 상한 범위 내에서 sCD83이 환자에게 투여될 수 있다.

[0114] 대상체가 CD83에 의해 외인성 화합물에 대해 내성화될 수 있기 때문에, 치료 목적을 위해, 적어도 치료 동안 또는 적어도 CD83이 유효한 시기 동안, 화합물에 대한 내성화를 원치 않는 화합물에 환자가 노출되지 않는 것이 중요하다. 따라서, 예를 들어, 대상체가 종양-특이적 항원 및 질환-야기 미생물 (바이러스, 박테리아, 곰팡이 등)에 노출되지 않아야 한다. 일반적으로, 본원에서 사용된 "대상체"는 치료를 필요로 하는 임의의 동물을 의미한다. 따라서, 예를 들어, "대상체"는 인간 환자 또는 비-인간 포유류 환자일 수 있거나, 또는 또 다른 동물 환자일 수 있다. 질환 또는 병태의 예방을 원하는 경우, 규칙적인 간격으로 대상체가 치료될 수 있다 (예를 들어, 대략적으로, 2년, 1년, 6개월, 2 내지 4개월, 또는 1개월 마다). 그러나, 본 발명의 모든 실시양태에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 특정 질환 또는 장애가 있는 것으로 확인된 대상체에게 또는 특정 질환 또는 장애가 발달될 가능성 있는 것으로 확인된 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 대상체의 가족력 검사의 결과, 의학적 테스트, 예를 들면 유전학적 테스트 또는 대상체의 효소 또는 대사산물 수준을 결정하기 위한 테스트의 결과, 또는 또 다른 질환 또는 장애로 진단되는 것의 결과로서, 대상체가 이같은 특정 질환 또는 장애가 발달될 가능성이 있는 것으로 확인될 수 있다. 이러한 방식

으로, 예를 들어, 본 발명의 방법이 자가면역 질환을 치료하는데, 자가면역 질환의 발달을 예방하는데, 또는 자가면역 질환이 발달되는 것에 대한 대상체의 위험을 감소시키는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 특정 질환 또는 병태를 완화하거나 예방하도록 대상체가 더 이상 치료되지 않을 때 치료 과정이 종결된다. 따라서, 본 발명은 면역억제가 달성되도록 유효량의 sCD83이 대상체에게 투여되는, 면역 응답의 기능장애, 원치 않는 면역 응답 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 병태의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 원치 않는 면역 응답은 자가면역 질환, 이식 거부 및 알러지로 구성된 군으로부터 선택된다. 이같은 방법은 시클로스포린 A (CsA); 라파마이신 + 항-CD45RB 모노클로날 항체; 및 타크롤리무스 (FK506) + 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF) 중 하나 이상을 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0115] 바람직한 실시양태에서, 자가면역 질환은 전신 홍반성 루푸스, 제I형 당뇨병, 천포창, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 중증 근무력증, 자가심근염, 다발성 경화증, 류머티스성 관절염, 건선, 자가면역 포도막-망막염, 혈관염, 만성 염증성 장 질환, 크론병 또는 궤양성 대장염, 베크테레프병, 강직성 척추염 및 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0116] 일부 실시양태에서, 포유류 대상체에서 원치 않는 면역 응답을 치료 또는 예방하기 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 신규 sCD83 폴리펩티드의 용도가 제공된다.

[0117] 또 다른 국면에서, 포유류 이식 수용자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 및 하나 이상의 면역억제제를 투여하는 단계를 포함하고, 이때 면역억제제가 상기 폴리펩티드와 상승적으로 작용하여 이식 결과를 개선하는, 포유류 이식 수용자에서의 이식 결과를 개선하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 면역억제제는 시클로스포린 A이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 면역억제제는 라파마이신 + 항-CD45RB 모노클로날 항체; 또는 타크롤리무스 (FK506) + 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF)이다.

[0118] 본 발명의 방법은 면역 응답의 기능장애 또는 원치 않는 기능에 의해 야기되는 질환 또는 장애, 예를 들어, 알러지; 천식; 조직 이식 거부; 만성적으로 투여된 물질에 대한 면역 응답; 자가면역 질환, 예를 들면 중증 근무력증, 다발성 경화증, 혈관염, 만성 염증성 장 질환, 예를 들면 크론병 또는 궤양성 대장염, 강직성 척추염, 전신 홍반성 루푸스, 피부 질환, 예를 들면 건선, 류머티스성 관절염, 및 인슐린-의존적 당뇨병; 및 AIDS에 걸린 또는 걸릴 수 있는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 B-세포 또는 B-세포 기능을 수반하는 질환 또는 장애, 예를 들어: B-세포 과다형성, 예를 들면 백혈병 (다발성 골수종 및 급성 림프모구성 백혈병 포함); AIDS와 관련된 B-세포 과다활성; 독성 쇼크 증후군; 혈청병; 및 치주병으로 고생하는 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, [Mahanonda et al. (2002) J. Periodontal Res. 37: 177-183] 참조). 혈청병은 특정 의약 또는 항혈청에 대한 원치 않는 면역 응답에 의해 야기되는 일군의 증상들이다. 즉, 수동 면역을 유도하기 위한 노력으로 또 다른 동물 또는 인간으로부터의 항혈청이 대상체에게 제공되는 경우에 혈청병이 초래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 치료가 대상체에서 B-세포 고갈, 즉 B-세포의 개수 및/또는 아유형의 감소를 초래하지 않는, B-세포 또는 B-세포 기능이 수반되는 질환 또는 장애의 치료를 제공한다.

[0119] 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 조직 수용자에서 조직 이식 거부의 하나 이상의 증상을 예방, 치유 또는 완화하기 위해 사용된다. 이같은 실시양태에서, 이식 수용자 ("수용자" 또는 대상체)는 sCD83, 및 임의적인, 이식된 조직과 관련된 항원, 예를 들어, 이식된 조직으로부터 제조 또는 추출된 항원 (예를 들어, 이식된 조직의 샘플의 용해 또는 균질화에 의해 제조 또는 추출됨)으로 치료될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 방법에 따른 이식 수용자의 치료는 조직 이식 전의 치료, 이식과 함께의 치료 (즉, 동시), 및/또는 이식 후의 치료를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 거부를 예방하기 위한 이식 대상체의 지속적인 치료가 불필요하게 되도록 조직 이식 거부의 모든 유해 증상을 예방, 치유 또는 완화할 수 있다; 이같은 실시양태에서, 대상체에서 이식된 내성이 유도된 것으로 언급된다.

[0120] 일부 실시양태에서, 이식될 조직의 제공자 ("이식 제공자")가 의도된 수용자에서의 이식을 위해 조직을 제거하기 전에 sCD83으로 치료될 수 있고, 이때 치료 목적은 이식 수용자에서의 내성 및/또는 면역억제를 유도하는 것이다. 일부 실시양태에서, 이식 제공자 및 이식 수용자 양쪽 모두가 본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있다.

[0121] 본원에서 사용된 "조직"은 개별적인 기관 및/또는 분화된 조직 (예를 들어, 간, 신장, 심장, 폐, 피부, 이자선 등), 뿐만 아니라 "액체" 조직 (예를 들어, 혈액, 혈액 성분, 예를 들면 혈장, 세포, 예를 들면 수지상 세포 등)을 포함한다; 용어 "조직"은 개별적인 기관 및 "액체" 조직의 일부 및 하위부분(subpart)을 또한 포함한다.

[0122] 당업자는 수용자 및 제공자 양쪽 모두에 대해 가능한 최상의 결과를 달성하기 위한 이식 수용자 및 제공자의 평가 및 치료 방법에 익숙하다. 따라서, 당업자는 특정 대상체에게 적합하게 CD83, 하나 이상의 또다른 면역억제화합물, 및 임의적인 치료 조성물의 투여량 및 투여를 쉽게 평가 및 조정할 수 있을 것이다. 상기 논의로부터 쉽게 이해될 바와 같이, 본 발명의 방법은 다수의 단계를 포함한다; 이러한 단계들은 하나 이상의 본 발명의 목적이 달성되는 한 임의의 순서로 수행될 수 있다. 방법이 다중 화합물들의 다중 투여를 수반할 수 있기 때문에, 단계들의 약간의 중복이 또한 발생할 수 있다.

[0123] 본 발명에 의해 제공되는 치료 방법은 생체 내에서 대상체에서의 내성 및/또는 면역억제를 유도하기 위해 CD83 및 하나 이상의 또다른 면역억제 화합물을 사용하는 것을 포함한다. 대상체에게 이러한 물질들을 투여하는 수단에는 통상적이고 생리학적으로 허용가능한 경로, 예를 들어, 경구, 폐, 비경구 (예를 들어, 근육내, 관절내, 복강내, 정맥내 (IV) 또는 피하 주사), 흡입 (미세 분말 제형 또는 미세 분무 (에어로졸)을 통한 흡입), 경피, 피내, 비강내, 질, 직장 또는 설하 투여 경로가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0124] 제약 조성물이 특정 종의 동물에게 투여하기 위한 핵산을 포함하는 경우, 본 발명에서 사용하기 위한 핵산은 이러한 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, sCD83을 코딩하는 핵산 (예를 들어, DNA 또는 RNA)을 포함하는 제약 조성물이 인간에게 투여되는 경우, 핵산은 서열 7 또는 서열 7에 대한 아미노산 동일성이 65% 이상인 아미노산 서열의 sCD83을 포함하는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 핵산은 세포막 투과성 및/또는 세포의 핵산 흡수를 증가시키는 작용제와 함께 투여될 수 있다. 이러한 작용제들의 예는 [Antony et al. (1999) Biochemistry 38: 10775-10784]에 예를 들어 기술된 폴리아민; [Escriou et al. (1998) Biochem. Biophys. Acta 1368: 276-288]에 예를 들어 기술된 분지형 폴리아민; [Guy-Caffey et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 31391-31396]에 예를 들어 기술된 폴리아미노리피드; [Feigner et al. (1987) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417]에 기술된 DOTMA 및 [Benimetskaya et al. (1998) Nucl. Acids Res. 26(23): 5310-5317]에 예를 들어 기술된 양이온성 포르파린이다.

정의

[0125] 명세서 및 청구항에서 사용된 단수 형태 ("a", "an" 및 "the")는 문맥적으로 명확하게 달리 지시되지 않는 한 복수에 대한 언급을 포함한다. 예를 들어, 용어 "세포(a cell)"는 다수의 세포 (세포의 혼합물 포함)를 포함한다.

[0126] 본원에서 사용된 용어 "포함하는"은 조성물 및 방법이 언급된 요소들을 포함하지만, 다른 것들을 배제하지 않는다는 것을 의미하도록 의도된다. 조성물 및 방법을 정의하도록 사용되는 경우의 "본질적으로 구성되는"은 조합에 대해 임의의 본질적인 유의성이 있는 다른 성분을 배제하는 것을 의미할 것이다. 따라서, 본원에서 정의된 바와 같은 요소들로 본질적으로 구성되는 조성물은 단리 및 정제 방법으로부터의 미량의 오염물 및 제약상 허용가능한 담체, 예를 들면 포스페이트 완충 염수, 방부제 등을 배제하지 않을 것이다. 소정의 아미노산 서열로 "본질적으로 구성되는" 폴리펩티드 또는 단백질은 소정의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 0-10개의 추가적인 아미노산을 함유하는 것으로 본원에서 정의된다. 바람직하게는, 이는 5개 이하, 바람직하게는 2개 이하, 가장 바람직하게는 1개 이하의 추가적인 아미노산을 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 함유한다. 소정의 핵산 서열로 "본질적으로 구성되는" 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 30개 이하, 바람직하게는 6개 이하, 더욱 바람직하게는 3개 이하, 가장 바람직하게는 1개 이하의 추가적인 뉴클레오티드를 핵산 서열의 5' 또는 3' 말단에 함유하는 것으로 본원에서 정의된다. "구성되는"은 다른 성분들의 미량의 요소 및 본 발명의 조성물의 투여를 위한 실질적인 방법 단계들 이상의 것을 배제하는 것을 의미할 것이다. 각각의 이러한 이행식 용어에 의해 정의되는 실시양태가 있다.

[0127] 용어 "수지상 세포 (DC)"는 각종 림프성 및 비-림프성 조직에서 발견되는 형태학적으로 유사한 세포 유형들의 다양한 집단을 지칭한다 ([Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271-296]). 수지상 세포는 생물 내의 가장 강력하고 선호되는 APC를 구성한다. 단핵구로부터 수지상 세포가 분화될 수 있지만, 이들은 별개의 표현형을 지닌다. 예를 들어, 특정 분화 마커인 CD14 항원이 수지상 세포에서는 발견되지 않지만, 단핵구는 이를 보유한다. 또한, 성숙형 수지상 세포는 포식성이 아닌 반면, 단핵구는 강력하게 포식성인 세포이다. 성숙형 DC는 T 세포 활성화 및 증식에 필요한 모든 신호를 제공할 수 있는 것으로 나타났다.

[0128] "면역 응답"은 외래 물질에 대한 림프구의 항원-특이적 응답을 광범위하게 지칭한다. 면역 응답을 유발할 수 있는 임의의 물질이 "면역원성"인 것으로 언급되고, "면역원"으로 지칭된다. 모든 면역원은 항원이지만, 모든 항원이 면역원성이지는 않다. 본 발명의 면역 응답은 체액성일 수 있거나 (항체 활성을 통한 응답), 또는 세포

에 의해 매개될 수 있다 (T 세포 활성화를 통한 응답).

[0130] 본원에서 사용된 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산이 동일한 아미노산 군 내의 또 다른 아미노산으로 치환되는 것을 지칭한다. 아미노산은 이의 R 기에 따라 하기와 같이 분류될 수 있다: 1) 비-극성, 지방족 R 기; 2) 전하를 띠지 않는 극성 R 기; 3) 방향족 R 기; 4) 양성 전하를 띠는 R 기; 및 5) 음성 전하를 띠는 R 기. 비-극성 지방족 R 기가 있는 아미노산에는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 및 프롤린이 포함된다. 전하를 띠지 않는 극성 R 기가 있는 아미노산에는 세린, 트레오닌, 시스테인, 메티오닌, 아스파라긴 및 글루타민이 포함된다. 방향족 R 기가 있는 아미노산에는 페닐알라닌 및 타이로신이 포함된다. 양성 전하를 띠는 R 기가 있는 아미노산에는 리신, 아르기닌 및 히스티딘이 포함된다. 음성 전하를 띠는 R 기가 있는 아미노산에는 아스파르테이트 및 글루타메이트가 포함된다.

[0131] 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산" 및 "핵산 분자"는 임의 길이의 중합체성 형태의 뉴클레오티드를 지칭하도록 상호교환가능하게 사용된다. 폴리뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 및/또는 이들의 유사체를 함유할 수 있다. 뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 공지된 또는 공지되지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 용어 "폴리뉴클레오티드"에는, 예를 들어, 단일 가닥, 이중 가닥 및 삼중 나선 분자, 유전자 또는 유전자 단편, 엑손, 인트론, mRNA, tRNA, rRNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의 서열의 단리된 DNA, 임의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머가 포함된다. 천연 핵산 분자에 더하여, 본 발명의 핵산 분자는 변형된 핵산 분자를 또한 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 mRNA는 세포 내에서 번역될 수 있는 RNA를 지칭한다.

[0132] 용어 "펩티드"는 2개 이상의 서브유닛(subunit) 아미노산, 아미노산 유사체 또는 웨티도모방체의 화합물을 지칭하도록 가장 넓은 의미로 사용된다. 서브유닛들은 웨티드 결합에 의해 연결될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 서브유닛이 또 다른 결합, 예를 들어, 에스테르, 에테르 등에 의해 연결될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "아미노산"은 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산 (글리신 및 D 및 L 광학 이성질체 양쪽 모두 포함), 아미노산 유사체 및 웨티도모방체를 지칭한다. 3개 이상의 아미노산의 웨티드는 웨티드 사슬이 짧은 경우 통상적으로 올리고펩티드로 칭해진다. 웨티드 사슬이 긴 경우, 웨티드는 통상적으로 폴리펩티드 또는 단백질로 칭해진다.

[0133] "유전자 전달 비히클"은 삽입된 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 운반할 수 있는 임의의 분자로 정의된다. 유전자 전달 비히클의 예는 리포솜, 생체적합성(biocompatible) 중합체 (천연 중합체 및 합성 중합체 포함); 지질단백질; 폴리펩티드; 다당류; 지질다당류; 인공 바이러스 외피; 금속 입자; 및 박테리아 또는 바이러스, 예를 들면 배콜로바이러스, 아데노바이러스 및 레트로바이러스, 박테리오파지, 코스미드, 플라스미드, 진균류 벡터, 및 다양한 진핵생물 및 원핵생물 숙주에서의 발현에 대해 기술되어 있고, 간단한 단백질 발현뿐만 아니라 유전자 요법에 사용될 수 있는, 당업계에서 전형적으로 사용되는 기타 재조합 비히클이다.

[0134] 본원에서 사용된 "유전자 전달", "유전자 전이", "형질감염" 등은, 도입에 사용된 방법과 관계없이, 숙주 세포 내로의 외인성 폴리뉴클레오티드의 도입을 지칭하는 용어이다. 형질감염은 세포 내부로의 임의의 핵산의 전달을 지칭한다. 유전자 전달은 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있거나 또는 숙주 세포 게놈과 독립적으로 복제될 수 있는 핵산의 전달을 지칭한다. 유전자 전달 또는 유전자 전이는 세포 내로의 mRNA의 도입을 지칭하지 않는다. 형질감염 방법에는 다양한 기술, 예를 들면 전기천공, 단백질-기반, 지질-기반 및 양이온성 이온-기반 핵산 전달 복합체, 바이러스 벡터, "유전자 총" 전달 및 당업자에게 공지된 다양한 기타 기술이 포함된다. 도입된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 내에서 안정적으로 유지될 수 있거나, 또는 일시적으로 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, sCD83 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA가 세포 내로 도입되어, 일시적으로 발현된다. 안정적인 유지는 도입된 폴리뉴클레오티드가 숙주 세포와 혼화성인 복제 기원을 함유하거나 또는 숙주 세포의 레플리콘, 예를 들면 염색체외 레플리콘 (예를 들어, 플라스미드) 또는 핵 또는 미토콘드리아 염색체 내로 통합되는 것을 전형적으로 필요로 한다. 당업계에 공지되어 있고 본원에 기술된 바와 같이, 다수의 벡터가 포유류 세포로 유전자를 전이시키는 것을 매개할 수 있다.

[0135] "바이러스 벡터"는 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내에서 숙주 세포 내로 전달될 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합에 의해 생산된 바이러스 또는 바이러스 입자로 정의된다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터 등이 포함된다. 알파바이러스 벡터, 예를 들면 셈리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스-기반 벡터 및 신드비스(Sindbis) 바이러스-기반 벡터가 유전자 요법 및 면역요법에서의 사용을 위해 또한 개발되었다. [Schlesinger and Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439] 및 [Zaks et al. (1999) Nat. Med. 7:823-827] 참조. 유전자 전이가 레트로바이러스 벡터에 의해 매개되는 국면에서, 벡터 구축물은 레트로바이러스 게놈 또는 이의 일부분, 및 치료 유전자

를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 본원에서 사용된 "레트로바이러스 매개 유전자 전이" 또는 "레트로바이러스 형질도입"은 의미가 동일하고, 세포에 진입하여 자신의 계놈을 숙주 세포 계놈 내로 통합시키는 바이러스에 의해 유전자 또는 핵산 서열이 숙주 세포 내로 안정적으로 전이되는 프로세스를 지칭한다. 바이러스는 자신의 정상적인 감염 메커니즘을 통해 숙주 세포에 진입할 수 있거나, 또는 상이한 숙주 세포 표면 수용체 또는 리간드에 결합하여 세포에 진입하도록 변형될 수 있다. 본원에서 사용된 "레트로바이러스 벡터"는 외인성 핵산을 바이러스성 또는 바이러스-유사 진입 메커니즘을 통해 세포 내로 도입할 수 있는 바이러스 입자를 지칭한다.

[0136]

레트로바이러스는 자신의 유전자 정보를 RNA의 형태로 보유한다; 그러나, 일단 세포가 바이러스로 감염되면, 이러한 RNA가 DNA로 역-전사되고, 이로부터 감염된 세포의 계놈 DNA 내로 통합된다. 통합된 DNA 형태는 프로바이러스(provirus)로 칭해진다. 유전자 전이가 DNA 바이러스 벡터, 예를 들면 아데노바이러스 (Ad), 슈도아데노바이러스 또는 아데노-관련 바이러스 (MV)에 의해 매개되는 국면에서, 벡터 구축물은 바이러스 계놈 또는 이의 일부분, 및 트랜스제(transgene)을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 아데노바이러스 (Ad)는 50가지를 초과하는 혈청형이 포함되는, 비교적 잘 특성화된 균질한 바이러스 군이다. (예를 들어, WO 95/27071 참조). Ad는 쉽게 성장하고, 숙주 세포 계놈 내로의 통합을 요구하지 않는다. 재조합 Ad-유래 벡터, 특히 야생형 바이러스의 재조합 및 생성에 대한 가능성을 감소시키는 벡터들이 또한 구축되었다. (WO 95/00655 및 WO 95/11984 참조). 야생형 MV는 숙주 세포의 계놈 내로 통합되는 감염성 및 특이성이 높다. ([Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470] 및 [Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996] 참조).

[0137]

프로모터 및 폴리뉴클레오티드가 내부로 작동적으로 연결될 수 있는 클로닝 부위 양쪽 모두를 함유하는 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 이같은 벡터는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 RNA를 전사시킬 수 있고, 스트라타진 (Stratagene) (La Jolla, CA) 및 프로메가 바이오텍(Promega Biotech) (Madison, WI)과 같은 공급원으로부터 시판된다. 발현 및/또는 시험관내 전사를 최적화하기 위해, 클론의 5' 및/또는 3' 비번역 부분을 삭제하거나, 부가하거나 변경시켜, 여분의 잠재적인 부적합한 별법적인 번역 개시 코돈 또는 전사 또는 번역 수준에서 발현을 방해하거나 감소시킬 수 있는 또다른 서열을 제거하는 것이 필요할 수 있다. 별법적으로, 컨센서스 (consensus) 리보솜 결합 부위를 개시 코돈의 5' 바로 가까이에 삽입하여 발현을 강화할 수 있다.

[0138]

유전자 전달 비히클은 DNA/리포솜 복합체, 및 표적화된 바이러스 단백질-DNA 복합체가 포함되는 여러 비-바이러스 벡터를 또한 포함한다. 표적화 항체 또는 이의 단편을 또한 포함하는 리포솜이 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 세포에의 전달을 강화하기 위해, 본 발명의 핵산 또는 단백질이 세포 표면 항원, 예를 들어, TCR, CD3 또는 CD4에 결합하는 항체 또는 이의 결합 단편에 접합될 수 있다.

[0139]

"혼성화"는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 반응하여 뉴클레오티드 잔기들의 염기들 간의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하는 반응을 지칭한다. 수소 결합은 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍형성, 후그스틴 (Hoogsteen) 결합에 의해, 또는 임의의 또다른 서열-특이적 방식으로 발생할 수 있다. 복합체는 듀플렉스 (duplex) 구조를 형성하는 2개의 가닥, 다중 가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥, 단일 자가-혼성화 가닥, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성화 반응은 더욱 광범위한 공정, 예를 들면 PCR 반응의 개시, 또는 리보자임에 의한 폴리뉴클레오티드의 효소적 절단에서의 단계를 구성할 수 있다.

[0140]

엄격한 혼성화 조건은 하기와 같다: 관심 핵산을 함유하는 필터의 예비혼성화를 $6\times$ SSC, 50 mM 트리스-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% 피콜(Ficoll), 0.02% BSA, 및 500 μ g/ml 변성 연어 정자 DNA로 구성된 완충제 내에서 65°C에서 8시간 내지 하룻밤 동안 수행한다. 필터를 바람직한 혼성화 온도인 65°C에서 48시간 동안 100 μ g/ml 변성 연어 정자 DNA 및 $5-20\times 10^6$ cpm의 32 P-표지 프로브를 함유하는 예비혼성화 혼합물에서 혼성화시킨다. 이어서, $2\times$ SSC, 0.01% 피콜 및 0.01% BSA를 함유하는 용액에서 1시간 동안 37°C에서 필터를 세정한 후, 50°C에서 45분 동안 0.1 \times SSC에서 세정한다. 세정 단계 후, 혼성화된 프로브들을 자가방사선촬영술에 의해 검출할 수 있다. 이같은 방법은 당업계에 주지되어 있고, [Sambrook et al., 1989]; 및 [Ausubel et al., 1989]에 언급되어 있다.

[0141]

폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 영역 (또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역)의 또다른 서열에 대해 특정 백분율 (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 또는 95%)의 "서열 동일성"을 지닌다는 것은, 정렬되었을 때, 2개의 서열의 비교에서 이러한 백분율의 염기들 (또는 아미노산들)이 동일하다는 것을 의미한다. 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 백분율 동일성을 결정하기 위해, 서열들이 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다 (예를 들어, 최적의 정렬을 위해 갭(gap)이 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 양쪽 모두에 도입될

수 이고, 비-상동성 서열이 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 바람직한 실시양태에서, 비교 목적을 위해 정렬되는 기준 서열의 길이는 기준 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 100%이다. 그후, 아미노산 잔기 또는 상응하는 아미노산 위치에서의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 위치가 비교된다. 제1 서열 내의 위치를 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 차지하면, 분자들이 이러한 위치에서 동일하다 (본원에서 사용된 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 등가이다). 2개의 서열 간의 백분율 동일성은 2개의 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 캡의 개수 및 각각의 캡의 길이를 고려하여, 서열들이 공유하는 동일한 위치의 개수의 합수이다.

[0142] 수학적 알고리즘을 사용하여 서열들의 비교 및 2개의 서열 간의 백분율 동일성의 결정을 달성할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 블로섬(Blossom) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 캡 웨이트(weight) 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4 및 길이 웨이트 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (gcb.com에서 입수 가능) 내의 GAP 프로그램으로 혼입된 [Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453]의 알고리즘을 사용하여 2개의 아미노산 서열 간의 백분율 동일성이 결정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 캡 웨이트 40, 50, 60, 70 또는 80 및 길이 웨이트 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (gcb.com에서 입수 가능) 내의 GAP 프로그램을 사용하여 2개의 뉴클레오티드 서열 간의 백분율 동일성이 결정된다. 파라메터들의 특히 바람직한 셋트 (및 달리 상술되지 않는 한 사용되어야 하는 것)는 캡 폐널티 12, 캡 확장 폐널티 4 및 프레임시프트(frameshift) 캡 폐널티 5의 블로섬 62 측정(scoring) 매트릭스이다.

[0143] PAM120 웨이트 잔기 표, 캡 길이 폐널티 12 및 캡 폐널티 4를 사용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)으로 혼입된 [E. Meyers and W. Miller (1989) CABIOS, 4:11-17]의 알고리즘을 사용하여 2개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 간의 백분율 동일성을 결정할 수 있다.

[0144] 본원에 기술된 핵산 및 단백질 서열은, 예를 들어, 또 다른 패밀리 구성원 또는 관련 서열을 확인하기 위해, 공공 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "질의 서열"로 사용될 수 있다. [Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 사용하여 이같은 검색을 수행할 수 있다. NBLAST 프로그램, 점수 = 100, 단어 길이 = 12로 BLAST 뉴클레오티드 검색을 수행하여, 본 발명의 mMafA 핵산 분자에 대해 상동성인 뉴클레오티드 서열을 수득할 수 있다. XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 단어 길이 = 3으로 BLAST 단백질 검색을 수행하여, 본 발명의 mMafA 단백질 분자에 대해 상동성인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 비교 목적을 위해 캡이 있는 정렬을 수득하기 위해, 캡(Gapped) BLAST가 [Altschul et al, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402]에 기술된 바와 같이 활용될 수 있다. BLAST 및 캡 BLAST 프로그램을 활용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 파라메터를 사용할 수 있다. ncbi.nlm.nih.gov 참조.

[0145] 용어 "단리된"은 폴리뉴클레오티드, 웹티드, 폴리펩티드, 단백질, 항체 또는 이의 단편이 천연에서 정상적으로 회합되어 있는 세포성 또는 다른 구성물로부터 분리된 것을 의미한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드와 관련하여, 단리된 폴리뉴클레오티드는 자신이 염색체 내에서 정상적으로 회합되는 5' 및 3' 서열로부터 분리된 폴리뉴클레오티드이다. 당업자에게 명백하듯이, 비-천연 발생 폴리뉴클레오티드, 웹티드, 폴리펩티드, 단백질, 항체 또는 이의 단편(들)은 이를 이의 천연 발생 대응물로부터 구별하기 위해 "단리"를 필요로 하지 않는다. 또한, "농축된", "분리된" 또는 "희석된" 폴리뉴클레오티드, 웹티드, 폴리펩티드, 단백질, 항체 또는 이의 단편(들)은 농도 또는 부피 당 분자 개수가 이의 천연 발생 대응물의 것보다 크게 "농축"되거나 또는 작게 "분리"된다는 점에서 이의 천연 발생 대응물로부터 구별가능하다. 1차 서열 면에서 또는 예를 들어 글리코실화 패턴에 의해 천연 발생 대응물과 상이한 폴리뉴클레오티드, 웹티드, 폴리펩티드, 단백질, 항체 또는 이의 단편(들)은, 이의 1차 서열에 의해 또는 별법적으로 이의 글리코실화 패턴과 같은 또 다른 특징에 의해 이의 천연 발생 대응물로부터 구별가능하기 때문에, 단리된 형태로 존재할 필요가 없다. 본원에 개시된 발명 각각에 대해 명백하게 언급되지는 않았지만, 하기에 개시된, 적합한 조건 하의 조성물 각각에 대한 상기의 실시양태 모두가 본 발명에 의해 제공되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 비-천연 발생 폴리뉴클레오티드는 단리된 천연 발생 폴리뉴클레오티드와 별개의 실시양태로서 제공된다. 박테리아 세포 내에서 생산되는 단백질은 이러한 단백질이 천연에서 생산되는 진핵생물 세포로부터 단리된 천연 발생 단백질과 별개인 실시양태로서 제공된다. 생물 내에서 발견되는 해부학적 부위로부터 제거되는 경우 포유류 세포, 예를 들면 수지상 세포는 단리된 것이다.

[0146] "숙주 세포", "표적 세포" 또는 "수용자 세포"는 벡터 또는 외인성 핵산 분자, 폴리뉴클레오티드 및/또는 단백질의 혼입에 대한 수용자일 수 있거나 수용자였던 임의의 개별적인 세포 또는 세포 배양물을 포함하도록 의도된다. 이는 또한 단일 세포의 자손을 포함하도록 의도되고, 이러한 자손은 천연, 우발적 또는 의도적 돌연변이로

인해 원래의 어버이 세포와 완전히 동일할 필요가 없을 수 있다 (형태학 면에서, 또는 게놈 또는 전체 DNA 상보물 면에서). 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 세포일 수 있고, 박테리아 세포, 효모 세포, 동물 세포, 및 포유류 세포, 예를 들어, 뮤린, 래트, 원숭이 또는 인간을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0147] "대상체"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간이다. 포유동물에는 뮤린, 원숭이, 인간, 농장 동물, 스포츠 동물 및 애완동물이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0148] "조성물"은 활성 작용제와 다른 화합물 또는 조성물 (불활성 (예를 들어, 검출가능한 작용제 또는 표지) 또는 활성), 예를 들면 애주번트의 조합물을 의미하도록 의도된다.

[0149] "제약 조성물"은 활성 작용제와 조성물을 시험관 내, 생체 내 또는 생체 외에서의 진단 또는 치료 용도에 적절하게 만드는 담체 (불활성 또는 활성)의 조합물을 포함하도록 의도된다.

[0150] 본원에서 사용된 용어 "제약상 허용가능한 담체"는 임의의 표준 제약 담체, 예를 들면 포스페이트 완충 염수 용액, 물, 및 에멀션, 예를 들면 유/수 또는 수/유 에멀션, 다양한 유형의 습윤화제, 및 본원에 개시된 기타 제형을 포함한다. 조성물은 안정화제 및 방부제를 또한 포함할 수 있다. 담체, 안정화제 및 애주번트의 예에 대해, [Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 18th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1990))]을 참조한다.

[0151] "유효량"은 이로운 또는 원하는 결과, 예를 들면 억제된 면역 응답, 병태 (질환, 감염 등)의 치료, 예방 또는 완화를 달성하는데 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여, 적용 또는 투여량으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량은 체중, 연령, 건강, 치료될 질환 또는 용태, 및 투여 경로에 따라 변할 것이다.

[0152] 상기 설명에 따라, 하기의 예들은 본 발명의 다양한 국면들을 예증하도록, 그러나 이를 한정하지는 않도록 의도된다. 항상 명확하게 언급되지는 않지만, 본원에 기술된 시약들은 단지 예시적인 것이고 이의 등가물이 당업계에 공지되어 있는 것으로 이해된다.

실시예

일반적인 방법:

[0155] 일반적인 기술에 대해, [Current Protocols in Immunology, eds. Coico et al. (Wiley, Hoboken, NJ)]을 참조한다. sCD83 정제 방법에 대해, [Lechmann et al. (2002) Protein Expr. Purif. 24:445-452]를 참조한다.

실시예 1

대장균에서의 재조합 hCD83ext 생산 및 하류 정제를 위한 생물공정

[0158] 플라스미드 pGEX2ThCD83ext (미국 특허 공개 2007/0167607에 개시되어 있고, **도 2**에 도해됨)가 hCD83ext의 발현에 사용되었다. 이러한 플라스미드에서, GST-hCD83ext 융합 단백질의 발현은 IPTG-유도성 tac 프로모터의 조절 하에 놓인다. 융합 단백질의 서열이 서열 8에서 제시된다. 이러한 서열에서, 아미노산 잔기 1 내지 5는 GST 태그에 상응하고, 아미노산 잔기 6 내지 13은 트롬빈 절단 부위에 상응하고, 아미노산 잔기 14 내지 138은 인간 CD83 세포의 도메인에 상응하며, 아미노산 잔기 139 (이소류신)는 인간 CD83 세포의 도메인의 첫번째 인접 아미노산에 상응한다. GST 태그는 GST 친화성 크로마토그래피를 사용하여 융합 단백질을 포획하는 것을 허용한다. 그후, hCD83ext 모이어티를 방출시키기 위해, 포획된 단백질을 GST와 hCD83ext 융합물의 접합점의 트롬빈 절단 부위 (서열 8의 아미노산 잔기 9와 10 사이)에서 트롬빈으로 절단할 수 있다 (온(on) 또는 오프(off)-칼럼). GST와 hCD83ext 사이의 접합점의 트롬빈 절단 부위의 디자인으로 인해, 최종 hCD83ext 생성물에는 아미노 말단에 4개의 여분의 아미노산 (즉, Gly-Ser-Pro-Gly; 서열 41)이 있다.

[0159] hCD83ext 발현을 위한 최적의 숙주를 선택하기 위해 pGEX2ThCD83ext를 여러 통상적인 대장균 균주들인 DH5 α , JM109, HB101 및 BL21 내로 형질전환시켰다. 대장균 BL21이 다른 발현 숙주들을 능가하였다 (데이터는 제시되지 않음). 외래 유전자 생성물의 감소된 단백질분해를 초래하는 2개의 프로테이스 유전자 (lon 및 ompT)의 불활성화로 인해 BL21 (F- ompT⁻ gal⁻ dcm⁻ lon⁻ hsdS (rb⁻ mb⁻); ATCC 접속 번호 BAA-1025)이 재조합 단백질 생산에 특히 적절하다. 단백질분해의 완화는 대장균이 발현 숙주로서 사용되는 경우에 진핵생물 기원의 재조합 단백질, 예를 들면 hCD83ext에 특히 중요하다.

[0160] 배지 쳐방, 유도 조건 (즉, 유도 시기조정 및 IPTG 농도), 진탕 속도 및 온도가 포함되는 여러 배양 파라메터가 재조합 hCD83ext 수율을 증가시키도록 최적화되었다. 최적화된 절차에서, BL21/pGEX2ThCD83ext의 단리된 콜로니를 100 mL의 LB 배지 + 50 μ g/mL 앰피실린 (Ap) 내로 접종하고, 37°C에서 200 rpm의 회전식 진탕기 상에서 약 12시간 동안 인큐베이션하여, 종자 배양물을 생산하였다. 종자 배양물 (80 mL)을 사용하여, 1-L 작업 부피의

배양 배지 (5 g/L NaCl, 20 g/L 박토(Bacto) 효모 추출물, 20 g/L 박토 트립톤, 5 g/L 글루코스, 및 10 μ l/L 소포제(Antifoam) 289 (Sigma (St. Louis, MO, USA)))를 함유하는 벤치-탑(bench-top) 생물반응기 (Omni-Culture, VirTis (Gardiner, NY, USA))에 접종하였다. 세포 밀도가 OD600 약 2에 도달했을 때, 0.5 mM의 이소프로필 β -D-티오갈락토파라노시드 (IPTG)를 유도를 위해 첨가하였다. 그후, 통기를 위해 2 L/분의 필터-살균 공기를 생물반응기에 퍼징(purging)하였다. pH 전극 (Mettler-Toledo (Switzerland)), pH 제어제 (PC310, Suntex (Taipei, Taiwan)), 및 2개의 연동 펌프 (101 U/R, Watson Marlow (Falmouth, UK))의 조합물을 사용하여 3 N NH4OH 또는 3 N HCl을 첨가함으로써 배양 pH를 7.0±0.1로 조절하였다. 유도 후 약 6시간 동안 28°C 및 650 rpm에서 생물반응기를 작동시켰다.

[0161] 배양 후, 세포를 6000×g, 2°C에서 10분 동안의 원심분리에 의해 수확하고, 펠렛을 추후의 프로세싱을 위해 -80°C에서 저장하였다. 전형적으로, 약 20 g 습식 세포 중량 (wcw)의 세포 펠렛이 1 L 배양에서 수득될 수 있었다. 세포 펠렛을 포스페이트-완충 염수 (pH 7.3)에 0.05 g-wcw/ml로 재현탁시켰다. OD600이 약 20 인 세포 혼탁액 배치 (20 ml)를 정규 팁(tip)이 있는 초음파 프로세서 (Misonix)를 사용하여 4분 동안 간헐적으로 (즉, 0.5 초 온(on)/0.5초 오프(off)) 초음파처리하였다. 그후, 초음파처리된 세포 용해물을 15,000×g 및 2°C에서 15분 동안 원심분리하여 세포 잔해물을 제거하였다. 전체 가용성 단백질을 함유하는 상등액을 단백질 정제를 위한 후속 크로마토그래피 프로세싱 전에 0.45 μ m 필터로 여과하고, GST 분석법, SDS-PAGE, 및 웨스턴 블로팅에 의해 또한 분석하였다.

[0162] 상기 기술된 바와 같은 세포 추출물의 제조 후, 재조합 GST-hCD83ext 융합 단백질을 3가지 주요 단계에 의해 프로세싱 및 정제하였다: 1) GST-친화성 칼럼을 사용한 포획, 2) hCD83 모이어티를 액체 상 내로 방출하기 위한 트롬빈으로의 온-칼럼 절단, 및 3) 트롬빈 및 기타 오염 단백질 (예를 들어, 내독소)를 제거하기 위한 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 폴리싱. (예를 들어, [Bhikhambhai et al. (2005) J. Chromatogr. 1080:83-92]; 및 [Dian et al. (2002) J. Chromatogr. 769:133-144] 참조). 더욱 구체적으로, 포획 단계에서, 상기 제조된 용해물 (즉, PBS 내의 GST-hCD83ext 융합물을 포함하는 전체 가용성 단백질을 함유하는, 초음파처리된 세포로부터의 여과된 상등액)을 GST 친화성 크로마토그래피 칼럼 (GE Healthcare (Baie d'Urfe, Quebec, Canada)) 상에 로딩하였다. 약 200 U GST/ml-칼럼-배지의 로딩된 GST-hCD83ext에 의해 GST-친화성 칼럼이 포획될 것으로 추정되었다. 전형적인 배양 샘플에 대한 특이적 GST-hCD83ext 발현 수준은 2.5 U GST/OD600-유닛이었기 때문에, 칼럼-배지 1 ml 당 80 OD600-유닛 세포로부터 수득된 용해물을 GSTrap 칼럼 내로 로딩하였다.

[0163] 결합된 GST-hCD83ext의 원위치(in-situ) 절단에 대한 최적의 트롬빈 농도 및 절단 시간을 결정하였다. 먼저, GST-hCD83ext로 포획된 20 ml GST-친화성 칼럼 2개에 제조사가 제안한 농도인 80 U 트롬빈/ml-칼럼-수지의 트롬빈 (Sigma)을 수동으로 주입하고, 실온에서 2시간 또는 4시간 동안 인큐베이션한 후, hCD83ext 및 트롬빈을 함유하는 GST 친화성 크로마토그래피 칼럼 내의 별크(bulk) 액체를 1 칼럼 부피의 결합 완충제를 사용하여 배출시켰다. 그후, 용출 완충제 (50 mM 트리스, 10 mM 글루타티온, pH 8.0)으로 GST 모이어티를 소화되지 않은 GST-hCD83ext와 함께 칼럼으로부터 용출시켰다. 2시간 인큐베이션이 절단에 충분하였음이 관찰되었다. 2시간의 인큐베이션 시간을 사용하여, 절단 효율을 테스트하기 위해 다양한 농도의 트롬빈 (즉, 80, 40, 20, 10, 및 5 U 트롬빈/ml 칼럼-배지)을 5개의 포획 GST-친화성 칼럼 내로 주입하였고, 결과가 도 3에서 요약된다. 트롬빈 농도가 10 U 트롬빈/ml-칼럼-배지를 초과하는 경우에 95%를 초과하는 GST-hCD83ext가 절단되었고, 상기 농도가 온-칼럼 절단을 수행하기 위한 최적의 트롬빈 농도로 결정되었다. 이같은 비교적 낮은 트롬빈 농도에서, 완전한 절단을 확실히 하기 위해 인큐베이션 시간을 2.5시간으로 연장하였다. SDS-PAGE 분석에 따르면 이러한 분획 내의 hCD83ext의 순도가 높았지만 (도 3의 레인 2-5), 이러한 포스트-GST 분획 내의 단백질은 불안정하였고, 분해되는 경향이 있었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0164] 폴리싱 단계는 hCD83ext로부터 내독소, 트롬빈 및 기타 오염 단백질을 제거하기 위해 디자인되었다. 강력한 음이온 교환 칼럼 (Q, GE Healthcare)이 장착된 저압 크로마토그래피 시스템 (BioLogic LP, BioRad, (Hercules, CA, USA))이 폴리싱에 사용되었다. 트리스 완충제 (20 mM, pH 7.5) + 50 mM NaCl 및 트리스 완충제 + 1 M NaCl이 각각 로딩 및 용출 완충제로서 사용되었다. 순수한 hCD83ext를 함유하는 분획을 풀링(pooling)하고, 고압 교반 셀 (Amicon, 모델 8010 + YM10 디스크, Millipore Canada (Cambridge, Ontario, Canada))을 사용하는 초여과로 농축하였다. hCD83ext 최종 생성물을 필터-살균한 후 보관하였다. 이러한 최종 생성물 분획을 사용하여, hCD83ext의 흡광 계수가 약 1.16 OD280-ml/mg/cm인 것으로 결정되었다. 접선 유동 여과 (또는 유사한 기술)을 사용하여 단백질을 추가로 농축할 수 있고/있거나 완충제를 저-pH 완충제로 교환할 수 있다. 각각의 분획의 전형적인 크로마토그램 및 단백질 함량 SDS/PAGE 분석을 함유하는 결과가 각각 도 4A 및 4B에서 요약된다. 제시된 바와 같이, 통과물(flow-through)의 풀이 정제된 저-내독소 hCD83ext를 함유하였다.

[0165] 실시예 2

[0166] 야생형 hCD83ext의 구조적 특성화

정제된 야생형 hCD83ext는, 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조되고 50% 글리세롤의 존재 또는 부재 하에 제형되었을 때, 4°C에서 보관되는 경우 분해되었고, 이는 이러한 생체분자의 고유의 불안정한 성질로 때문일 것이다. 따라서, 단백질을 분해를 완전히 방지하는 -20°C에서 보관하였다. 그럼에도 불구하고, 장기 보관 동안 이러한 동결 조건 하에서 이량체화가 여전히 발생할 수 있었다. 상이한 배치들로부터 수득되고, 따라서 숙성도가 상이한 여러 hCD83ext 샘플에 대한 환원형 및 비-환원형 SDS-PAGE를 사용한 분석 결과가 도 5 및 6에서 요약된다. 이러한 샘플들은 환원형 SDS-PAGE에 의해 분석되었을 때 동일한 패턴을 나타냈지만 (도 5), 이들은 비-환원형 SDS-PAGE에 의해 분석되었을 때 이량체 조성 면에서 꽤 상이하였다 (도 6). 일반적으로, 이량체 조성이 샘플 숙성도에 따라 단조롭게 증가하였고, 이는 이러한 보관 조건 하에서의 단량체 → 이량체로의 점진적인 전환을 가리킨다. 다양한 샘플 프렙(prep)으로부터 유래된 2개 이상의 상이한 단량체 형태 (레인 6, 도 6) 및 3개의 상이한 이량체 형태 (레인 3 및 7, 도 6)가 있었음을 주지한다.

[0168] [Lechmann et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) 329:132-139]에서 hCD83ext의 다섯번째 시스테인(hCD83ext 이량체를 형성하기 위한 분자간 디설피드 결합을 매개하는 주요 아미노산 잔기로서 확인되었다. 그러나, 상기의 비교적 산화성인 조건에서 보관되었을 때, 비-환원형 SDS-PAGE 분석 비-환원형 SDS-PAGE 분석은 이량체, 삼량체, 사량체 및 심지어 더 큰 다량체를 형성하는 정제된 hCD83ext의 경향을 드러냈다 (도 7B). 이러한 더 높은 분자량 밴드의 신원을 항-CD83 항체로의 웨스턴 블로팅에 의해 연구하였다. 간략하게, 비-환원형 SDS-PAGE (도 7B)에 의해 분리된 단백질을 표준 프로토콜에 따라 미니 트랜스-블롯® 셀(Mini Trans-Blot® Cell) (Bio-Rad)을 사용하여 SDS-PAGE 후에 PVDF 막으로 전기-블로팅하였다 ([Towbin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:4350-4354]). 전기영동 이동을 100 V의 정전압에서 1시간 동안 수행하였다. [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA, 1989]에 기술된 바와 같이 단백질-항체 혼성화를 수행하였다. 마우스 모노클로날 항-CD83 항체 (CD83-1G11, Cedarlane laboratories limited (Hornby, Ontario, Canada))를 1차 항체로 사용하였다. 2차 항체는 양고추냉이 과산화효소 (Sigma)와 접합된 염소 항-마우스 IgG였다. 3,3'-디아미노벤자린 테트라히드로클로라이드 (DAB)를 기질로서 사용하는 비색측정 방법에 의해 hCD83-관련 폴리펩티드 (예를 들어 GST-hCD83ext 및 hCD83ext)를 검출하였다. 도 7C에 제시된 바와 같이, 이량체, 삼량체, 사량체 및 심지어 더 고급의 다량체에 상응하는 밴드들이 실제로 hCD83ext와 관련되었다. 이러한 데이터는 hCD83ext의 처음 4개의 시스테인 잔기 중 하나 이상이 분자내 및/또는 분자간 디설피드 결합의 형성에 수반된다는 것을 암시한다. 도 6 및 7 내의 여러 형태의 단량체 및 이량체들은 가능하게는 분자내 디설피드 결합과 관련된 이러한 5개의 시스테인 잔기들 간의 상이한 쌍형성으로부터 초래되었을 수 있다. 따라서, Cys129가 이량체화를 위한 분자간 디설피드 결합의 형성을 구동시키는 주요 잔기이지만, 또 다른 시스테인 잔기들이 다량체화를 위한 분자간 디설피드 결합의 광범위한 형성에서 또한 수반될 수 있다.

[0169] 실시예 3

[0170] 신규 hCD83ext 시스테인 → 세린 돌연변이체의 구축, 정제 및 특성화

[0171] 서열 A (서열 2에서 제시된 hCD83의 아미노산 잔기 20 내지 144에 상응함)에서 제시된 야생형 hCD83ext 내에는 5개의 시스테인 잔기 (즉, 본원에서 각각 Cys1, Cys2, Cys3, Cys4 및 Cys5로 상술되는, 서열 A (서열 1)의 아미노산 잔기 27(8), 35(16), 100(81), 107(88), 및 129 (110))가 있다. Cys5는 hCD83ext 이량체 형성에서 중요한 것으로 기준에 실연되었지만 ([Lechmann et al. (2005)]), 도 6에서 제시된 바와 같은 더 고차원의 다량체의 존재는 Cys5에 더하여 또 다른 시스테인 잔기들이 분자간 및 분자내 디설피드 결합 형성을 담당할 수 있음을 시사한다. 이러한 가능성을 연구하기 위해, 2개의 플라스미드 pGEX2ThCD83ext (상기 기술됨) 및 pGEX2ThCD83extmutC129S (미국 특허 공개 2007/0167607에 개시되어 있고, 알렉산더 스텔린카세러(Alexander Steinkasserer) 박사가 친절하게 제공함)를 hCD83ext의 또 다른 시스테인 잔기들의 기능을 연구하기 위한 부위 지정 돌연변이유발에 사용하였다. pGEX2ThCD83ext 및 pGEX2ThCD83extmutC129S는 아미노산 잔기 129에 대한 코돈을 제외하고는 동일하다. pGEX2ThCD83ext에서는 이러한 코돈이 야생형 시스테인 잔기를 특정하는 한편, pGEX2ThCD83extmutC129S에서는 이러한 코돈이 세린 잔기를 코딩하도록 돌연변이되었다.

[0172] 나머지 3개의 시스테인 코돈 (즉, Cys2, Cys3 및 Cys4) 중 하나 이상을 세린 코돈으로 돌연변이시키는 부위 지정 돌연변이유발을 사용하여 pGEX2ThCD83ext 또는 pGEX2ThCD83extmutC129S로부터 10개의 신규 플라스미드를 구축하였다 (주: 이러한 시스테인 → 세린 돌연변이가 "C2S" 돌연변이로 지칭된다). CD83 C2S 돌연변이체 변이체

를 CD83m-X, Y, Z로 명명하였고, 이때 X, Y 및 Z는 C2S 돌연변이가 있는 시스테인 번호(들)을 상술한다. 용어 "CD83m-X, Y, Z" (예를 들어, CD83m-3)은 용어 "CD83ext-mX, Y, Z" (예를 들어, CD83ext-m3)과 상호교환가능하게 사용된다. 예를 들어, CD83m-3, 4는 Cys 100 (즉, Cys3) 및 Cys 107 (즉, Cys4) 양쪽 모두에 C2S 돌연변이가 있는 CD83 돌연변이체인 한편, 원래의 hCD83extmutC129S 돌연변이체는 CD83m-5로 상술될 수 있다. 표 3 내의 플라스미드는 상응하는 CD83 돌연변이체 변이체 앞에 "p"를 부가함으로써 명명된다. 서열 번호에 의해 표 3에 언급된 sCD83 서열은 CD83 세포의 영역 + 막횡단 도메인의 첫번째 아미노산 (I1e)의 서열에 상응한다. 이러한 서열들이 세포의 도메인의 N-말단에 융합되는 GST 모이어티 및 트롬빈 절단 부위를 포함하지 않고, 벡터 서열을 포함하지 않는다는 것을 주지하여야 한다.

표 3

플라스미드 및 올리고뉴클레오티드

플라스미드	유전자 형	트롬빈 절단 부위의 아미노 말단 잔여물을 포함하지 않는, hCD83 영역의 뉴클레오티드 서열	트롬빈 절단 부위의 아미노 말단 잔여물을 포함하지 않는, hCD83 영역의 아미노산 서열
pGEX2ThCD83	P _{lac} ::GST-CD83, Ap ^R	서열 1의 뉴클레오티드 잔기 68-445	서열 9
pGEX2ThCD83 _{mutC129S}	P _{lac} ::GST-CD83, C5S Ap ^R	서열 10	서열 11
pCD83m-2	P _{lac} ::GST-CD83, C2S Ap ^R	서열 12	서열 13
pCD83m-3	P _{lac} ::GST-CD83, C3S Ap ^R	서열 14	서열 15
pCD83m-4	P _{lac} ::GST-CD83, C4S Ap ^R	서열 16	서열 17
pCD83m-2,3	P _{lac} ::GST-CD83, C2S, C3S, Ap ^R	서열 18	서열 19
pCD83m-3,4	P _{lac} ::GST-CD83, C3S, C4S, Ap ^R	서열 20	서열 21
pCD83m-2,5	P _{lac} ::GST-CD83, C2S, C5S, Ap ^R	서열 22	서열 23
pCD83m-2,5	P _{lac} ::GST-CD83, C3S, C5S, Ap ^R	서열 24	서열 25
pCD83m-4,5	P _{lac} ::GST-CD83, C4S, C5S, Ap ^R	서열 26	서열 27
pCD83m-2,3,5	P _{lac} ::GST-CD83, C2S, C3S, C5S, Ap ^R	서열 28	서열 29
pCD83m-3,4,5	P _{lac} ::GST-CD83, C3S, C4S, C5S, Ap ^R	서열 30	서열 31
프라이머	프라이머 서열	프라이머 서열 번호	
CYS2	5' GTG GAC TTG CCC <u>AGT ACT</u> GCC CCC TGG GAT 3'	서열 32	
CYS3	5' ATC CGA AAC ACT <u>ACG AGC</u> TCC AAC TCG GGG 3'	서열 33	
CYS4	5' GGG ACA TAC AGG <u>AGT ACT</u> CTG CAG GAC CCG 3'	서열 34	

[0173]

[0174] 3개의 프라이머 (즉, 표 1의 CYS2, CYS3, 및 CYS4)가 Cys2, Cys3 및 Cys4 코돈을 표적화하는 것에 의한 부위 지정 돌연변이유발에 사용되었다. 침묵 돌연변이가 또한 도입되어, 스크리닝 목적을 위한 새로운 제한 부위가 생성되었다 (즉, Cys2 및 Cys4에 대한 ScaI 및 Cys3에 대한 SacI). ScaI 및 SacI로의 다양한 돌연변이된 플라스미드들의 제한 소화를 사용하여, C2S 돌연변이들의 원하는 조합의 존재를 스크리닝하였다 (데이터는 제시되지 않음). 각각의 변이체 hCD83ext 융합 단백질을 코딩하는 영역을 DNA 서열분석에 의해 확인하였고, 코딩 영역에 상응하는 (그러나 GST-태그 및 트롬빈 절단 부위는 포함하지 않는) 서열 번호가 표 2에 열거되어 있다. 본 발명의 유래된 플라스미드 모두 (가능하게는 또한 pGEX2ThCD83ext 및 pGEX2ThCD83extmutC129S) 내의 아르기닌 코돈 "AGG" (hCD83ext의 아미노산 잔기 번호 50)가 진뱅크에 기탁된 CD83 cDNA 서열 내의 상응하는 아르기닌 코돈 "AGA"와 상이하지만, 이러한 불일치는 CD83 단백질 서열에 영향을 미치지 않는다는 것을 주지한다.

[0175]

각각의 CD83 돌연변이체의 생산 및 정제를 실시예 1에 기술된 발효 및 정제 프로토콜을 사용하여 수행하였다.

전형적으로, 2개의 주요 단백질 용출 피크가 음이온 교환 크로마토그래피 (AEC)를 사용한 폴리싱 단계의 크로마토그램 프로파일에서 나타났고, 제1 피크에 상응하는 분획들을 풀링하고 농축하여, 최종 hCD83ext 생성물이 형성되었다. 그러나, CD83m-2,5의 정제를 위한 폴리싱 단계의 제1 피크는 정상적인 러닝 조건 하에 유의하게 감소된 것으로 나타났고, 염 구배가 적용되었을 때 대부분의 CD83m-2,5가 제2 피크 내에 용출되었다 (도 8). 완충제 pH가 6.5로 감소되었을 때 이같은 낮은 수율이 개선되지 않았다 (데이터는 제시되지 않음). 그럼에도 불구하고, 작은 제1 피크에 상응하는 분획들을 풀링함으로써 CD83m-2,5를 여전히 정제할 수 있었다. CD83m-2,5의 밴드 패턴이 환원형 및 비-환원형 SDS-PAGE 분석 (각각 도 9 및 10) 하에 야생형 hCD83ext와 유사한 것으로 나타나는 한편, 원편광 이색성 (CD) (도 11) 및 분광형광측정 (도 12)을 사용한 분광 분석 시 단백질이 매우 상이한 프로파일을 나타내는 것으로 구조적 특성화에서 제시되었다. CD83m-2 (도 13) 및 CD83m-2,3,5 (데이터는 제시되지 않음)의 2개의 또 다른 돌연변이체를 정제했을 때 유사한 결과가 관찰되었다. CD83m-2, CD83m-2,5 및 CD83m-2,3,5는 Cys2 상에서의 C2S 돌연변이를 공유하기 때문에, 데이터는 이러한 돌연변이가 단백질 구조 또는 생화학적 성질에서의 유의한 변화를 초래할 수 있음을 시사한다. 단백질 구조 예측을 기초로, 분자내 디설피드 결합이 Cys2와 Cys4 사이에 형성될 수 있다. 이러한 분자내 디설피드 결합의 존재는 단백질 구조를 안정시키는데 또는 심지어 생활성을 개선하는데 중요할 수 있다.

[0176] 야생형 hCD83ext 및 CD83m-5에 대한 것과 정확히 동일한 발효 및 하류 프로세싱 프로토콜을 사용하여, CD83m-3을 생산하고 정제하였다. 2개의 주요 단백질 용출 피크가 AEC를 사용한 폴리싱 단계에서 나타났고 (도 14), CD83m-2와 관련된 상기의 생산 문제점이 CD83m-3의 생산 시에는 관찰되지 않았으며, 이는 Cys3 및 Cys5 상의 C2S 돌연변이가 주요한 구조적 변화를 초래하지 않았음을 암시한다. 정제된 CD83m-3을 SDS-PAGE (도 15), CD (도 16 및 17), 및 분광형광측정 (도 18)을 사용하는 구조적 특성화에 적용하였고, 이때 결과들은 야생형 hCD83ext 및 CD83m-5와 유사하였다. 명확하고 재현가능한 이중물(doublet)이 비-환원형 SDS-PAGE 상에서 관찰되었음을 주지한다 (도 15). 또한, CD83m-3 이중물에 상응하는 이러한 2개의 밴드 중 어느 것도 CD83m-5의 단량체 종과 이동성이 동일한 것으로 나타나지 않았지만, 위쪽의 CD83m-3 밴드는 야생형 hCD83ext의 단량체 종과 이동성이 동일한 것으로 나타났음을 주지한다 (도 19). 비-환원형 SDS-PAGE를 위한 샘플 제조 동안의 잠재적인 디설피드 결합 스크램블링을 피하기 위해, N-에틸말레이미드 (NEM)로 샘플을 예비처리함으로써 프로토콜을 변형하였다. NEM은 디설피드 결합을 형성하지 않은 시스테인 잔기 상의 유리 티올 기를 알킬화시킴으로써, 이러한 시스테인 잔기에 의한 후속 디설피드 결합형성을 방지한다. NEM을 사용하는 변형된 프로토콜이 임의의 잠재적인 디설피드 결합 스크램블링을 방지함으로써 CD83 이량체의 정량을 위한 더욱 신뢰할 수 있고 일관된 방법을 제공하는 것으로 보이고, CD83 단량체가 이중물이 아니라 단일 밴드로 관찰된다 (도 20).

[0177] 기존에, [Zinser et al. Immunobiology (2006) 211:449-453]에서 Cys5이 CD83 이량체화를 담당하는 주요 시스테인이라는 것과 hCD83ext-m5가 이량체보다는 단량체를 형성하였음이 보고되었다. 그러나, 본 발명가들은 크기 배제 크로마토그래피 (SEC; 도 21)로의 분석 시 상당한 hCD83ext-m5 이량체화를 관찰하였고, 이러한 결과는 NEM 예비처리가 있는 변형된 프로토콜을 사용하는 비-환원형 SDS-PAGE 결과 (도 20)와 일치하였다. 놀랍게도, SEC (도 21) 및 변형된 NEM 프로토콜을 사용하는 비-환원형 SDS-PAGE (도 20)의 결과를 기초로 hCD83ext-m3의 이량체화는 없거나 최소였다. 이러한 결과는 Cys3 또는 심지어 다른 시스테인 잔기들 (즉, Cys1, Cys2, 및 Cys4) 또한 CD83 이량체화에서 특정한 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다. hCD83ext-m3 분자가 야생형 hCD83ext의 단량체 종과 이동성이 동일하지만 CD83m-5보다는 이동성이 약간 더 높은 것으로 보인다는 것을 주지한다 (도 20). 따라서, 단량체 형태의 hCD83ext-m3과 hCD83ext-m5는 구조가 상이할 수 있는 한편, hCD83ext-m3 단량체는 단백질 구조가 야생형 hCD83ext 단량체와 유사하거나 심지어 동일할 수 있다. 이러한 CD83 변이체들 모두 환원형 SDS-PAGE (도 22) 및 환원형 SEC (도 23)로의 분석 시 밴드 패턴이 동일한 것으로 나타났고, 이때 단량체 종만 관찰되었다.

[0178] 요약하면, 비-환원형 SDS-PAGE (도 24)를 사용하여, 본 발명가들은, hCD83ext-m5가 단량체로서만 존재한다는 기준의 단언과 달리 (자신에 대한 노트: 본 간행물 리뷰), 이러한 돌연변이체 종 내의 또 다른 시스테인 잔기들이 이량체, 삼량체 및 심지어 사량체를 형성하기 위한 다량체화에 수반될 수 있다는 것을 나타냈다. 웨스턴 블로팅을 사용하여 이러한 다량체성 종들이 CD83과 관련되는 것으로 나타났다 (도 25).

실시예 4

[0180] hCD83ext 야생형, hCD83m3 및 hCD83m5 생활성의 비교 및

[0181] 단백질 안정성에 대한 pH의 효과

[0182] LPS/IFN- γ 자극 말초혈 단핵 세포 (PBMC)에 의한 TNF α 생산을 억제하는 야생형 및 돌연변이체 hCD38ext의 능

력을 사이노몰거스(cynomologus) 원숭이로부터의 PBMC를 사용하여 시험관내 분석법에서 평가하였다. 구체적으로, 사이노몰거스 PBMC를 단리하고, 12시간 동안 여러 농도 (0.5, 5, 25 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 hCD83ext 야생형 (pH 4.5 또는 5.5에서 제형됨), hCD83ext-m3 또는 hCD83ext-m5 (501-1)로 예비처리하였다. hCD83ext-m3 및 hCD83ext-m5는 각각 pH 5.5 또는 7.6에서 제형되었다. 그후, 세포를 6시간 동안 브레펠린(Brefeldin) A (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 존재 하에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + IFN- γ (100 U/mL)로 활성화시키고 나서, 시판되는 Fix/Perm 키트를 사용하여 TNF α 에 대해 세포내 염색하였다. TNF α 생산량의 유동 세포측정법 획득 및 분석을 골수성 수지상 세포 또는 단핵구를 사용하여 평가하였다. 결과는 TNF α 를 생산하는 mDC 또는 단핵구의 %로서, 그리고 세포 당 기준으로 TNF α 수준을 나타내는 평균 형광 유닛 (MFU)으로 표현된다. 도 26에 제시된 바와 같이, 자극된 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 것에서 hCD83m-3은 m5 돌연변이체보다 더욱 활성이고, m5 돌연변이체는 야생형 hCD93ext보다 더욱 활성이다. 또한, hCD83ext 야생형은 pH 5.5에서 제형되는 경우보다 pH 4.5에서 제형되는 경우에 더 큰 활성을 유지한다. pH 4.5 또는 pH 5.5의 hCD83ext 야생형의 제형은 pH 7.6의 제형보다 더욱 활성이 다 (데이터는 제시되지 않음).

[0183] hCD83ext-m5 및 hCD83ext 야생형의 활성을 야생형 및 m3 돌연변이체 단백질 양쪽 모두가 pH 7.6에서 제형된 것을 제외하고는 상기 기술된 것과 유사한 TNF α 억제 분석법에서 비교하였다. 도 27에 제시된 바와 같이, hCD83ext-m5는 LPS/IFN- γ 자극 사이노몰거스 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 능력 면에서 hCD83ext 야생형의 2개의 제제를 능가하였다.

[0184] 원래 pH 7.6에서 제형된 hCD83ext 야생형 단백질 (도 26 및 27에서 제시된 데이터)의 완충제를 pH 4.5 또는 5.5의 완충제로 교환하였고, 시험관 내에서 LPS/IFN- γ 자극 사이노몰거스 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 능력에 대해 상기 기술된 바와 같이 다시 테스트하였다. 도 28에 제시된 데이터는 물질을 산성 완충제 (pH 4.5 또는 pH 5.5)에서 제형함으로써 야생형 (WT) 단백질의 생활성이 강화될 수 있음을 실연한다. 따라서, 환경 스트레스 (예를 들어, 산화, 탈아미드화, 온도 등)의 영향을 잠재적으로 최소화함으로써, 약 4.5-5.5의 pH가 hCD83ext를 안정화시킬 수 있다. 그러나, hCD83ext-m3이 pH 5.5에서 제형되었을 때, 이는 pH 4.5 또는 5.5에서 제형된 야생형보다 더 활성이었다 (도 29). hCD83ext-m3 또한 hCD83ext-m5보다 더욱 활성이었지만, pH 5.5의 hCD83m-5는 이러한 분석법에서 테스트되지 않았다. 흥미롭게, 이식 거부를 억제하는 hCD38ext 야생형, hCD83ext-m3 및 hCD83ext-m5의 능력을 생체내 마우스 심장 이식 모델에서 테스트했을 때 (8일 동안 100 $\mu\text{g}/\text{마우스}/\text{일}$), 이식편 생존을 연장하는 능력 면에서 차이가 거의 없는 것으로 나타났다. 단독요법으로 사용되는 경우, 각각의 형태는 이식편 생존을 8일의 평균 생존 기간에서 약 14일로 연장할 수 있었다. 시판되는 면역억제제 (시클로스포린 포함)와 조합된 경우, 모든 형태가 장기 생존 프로파일의 유사한 상승적 프로파일을 나타냈다. 따라서, hCD83ext-m3 및 pH 조정 (낮은 pH로의 조정)의 한가지 가치는 개선된 전반적인 단백질 안정성인 것으로 보인다.

[0185] hCD83ext 야생형과 비교하여 hCD83ext-m3의 개선된 안정성/활성이 인간 PBMC를 사용한 유사한 분석법에서 확증되었다. 도 30에 제시된 바와 같이, hCD83ext-m3의 4가지 상이한 제제 (PBS, pH 5.5에서 제형된 -002-2-3; 트리스, pH 7.6에서 제형된 -002-1; PBS pH 5.5에서 제형된 -003-2-2 및 PBS, pH 4.5에서 제형된 -003-3-2) 각각이 LPS/IFN- γ 자극 인간 PBMC에 의한 TNF α 생산을 억제하는 능력 면에서 hCD83ext 야생형 (PBS pH 7.6에서 제형된 ARG-021로 지정됨)을 능가하였다.

실시예 5

글리세롤이 hCD83ext 제형을 안정화시킨다

[0186] hCD83ext가 50% 글리세롤 (더 낮은 글리세롤 농도 또한 사용될 수 있음)의 최종 농도로 보관용으로 제형되고, 이어서 C57BL/6→BALB/c 마우스 심장 이식 모델에서 시클로스포린과 조합되어 8%의 최종 글리세롤 농도로 생체내에서 테스트되는 경우, 장기 이식편 생존 (> 100일)이 기록된 한편, 이러한 조합 연구에서 글리세롤이 생략된 실험에서는 평균 생존이 약 14일로 제한되었다.

실시예 6

야생형 hCD83ext의 강제 분해

[0189] 야생형 hCD83ext 모액의 로트 021 (PBS pH 7.6 내의 동결 분취량, 약 6 mg CD83/mL)을 사용한 강제 분해 연구를 하기와 같이 수행하였다. 여러 분취량을 해동시키고, 조합하였다. 용액들은 하기의 표에 기술된 바와 같이 제조되었다:

표 4

강제 분해 연구에 대한 스트레스 조건

스트레스 조건	설명
RT 대조군	모액을 물로 약 1 mg/ml의 최종 CD83 농도로 희석하고, 주위 조건에서 24시간 동안 유지시켰다.
산성	모액을 HCl로 약 1 mg/ml의 최종 CD83 농도 및 50 mM의 HCl 농도로 희석하고, 주위 조건에서 3시간 또는 24시간 동안 유지시켰다.
염기성	모액을 NaOH로 약 1 mg/ml의 최종 CD83 농도 및 50 mM의 NaOH 농도로 희석하고, 주위 조건에서 3시간 또는 24시간 동안 유지시켰다.
산화	모액을 과산화수소로 약 1 mg/ml의 최종 CD83 농도 및 1.2% 또는 0.12%의 과산화물 농도로 희석하고, 주위 조건에서 3시간 동안 유지시켰다.
빛	모액을 물로 약 1 mg/ml의 최종 CD83 농도로 희석하고, D65/ID65 광원에 1일 또는 5일 동안 노출시켰다. 또다른 분취량을 하일로 싸고, 빛 챔버 내에 놓아, 빛에 대한 노출의 직접적인 결과가 아닌 챔버 내에서의 분해 조건을 설명하였다. 이러한 어두움 대조군은 챔버에서 5일 동안 유지되었다.
열	모액을 물로 약 1 mg/ml의 최종 CD83 농도로 희석하고, 70°C에서 3시간 또는 24시간 동안 유지시켰다.

[0192]

[0193] 언급된 노출 시간의 종결 시에, 산성 및 염기성 샘플을 중성화하였다. SE-HPLC 및 등전 포커싱 (IEF) 젤을 사용하여 분석할 때까지 모든 샘플을 -20 °C에서 보관하였다. SEC-HPLC 결과가 표 5에서 제공된다.

표 5

SEC-HPLC: 강제 분해 연구의 요약

조건	복제물	단량체%	응집물%	단편%
대조군 RT	1	58.82	4.90	36.28
대조군 RT	2	58.78	5.86	35.36
대조군 RT	3	58.29	6.53	22.31
대조군 RT	4	58.74	6.41	34.85
대조군 RT	5	58.33	7.08	34.60
대조군 RT	6	57.02	9.54	33.44
대조군 RT	7	53.76	12.46	33.78
산 3시간	1	65.48	4.06	30.45
산 3시간	2	64.21	4.85	30.94
산 24시간	1	77.55	4.06	18.40
산 24시간	2	77.33	4.03	18.65
염기 3시간	1	40.77	0.66	58.57
염기 3시간	2	41.20	1.00	57.80
염기 24시간	1	53.54	24.06	23.97
염기 24시간	2	54.44	23.41	22.15
열 3시간	1	65.96	0.00	32.43
열 3시간	2	66.07	0.00	32.44
열 24시간	1	31.93	0.00	68.07
열 24시간	2	35.45	0.00	64.55
산화 0.12%	1	51.25	11.48	37.26
산화 0.12%	2	50.51	12.53	36.96
산화 1.2%	1	37.38	9.62	52.99
산화 1.2%	2	37.46	9.51	53.03
밝음 1일	1	45.88	15.70	27.65
밝음 1일	2	45.71	15.96	38.33
밝음 5일	1	27.35	35.58	37.07
밝음 5일	2	27.35	35.45	37.20
어두움 대조군	1	31.38	36.38	32.25
어두움 대조군	2	31.35	35.76	32.89

[0194]

[0195] SE-HPLC 및 등전 포커싱 (제시되지 않음)을 사용하여 생성된 데이터는 hCD83ext의 분해 생성물이 출발 물질보다 더욱 음전성이라는 것을 가리킨다. 이는 주로 다중 탈아미드화 또는 가수분해에 기인할 수 있고, 진행 중인 예비제형(preformulation) 연구에서 평가될 것이다. 이러한 데이터는 산성 pH가 hCD83ext의 응집 상태 및 전하 상태 양쪽 모두를 안정화시킨다는 것을 시사한다. 전하 상태와 관련하여, pI는 6.9이다. 또 다른 주요 밴드가 약 6.8의 pI로 실온 (RT) 대조군에서 나타났다.

[0196]

분자 크기의 국면으로부터, 산성 조건 (pH 약 2)은 단량체를 선호하였다 (약 4% 응집; RT 대조군과 동일). 모든 다른 조건 (염기, 과산화물, 열, 빛, RT)은 증가된 응집을 나타냈다. hCD83ext는 광-안정적인 것으로 보인다. 이러한 샘플에 대해 관찰된 분해는 빛보다는 주변 조건에의 노출 때문일 가능성이 크다. 열 (70°C) 및 염기성 조건 (pH 약 12)이 급속한 분해를 야기하였음이 명백하다; 4시간 후, 주요 밴드들이 부재하고, 다수의 음전성 밴드들이 관찰된다. 산성 조건 (pH 약 2)는 hCD83ext의 응집 상태 및 전하 상태 양쪽 모두에 대해 단백질을 안정화시키는 것으로 보인다. IEF 프로파일은, RT 대조군과 비교했을 때에도, 손상되지 않은 것으로 보인다.

[0197]

pH의 역할 및 단백질 안정성에 대한 이의 영향을 더 연구하기 위해, 야생형 hCD83ext (pH 7.6의 PBS 내의 로트 021)를 새롭게 해동시키고, 분석하거나 (표 6의 첫번째 행), 또는 실온 및 2-8°C에서, pH 4, 5, 6, 7, 8 및 9에서 보관하였다. 1일, 2일, 4일 및 10일의 보관 후, 샘플들을 분석할 때까지 -70°C에서 유지시켰다. 그후, 이러한 샘플들을 SEC HPLC (표 6)에 의해 또는 SDS-PAGE 바이오분석기(Bioanalyzer) (환원형 및 비-환원형 조건; 도 31-35)를 사용하여 분석하였다.

표 6

pH 분해 속도 연구에 대한 SE-HPLC 결과 요약

pH	온도	일수	단량체 %	응집물 %	단편 %
분석일에 세롭게 제조됨	0	0	54.35	1.98	43.67
	0	0	59.47	2.20	38.33
	0	0	57.18	2.13	40.69
	0.35	0.35	59.60	6.31	34.09
	0.35	0.35	59.83	6.32	33.85
	0.35	0.35	59.86	6.76	33.38
4	2-8C	1	52.63	4.32	43.05
	2-8C	10	51.46	4.20	44.34
	RT	1	52.99	0.00	47.01
	RT	10	45.99	2.45	51.56
5	2-8C	1	52.36	4.92	42.72
	2-8C	10	51.48	6.97	41.55
	RT	1	53.58	0.00	46.42
	RT	10	41.16	4.61	54.23
6	2-8C	1	48.54	6.39	45.07
	2-8C	10	44.16	9.90	45.94
	RT	1	53.81	0.00	46.19
	RT	10	31.17	11.78	57.05
7	2-8C	1	56.35	6.02	37.63
	2-8C	10	43.01	12.60	44.39
	RT	1	52.11	0.00	47.89
	RT	10	28.61	17.27	54.12
8	2-8C	1	58.75	5.76	35.49
	2-8C	10	12.26	9.75	77.99
	RT	1	53.32	4.66	42.02
	RT	10	31.12	22.25	46.63
9	2-8C	1	59.06	9.03	31.91
	2-8C	10	46.87	16.05	37.08
	RT	1	58.07	4.79	37.14
	RT	10	35.57	20.16	44.27

[0198]

[0199] 이러한 데이터는 sCD83이 낮은 pH (pH 4-5)에서 완충되는 경우 sCD83 안정성을 지지하는데 조건이 더욱 유리하고, 이러한 조건들 하에 응집 및 전하 상태에서의 변화가 최소화되는 것으로 보인다는 것을 시사한다. 또한, 염기, 과산화물, 열, 빛 또는 실온 조건에의 노출은 응집 또는 단편화 및/또는 분해를 증가시키는 것으로 보인다.

[0200]

하기의 동물 실험은 모두 *Canadian Council on Animal Care* 가이드라인에 따라 수행되었다. 하기 기술된 실험들에서 야생형 형태 (hCD83ext-wt; 서열 5) 또는 m3 돌연변이체 형태 (hCD83ext-m3; 아미노산 12, 20, 92 및 114는 시스테인 (Cys)이고 아미노산 85는 세린 (Ser)인 서열 7)의 대장균으로부터 정제된 재조합 인간 sCD83이 사용되었다.

[0201]

실시예 7

[0202]

hCD83ext-m3이 뮤린 신장 이식 모델에서 장기 동종이식 내성을 유도한다

[0203]

마우스 동소성 신장 이식 모델 ([Zhang et al. (2005) *Microsurgery* 16(2):103-109] 참조)을 사용하여 동종이식 내성을 유도하는 hCD83ext-m3의 능력을 평가하였다. BALB/c 마우스에게 C57BL/6 마우스 제공자로부터의 신장 동종이식편을 제공하였다. 수용자 마우스를 치료하지 않거나 (2마리의 마우스), 또는 이식 1일 전 (제-1일), 이식일 (제0일) 및 7일의 수술 후 일수 (POD) 동안 hCD83ext-m3 (3마리의 마우스; 100 µg/마우스/일, 정맥내)을 제공하였다. 치료되지 않은 2마리의 마우스는 28일 및 35일 동안 생존하여, 평균 생존 기간 (MST)이 31±4.9일이었다. hCD83ext-m3으로 치료된 3마리의 마우스 각각은 100일을 초과하는 POD 동안 생존하였다. 따라서, hCD83ext-m3으로의 단독요법이 마우스 동소성 신장 이식 모델에서 장기 동종이식 수락에 이르렀다. 별도의 실험에서, hCD83ext-wt로의 치료에 의해 유사한 결과가 수득되었다.

[0204]

실시예 8

[0205]

단독적인 또는 시클로스포린 A와 조합된 CD83ext-wt 또는 CD83-m3이

[0206]

뮤린 이소성 심장 동종이식 모델에서의 이식 거부를 억제한다

[0207] 동물 모델: C57BL/6→BALB/c 마우스 심장 이식 모델

[0208] 뮤린 이소성 심장 동종이식 모델을 사용하여, 딴곳 심장 이식의 거부를 예방하는 단독적인 또는 시클로스포린 A (CsA)와 조합된 hCD83ext-m3의 효과를 결정하였다. 수컷 성체 C57BL/6 (H-2b)이 제공자로 사용되었고, BALB/c (H-2d) 마우스가 수용체로 사용되었다 (Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA)). 기존에 기술된 바와 같이 ([Corry et al. (1973) Transplantation 16(4):343-350] 및 [Wang et al. (2007) J Immunol 179(7):4451-4463]), 복강내 이소성 심장 이식을 수행하였다. 이러한 연구에서, 이식 수술은 자가 심장, 뿐만 아니라 동종 이형 심장이 수용자 내에 존재하도록 C57BL/6 제공자로부터 BALB/c 수용자에게 완전한 MHC-미스매칭 (mismatched) 심장을 전달하는 것을 수반하였다.

[0209] 심장 이식 수용자를 하기와 같이 치료하였다: 군 1 (5마리의 수용자)에게는 치료를 제공하지 않았다. 군 2 (3 마리의 수용자)에게 -1 POD에서 +7 POD까지 100 μ g/마우스/일로 hCD83ext-m3 단독요법을 정맥 내로 제공하였다. 군 3 (4마리의 수용자)에게 -1 POD에서 +7 POD까지 100 μ g/마우스/일로 hCD83ext-m3 단독요법을 정맥 내로 제공하였고, 또한 실험을 종료할 때까지 매일 CsA 15 mg/kg/일을 피하 제공하였다. 이식편의 심장박동을 이중 맹검 방식으로 직접적인 복부 촉진에 의해 매일 모니터링하고 평가하여, 심장 건강/거부 상태를 검출하였다. 동종이형 심장이 계속 박동한 수술후 일수 (POD)로 심장 이식 생존이 측정되었다. 결과가 표 7에서 제공된다.

표 7

군	심장 이식 생존 (POD)	MST \pm SD (일)
1: 미처치 대조군	7, 7, 8, 8, 8	7.6 \pm 0.6
2: hCD83ext-m3	13, 14, 14	13.7 \pm 0.6
3: hCD83ext-m3 + CsA	>100 x 4	>100

[0210]

[0211] 별도의 실험에서, 심장 이식 거부를 억제하는 hCD83ext-wt 단독, CsA 단독, 또는 hCD83ext-wt + CsA의 능력을 상기 기술된 바와 같이 평가하였다. 심장 이식 수용자를 하기와 같이 치료하였다: 군 4 (4마리의 수용자)에게 이식 전날부터 이식 거부까지 100 μ g/마우스/일로 hCD83ext-wt (서열 5) 단독요법을 정맥 내로 제공하였다. 군 5 (6마리의 수용자)에게 CsA 단독요법 (15 mg/kg/일, 매일, 피하)을 제공하였다. 군 6 (4마리의 수용자)에게 100 μ g/마우스/일로 hCD83ext-wt을 정맥 내로 제공하였고, 또한 CsA 15 mg/kg/일을 이식 전날부터 이식 후 7일 까지 매일 피하 제공하였다. 결과가 표 8에서 제시된다.

표 8

군	심장 이식 생존 (POD)	MST \pm SD (일)
4) hCD83ext-wt 단독요법	15, 15, 16, 17	15.8 \pm 1.0
5) CsA 단독요법	14, 15, 15, 16, 17	15.5 \pm 1.1
6) CD83ext-wt + CsA	29 [†] , >100, >100, >100	>100

[†]심장 이식편이 강하게 박동하면서 동물이 사망하였다 (치료와 관련된 것으로 여겨지지 않음)

[0212]

[0213] 상기 실험은 hCD83ext-m3 및 hCD83ext-wt 단독요법이 동종이식 생존을 미처치 대조군과 비교하여 약 2배만큼 연장한다는 것을 실연한다. 또한, hCD83ext-m3 및 CD83ext-wt는 CsA와 상승작용하여, CsA 단독요법과 대조적으로 장기 동종이식 생존을 허용하였다.

[0214]

추가적인 실험에서, POD 50까지의 CsA + hCD83ext-m3 (100 μ g, 정맥내, 제-1일 내지 제+7일)으로 마우스 심장 이식 수용자를 치료하는 것은 제50일에 일일 CsA 요법을 정지한 후 거부가 없는 것에 의해 실연되는 바와 같이 동종이식 내성의 완성에 이르렀다 (데이터는 제시되지 않음). 반면에, CsA 단독요법 또는 hCD83ext-m3 단독요법은 약 13일 내지 17일 후 거부에 이르렀고, 이는 hCD83ext-m3이 CsA와 상승작용을 한다는 것을 가리킨다 (표 7 및 8 참조). 놀랍게도, 조합 요법은 CsA가 제28일에 중단되었을 때 영구적인 동종이식 내성에 이르지

않았고, 이는 완전한 약물-독립적 내성을 달성하기 위해 예상밖의 긴, 거부가 없는 생존 기간이 요구된다는 것을 가리킨다 (데이터는 제시되지 않음). 더 적은 용량의 hCD83ext-m3 (즉, 제-1일 내지 제+1일의 3회 용량)이 CsA와의 완전한 상승작용에 이르렀지만, CsA가 제50일에 중단되었을 때의 급속한 거부에 의해 실연되는 불완전한 수술 내성에 이르렀다 (데이터는 제시되지 않음). 따라서, 동종이식 내성의 유도에 대한 용량 응답 효과가 실연되었다.

[0215] 실시예 9

[0216] hCD83ext-m3이 래트 신장 동종이식편의 만성 거부를 예방한다

인간에서, 이식하고 나서 수개월 내지 수년 후 만성 거부가 발생하고, 이는 이식편 손실의 가장 통상적인 원인이다. 만성 거부는 세뇨관 위축, 간질 섬유증 및 동맥의 섬유성 내막 비후로 신장에서 병리학적으로 특성화되는, 이식편 기능의 저속 열화를 초래한다.

[0218] 잘 확립된 래트 신장 이식 모델 (본질적으로 [Bedard et al. (2006) Transplantation 81(6):908-14]) 및 미국 특허 7,514,405 (이의 내용은 거명에 의해 본원에 포함됨)에 기술된 바와 같음)을 사용하여, CsA와 조합된 hCD83ext-m3이 만성 거부를 억제할 수 있는지 여부를 평가하였다. 이러한 모델에서, 신장 이식 수용자를 단기 (11일) 용량의 시클로스포린 (CsA)으로 치료하여, 초기의 급성 거부를 방지하였다. 이같은 이식 수용자는 140일의 수술후 일수 (POD)까지 만성 이식편 거부의 특징적인 이러한 병리학적 변화를 신뢰할 수 있게 나타냈다.

[0219] F344 래트가 루이스(Lewis) 래트에 대한 신장 제공자로서의 구실을 하였다. 3마리의 대조군 이식 수용자를 치료 용량보다 낮은 용량의 단독 CsA (0.75 mg/kg/일; POD 0-10)로 치료하였다. 이식 수용자 3마리의 제2군은 CsA (0.75 mg/kg/일; POD 0-10) 및 hCD83ext-m3 (100 μ g/일, 정맥내, POD 1-7) 양쪽 모두로 치료하였다. 이식 수용자들을 POD 140에 희생시키고, 이식된 신장을 조직학 및 면역조직화학에 의해 만성 거부의 징조에 대해 평가하였다. 세뇨관 위축, 사구체 위축, 간질 섬유증, 내막 비후, 세포 침윤 및 피질 흉터형성을 평가하는 독립적인 병리학자에 의해 0-4의 척도로 신장 조직학을 채점하였고, 이때 0 = 정상; 1 = 최소 변화; 2 = 경미한 변화; 3 = 중간 정도의 변화; 4 = 현저한 변화였다. 도 36에 제시된 바와 같이, CsA + hCD83ext-m3 치료가 CsA 단독으로의 치료와 비교하여 각각의 카테고리에서의 점수를 유의하게 ($p < 0.05$) 개선하였다. 도 37의 데이터는 hCD83ext-m3이 사구체 (G) 및 세뇨관주위 모세혈관 (PTC) 내의 IgG 및 IgM 항체 침착물의 침착에 관하여 신장 동종이식편에서의 면역조직화학 등급결정을 유의하게 ($p < 0.05$) 개선하고, CD2, CD4 및 ED-1 세포에 의한 세포성 침윤을 감소시킨다는 것을 실연한다. 요약하면, CsA와 조합된 hCD83ext-m3이 래트 신장 이식 모델에서 만성 동종이식편 거부를 예방한다. hCD83ext-m3 + CsA 치료에 의한 만성 거부의 예방은 이식편내 항체 침착의 하향조절 및 신장 이식 수용자에서의 만성 거부의 조직학적 특색인 세뇨관 위축/간질 섬유증의 예방과 관련된다. 이러한 데이터는 hCD83ext-m3의 다기능성을 강조한다. 상기의 마우스 심장 및 신장 이식 연구에서 실연된 바와 같이 급성 세포성 거부를 차단하는 능력에 더하여, 이러한 모델은 만성 염증 및 체액성 면역 응답을 억제하는 능력을 나타낸다 (즉, 만성 거부 병리학은 급성 세포성 거부와 관계가 없다).

[0220] 실시예 10

[0221] hCD83ext-m3 + 시클로스포린 A로의 치료가 비-인간 영장류에서

[0222] 신장 이식편 생존을 연장한다

[0223] 각각의 수용자 사이노몰거스 원숭이의 신장 1개를 다른 사이노몰거스 원숭이로부터 제거된 신장으로 교체하였다. 또한, 이식된 신장이 생명을 유지시키는 것이도록 수용자의 비-이식 신장을 수술로 제거하였다. 3마리의 이식 수용자를 제50일까지 치료 용량보다 낮은 용량의 CsA (10 mg/kg, 근육내)를 매일 제공하면서 -1 내지 +7 POD (9회 용량) 동안 hCD83ehCxt-m3 (3 mg/kg)의 정맥내 투여로 치료하였다. 대조군 내의 3마리의 이식 수용자에게는 CsA (10 mg/kg, 근육내) 단독요법을 제공하였다. 모든 동물을 소변 배출량, 혈청 크레아틴 수준 및 음식 및 물 소비의 평가를 포함하는 방법에 의해 동종이식편 거부에 대해 모니터링하였다. 각각의 군으로부터의 동물 1마리가 조기에 안락사되어야 해서 (급성 거부를 기초로 하지 않음), 연구 종점 분석용으로 각각의 군에 2마리의 동물이 남았다. 결과가 표 9에서 제시된다.

표 9

CD83m-3	CsA	이식편 생존 기간	평균 생존 기간
1	-	10 mg/kg 근육내	33
2	-	10 mg/kg 근육내	41
3	9회 용량	10 mg/kg 근육내	52
4	9회 용량	10 mg/kg 근육내	59

[0224]

대조군 동물 (CsA 단독요법이 제공됨) 중 어느 것도 CsA 종료일 (제50일)까지 생존하지 않은 한편, hCD83ext-m3 + CsA-치료 동물 양쪽 모두는 제50일에 거부의 임상 증상을 나타내지 않았다 (즉, 정상적인 식욕, 크레아틴 및 소변 배출량). 그러나, CsA 종료 시, hCD83ext-m3-치료 동물 양쪽 모두 급속하게 거부하였고, 이는 급성 거부를 제어하기에 불충분한 내성 유도를 가리킨다.

[0226]

다음 실험에서, (1) CsA와의 임상적으로 관련된 상승작용을 실연하고, (2) 유도된 수술 내성의 수준을 평가하기 위해, hCD83ext-m3 (-1 내지 +13 POD 동안 10 gm/kg/2×일, 정맥내) + 제90일까지 매일의 CsA (10 mg/kg, 근육내)를 신장 이식 수용자에게 제공한 후, 2주마다 CsA를 50% 감소시켰다.

도면

도면 1a

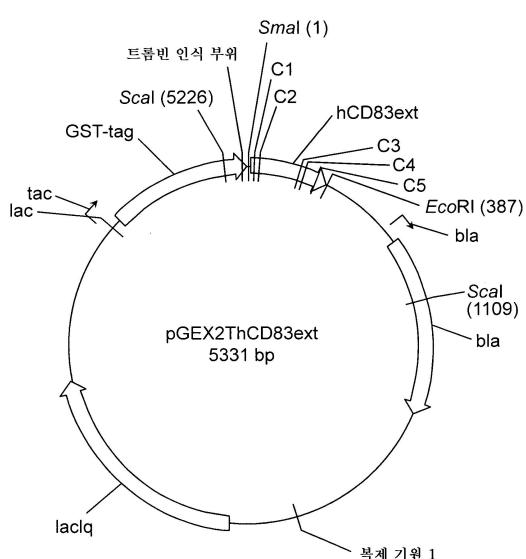
NP_004224.1 45 Y_{TVSWKLLLEGGE}---RME_{TPQEDHRLRGQH}Y_{HOKGONGSF}DAPN_{PR} 44
 XP_518248.2 45 Y_{TVSWKLLLEGGE}---RME_{TPQEDHRLRGQH}Y_{HOKGONGSF}DAPN_{PR} 44
 XP_852647.1 45 Y_{DVS}WAKLT_{EGGE}---KIEELRDG-----LHS_{-QKEGLAAPEERLH} 83
 NP_001040055.1 45 Y_TTVSWAKLT_{DGGE}---RVEV_{TQED}-----LQ_{SPOORNSEAPR}RLY 84
 NP_033986.1 47 Y_{AVSWAKVSE}SGTE---SVELPESK-----QNS_{SEAPR}RAY 81
 XP_341510.2 47 Y_{AVSWAKVSE}SGNE---RLEIPESK-----QNS_{SEAPR}RAY 81
 XP_418929.1 51 Y_{QAVSWH}KMAGVG_{DRI}AWKVL_{DV}ESR-----H_{PX}KGIGGS_{EL}SNT_{TF} 92

NP_004224.1 91 S_{LR}IRNTTSCNSGTYRCQDPDQORNLSGKVILRV_{TGCPA}QKEETFKK 140
 XP_518248.2 91 S_{LR}IRNTTSCNSGTYRCQDPDQORNLSGKVILRV_{TGCPA}QKEETFKK 140
 XP_852647.1 84 L_KIRNTTSDGTYRCTVELDQORNQSGTVTK_{TGCP}KERK-ET_{FF}QK 131
 NP_001040055.1 85 S_{LR}IRNTTSCNSGTYRCTVELDQORNQSGTVTK_{TGCP}KERK-ET_{FF}QK 134
 NP_033986.1 82 S_{LT}IRNTTICSSGTYRCQELIGGORNLSGKVILRV_{TGCP}KREATESTFRK 131
 XP_341510.2 82 S_{LT}IRNTTICSSGTYRCQELIGGORNLSGKVILRV_{TGCP}KREATESTFRK 131
 XP_418929.1 93 Q_{LR}IRNTSQDSGTRCALGEQRGDHNLSGTILTK_{TGCP}KREATESTFRK 141

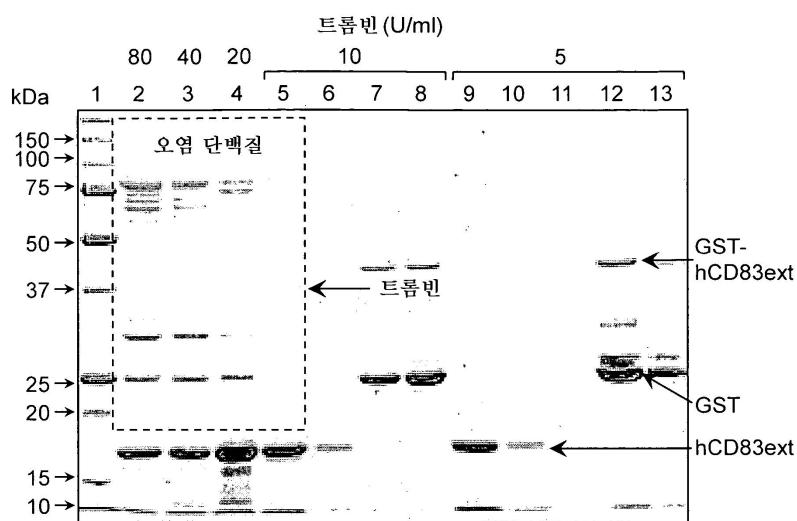
도면1b

NP_004224.1	141	YRAE/IVLLIAVIVFYLTLLIIFTCKFARLQSIFP-DFSKAGMERAFLPVTS	189	
XP_518248.2	141	YRAE/IVLLIAVIVFYLTLLIIFTCKFARLQSIFP-DFSKAGMERAFLPVTS	189	
XP_852647.1	132	YRAE/IVLLIAVIVFYLTLLIIFTCKFARLQSIFP-DFSKAGMERAFLPVTS	180	
NP_001040055.1	135	YRAE/IVLLIAVIVFYLTLLIIFTCKFARLQSIFP-DFSKAGMERAFLPVTS	183	
NP_033986.1	132	YRAE/IVLLIAVIVFYLTLLIIFTCKFARLQSIFP-DFSKAGMERAFLPVTS	180	
XP_341510.2	132	YRAE/AVLIFSLVVFYLTLLIIFTCKFARLQSIFP-DFSKAGMERAFLPVTS	180	
XP_418929.1	142	YKTE/LFMLTCIGIFYLLIFFTCTCIRKESMSPSDKRRDSKRTITLINA	191	
NP_004224.1	190	PN----KHLGLVTPHKTELV----	205	(서열 2)
XP_518248.2	190	PN----KHLGPTPHKTELV----	205	(서열 35)
XP_852647.1	181	PH----KHLESVTFHRTEVV----	196	(서열 36)
NP_001040055.1	184	PN----KHLEPVTLHRTELV----	199	(서열 37)
NP_033986.1	181	PS----KHLGPTLKPKTETV----	196	(서열 38)
XP_341510.2	181	PS----KHLGPTLKPKTETV----	196	(서열 39)
XP_418929.1	192	HEMTTLRVLNSSGSTCKSGLTSSSI	215	(서열 40)

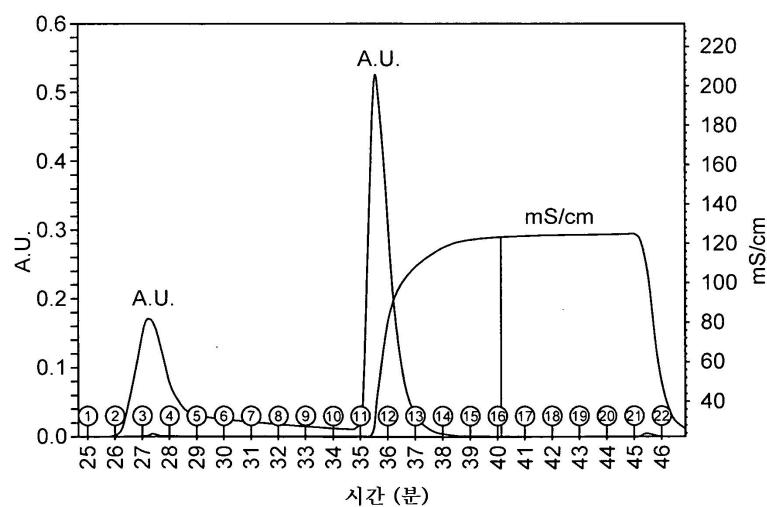
도면2



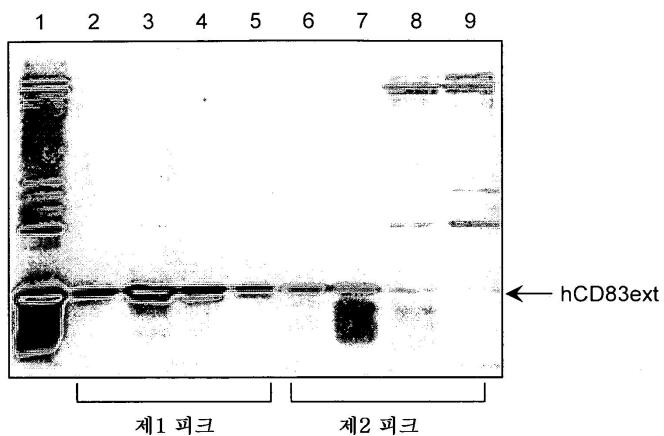
도면3



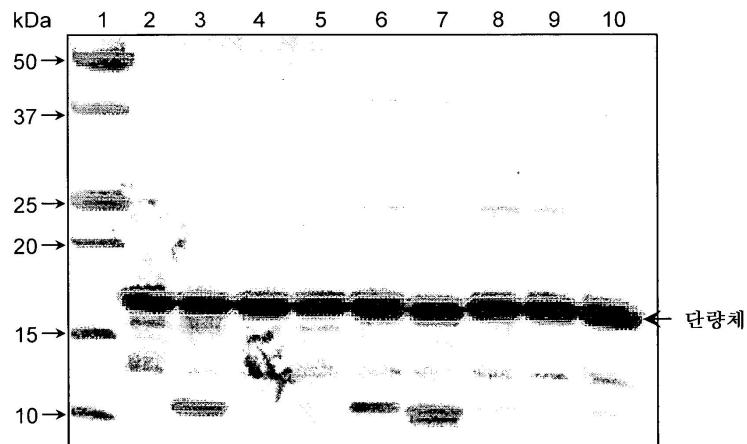
도면4a



도면4b



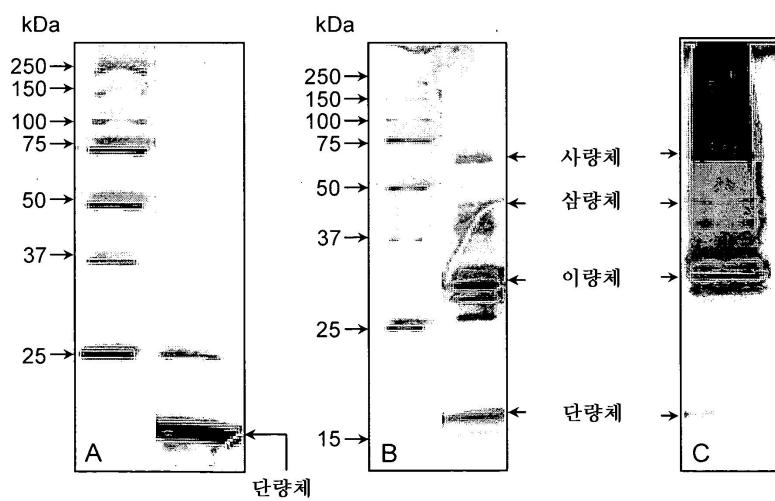
도면5



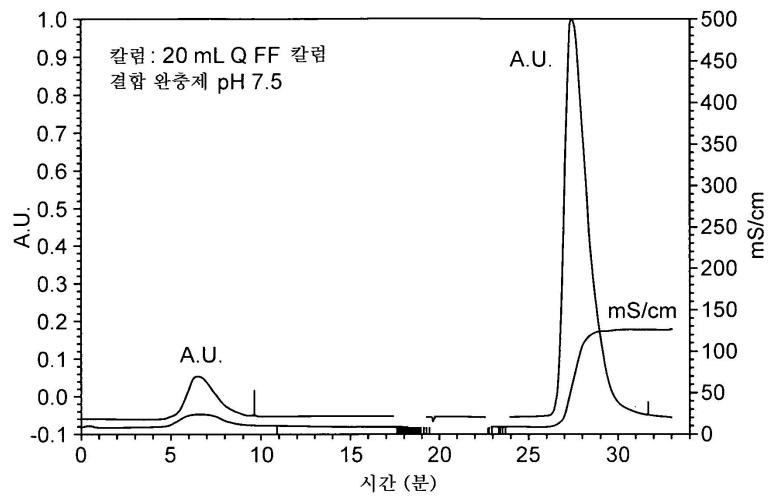
도면6



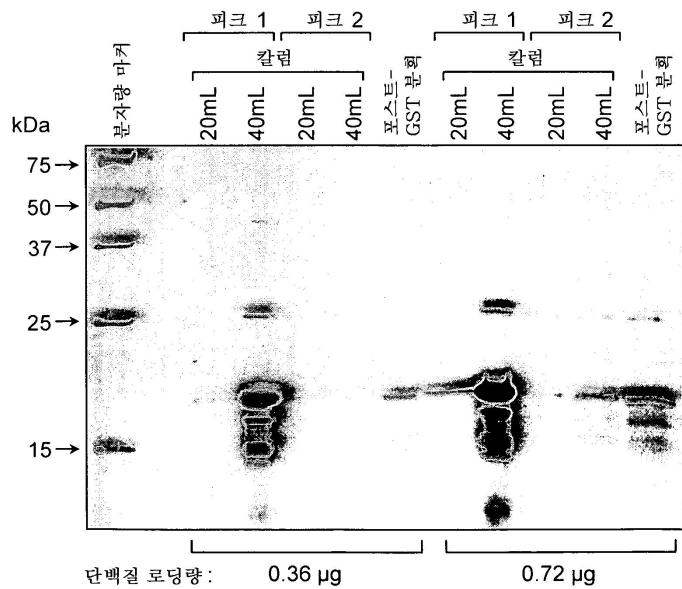
도면7



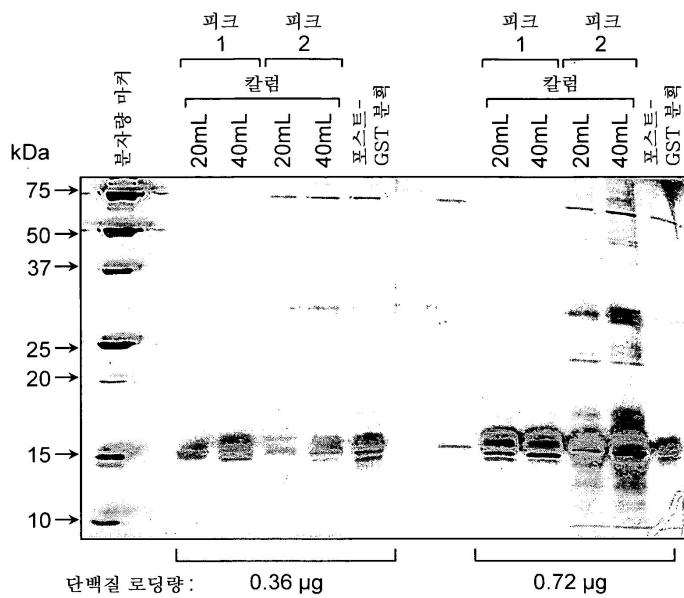
도면8



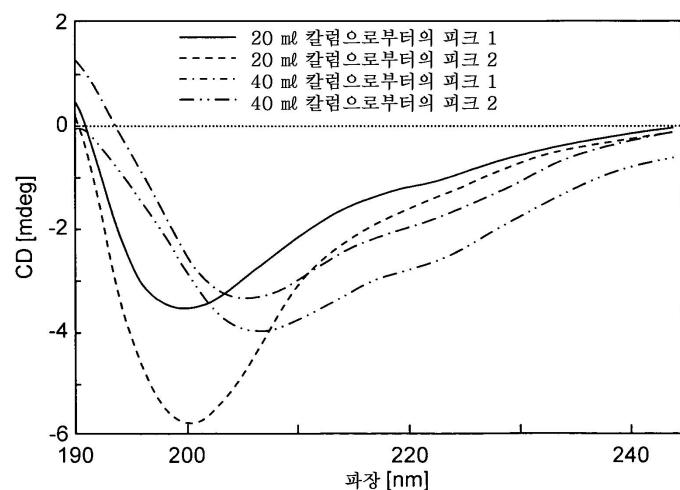
도면9



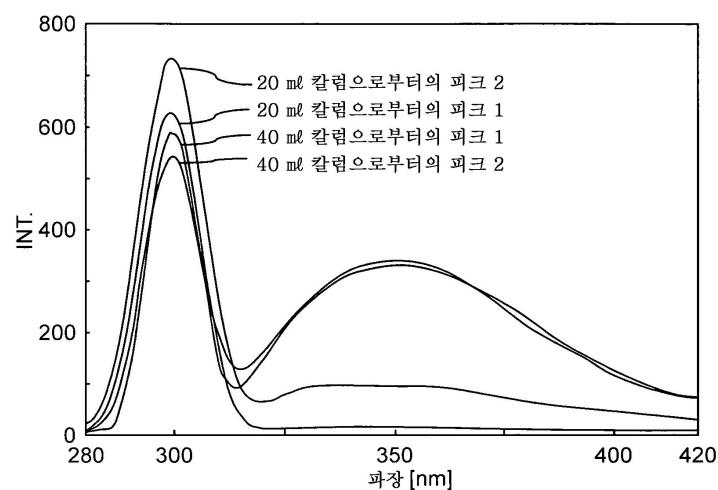
도면10



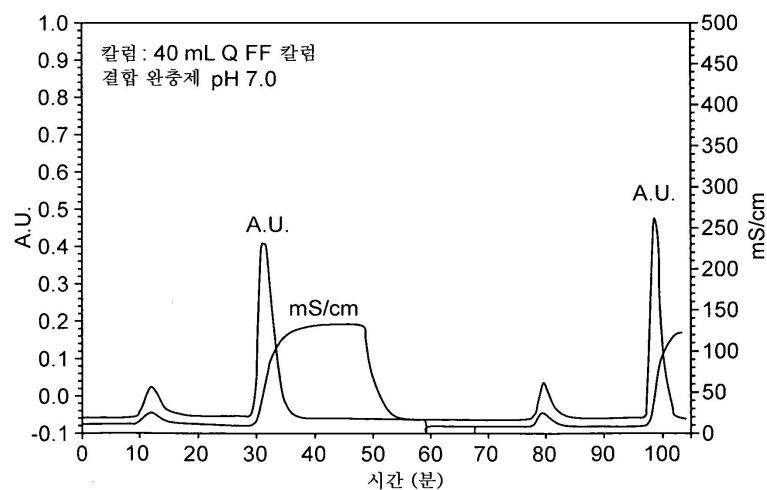
도면11



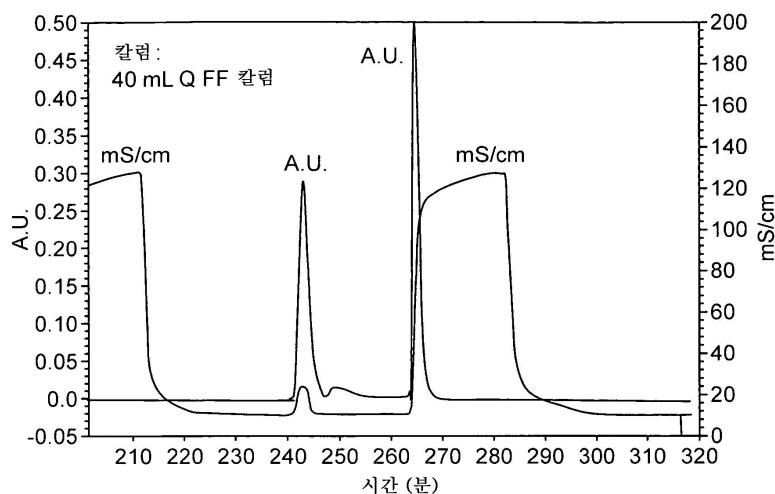
도면12



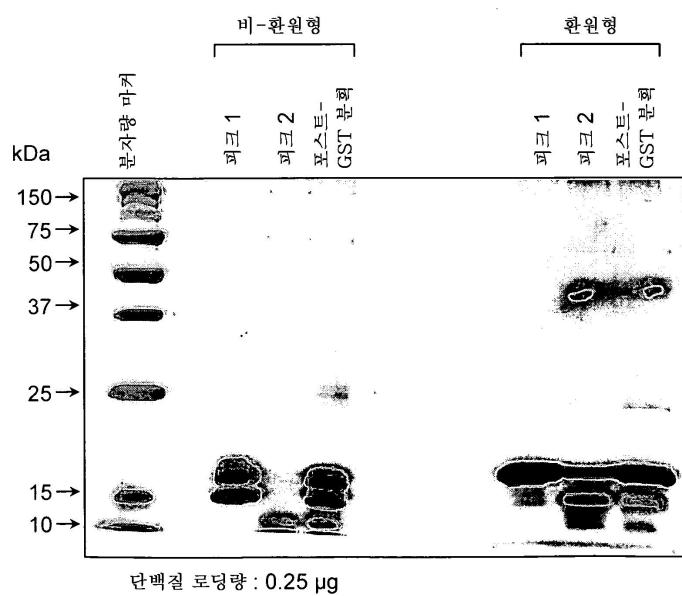
도면13



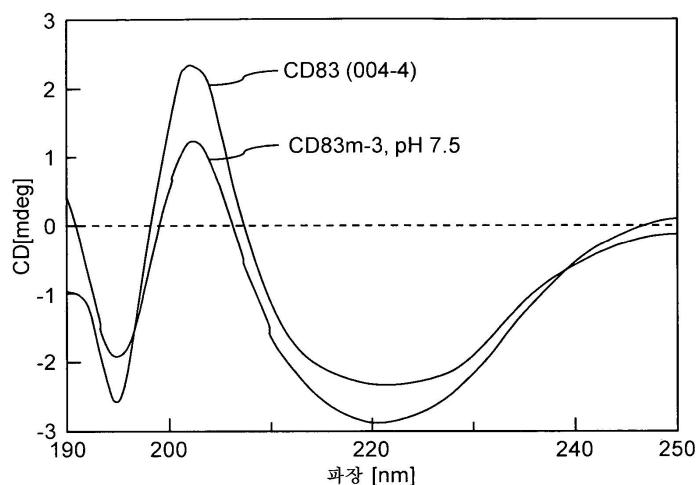
도면14



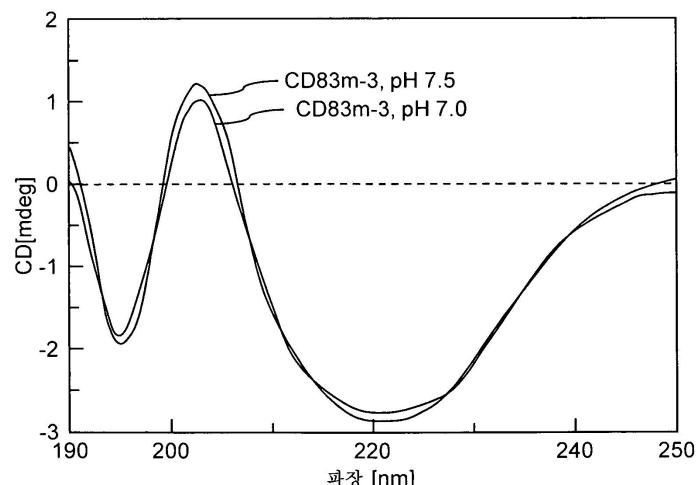
도면15



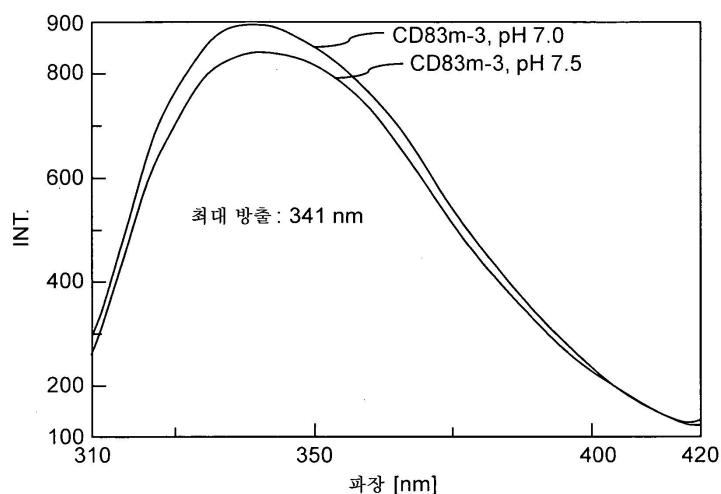
도면16



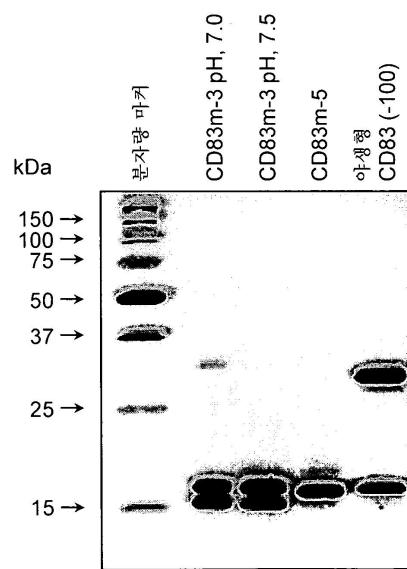
도면17



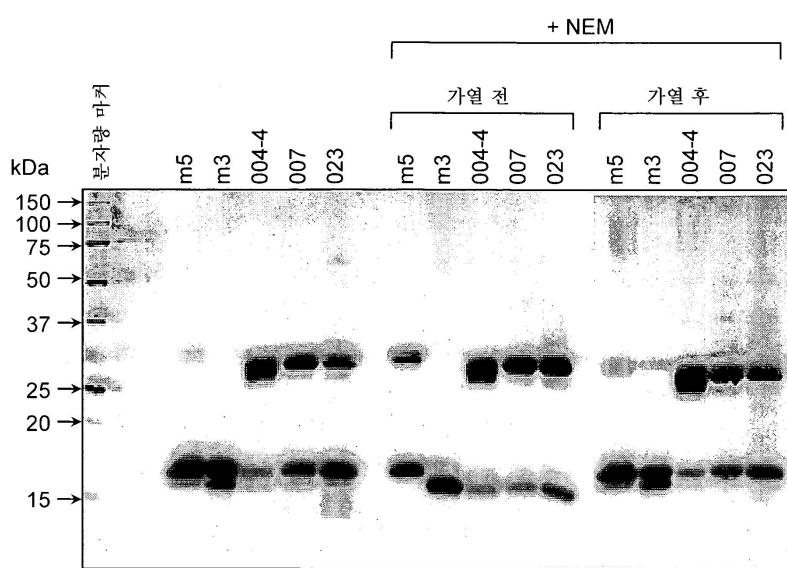
도면18



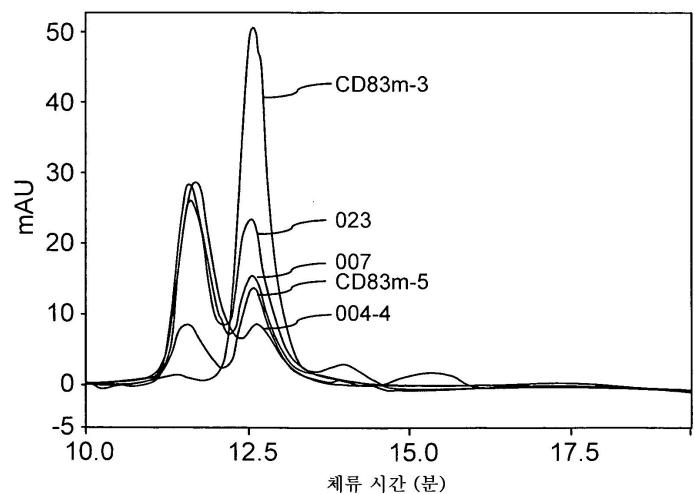
도면19



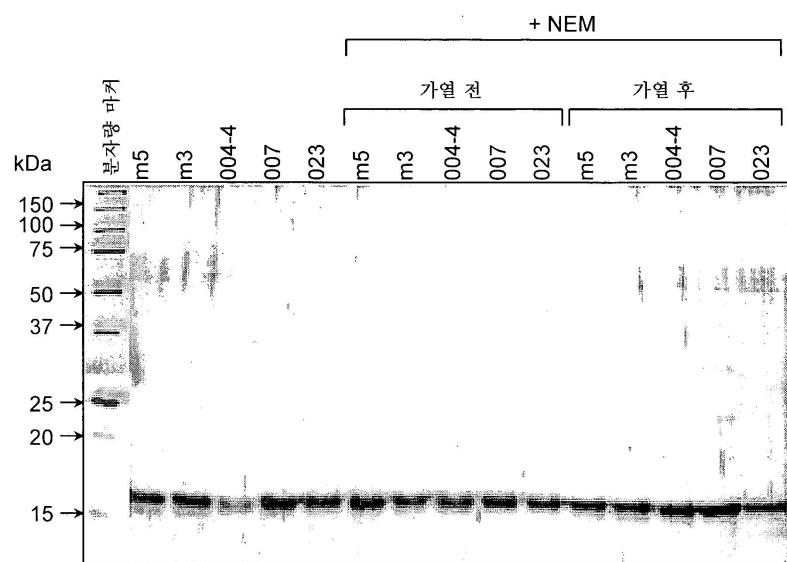
도면20



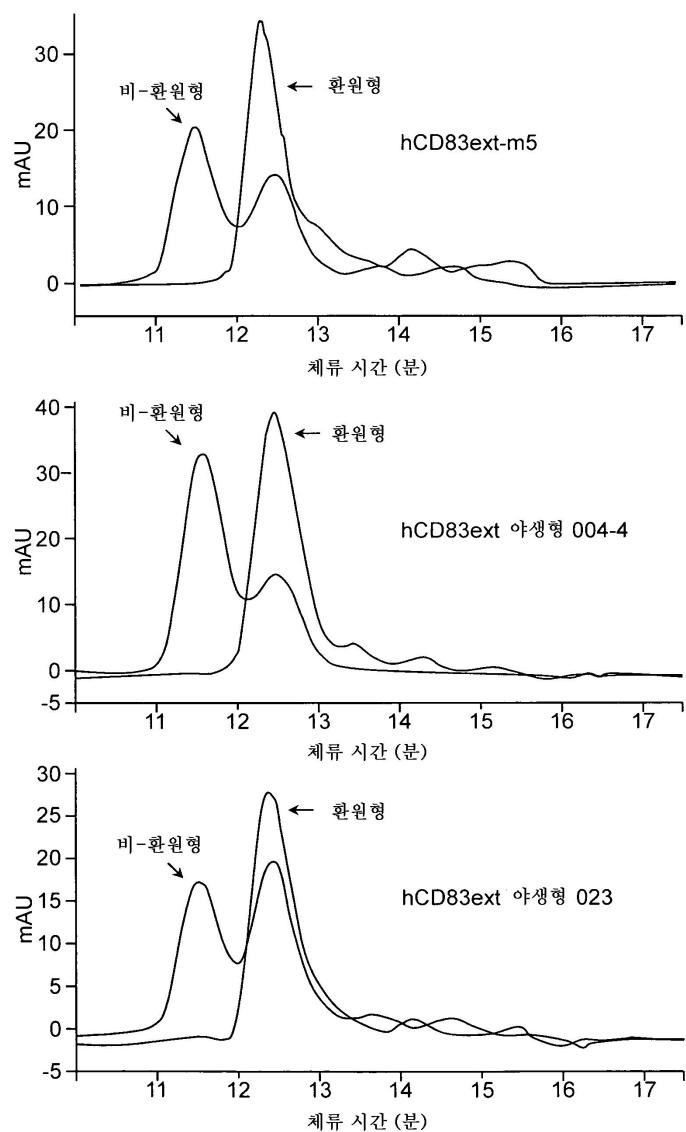
도면21



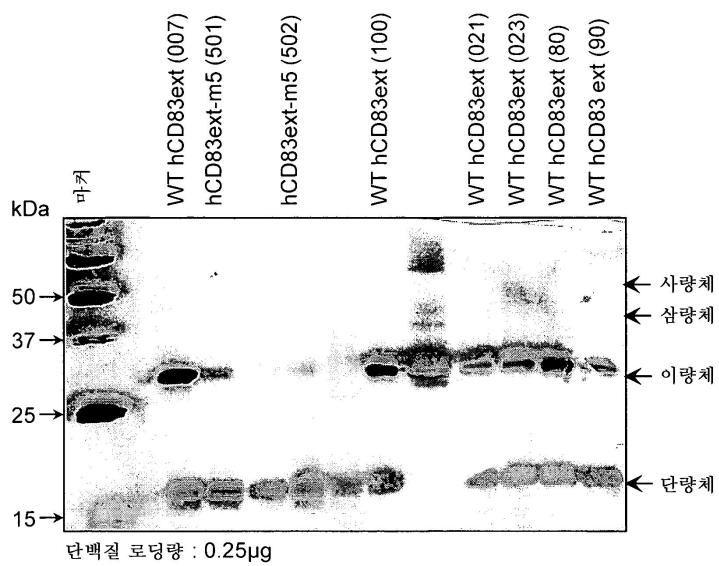
도면22



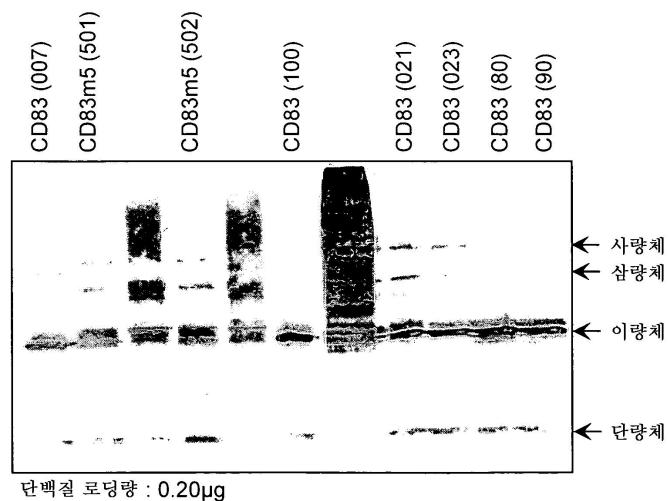
도면23



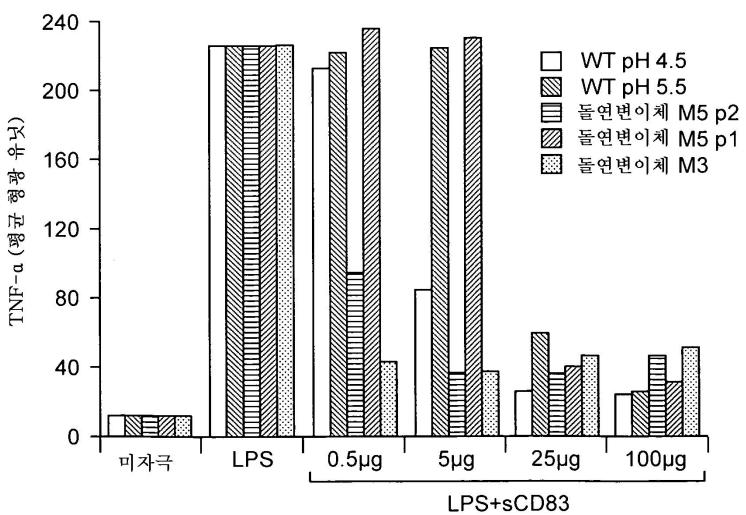
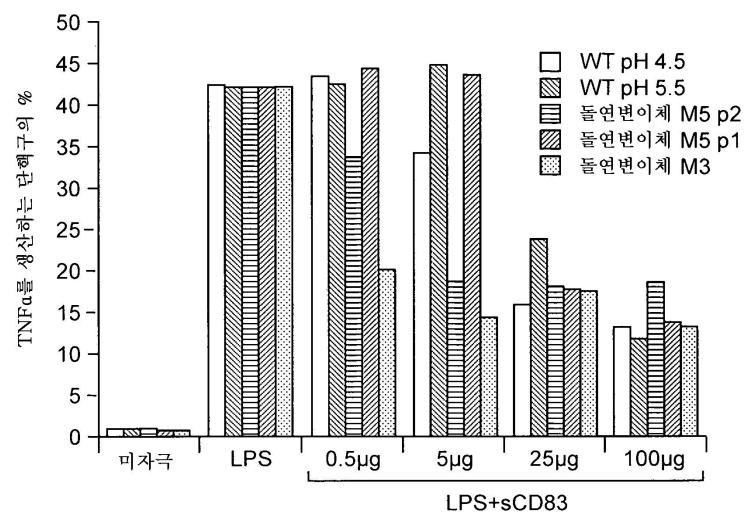
도면24



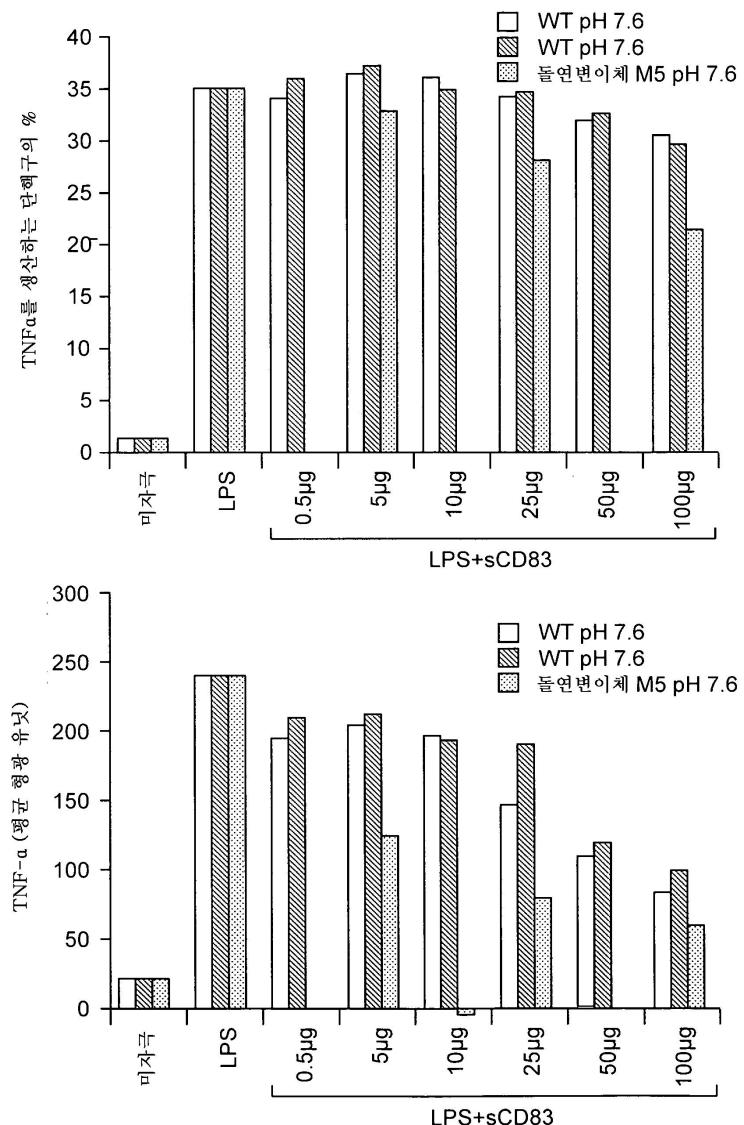
도면25



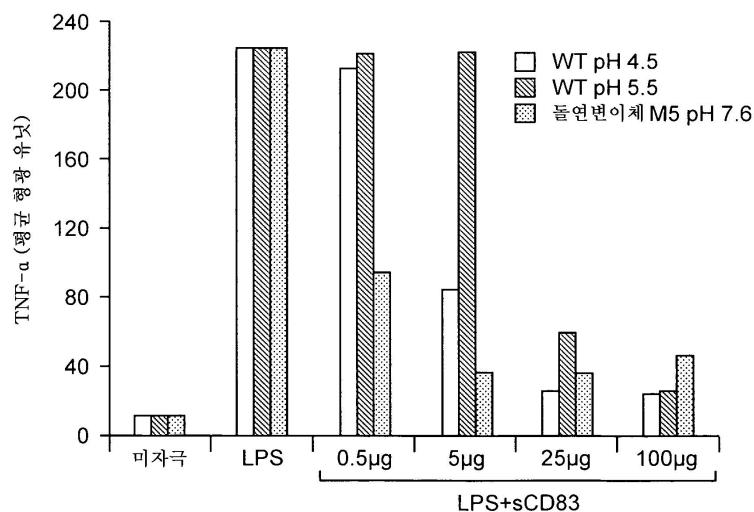
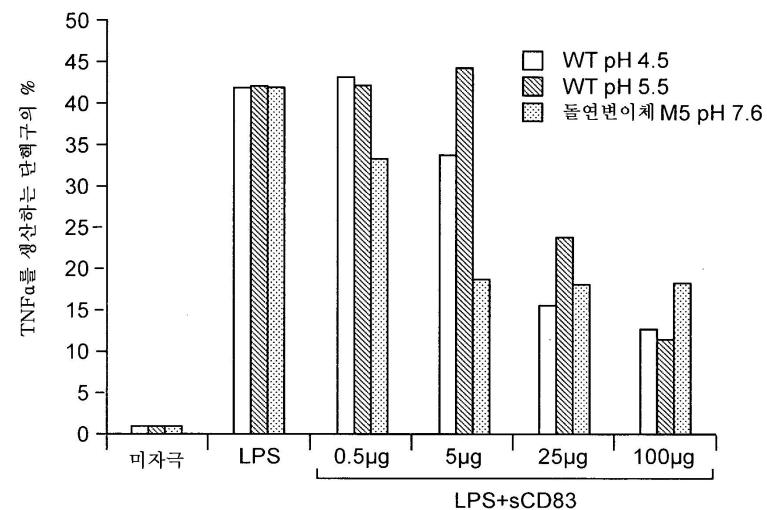
도면26



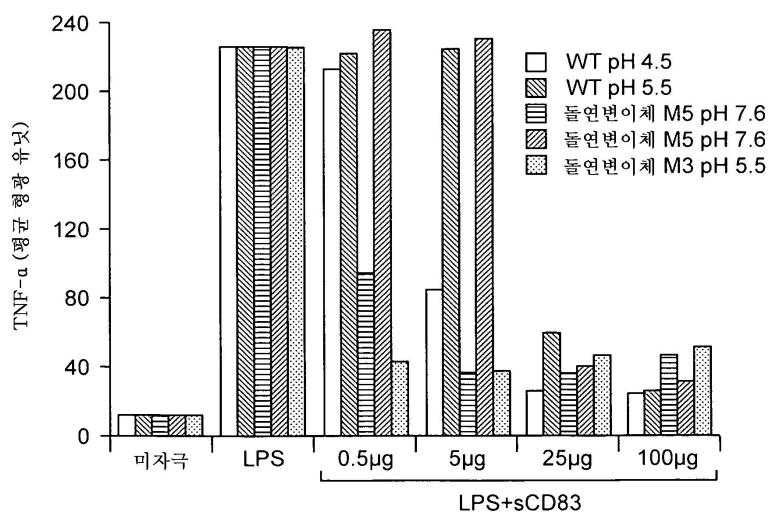
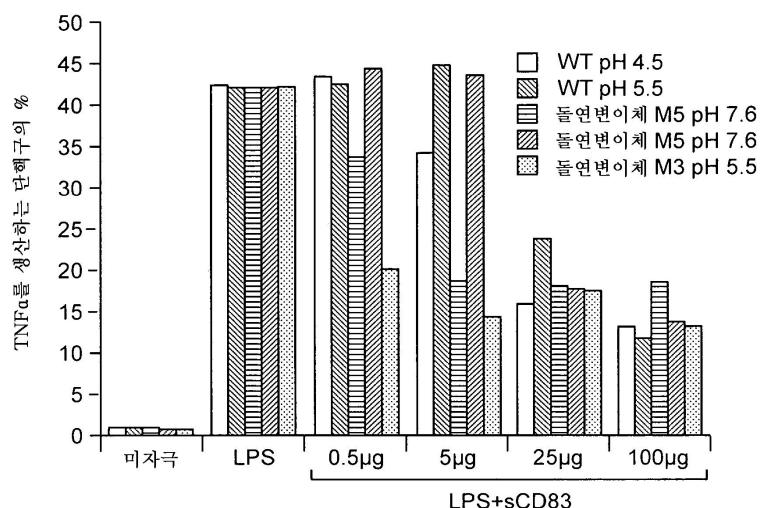
도면27



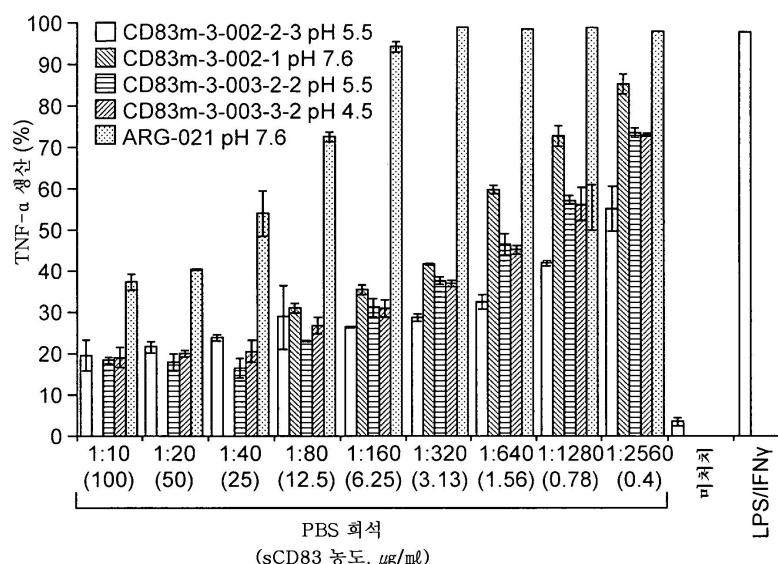
도면28



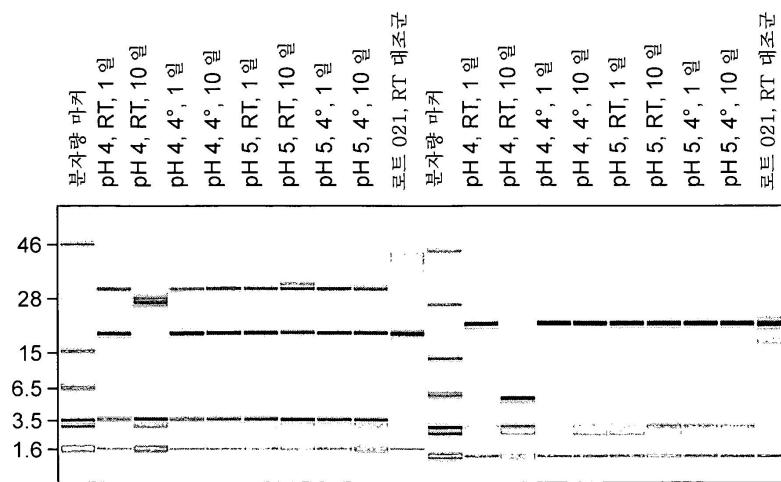
도면29



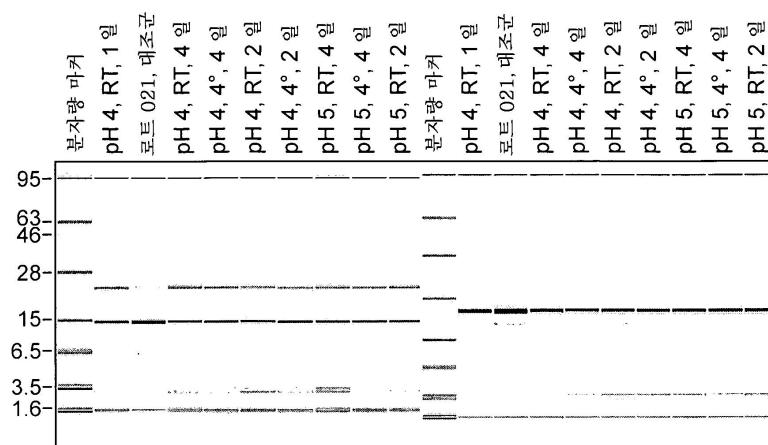
도면30



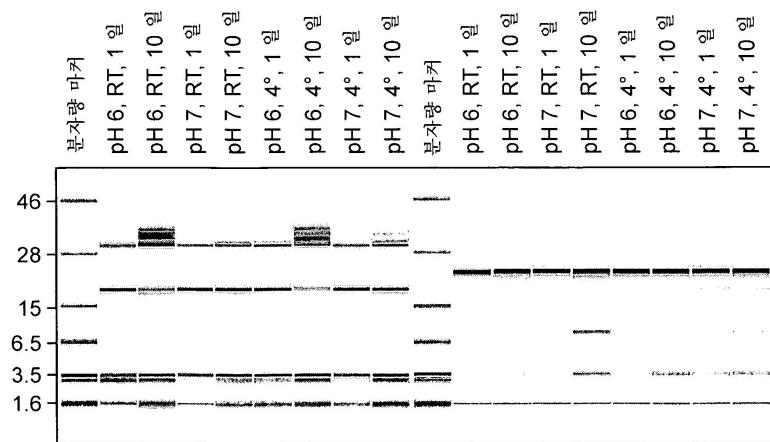
도면31



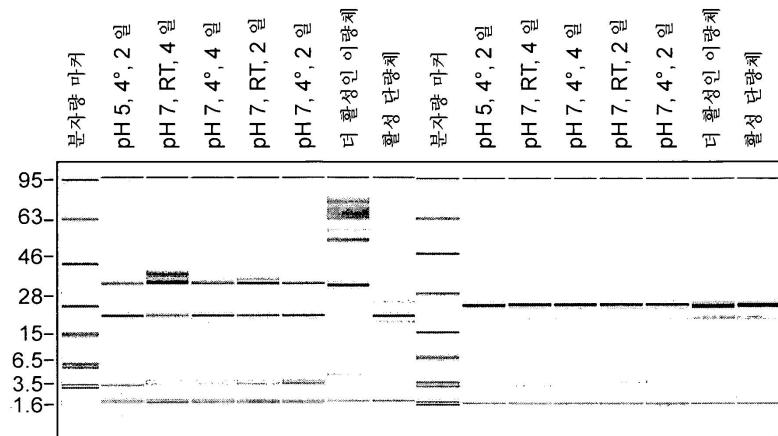
도면32



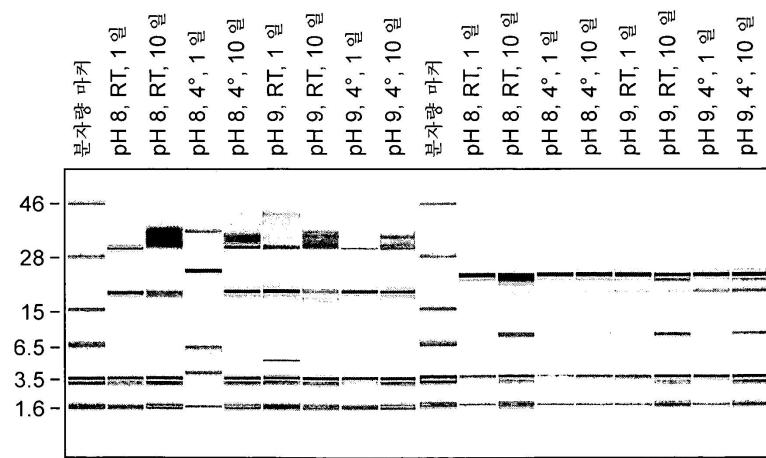
도면33



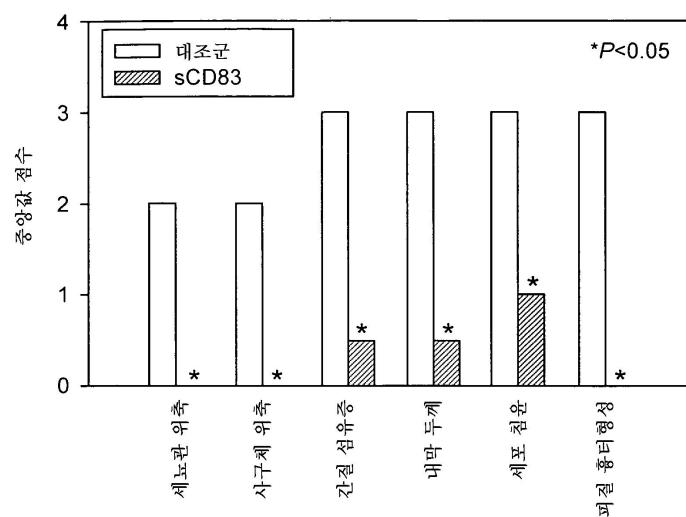
도면34



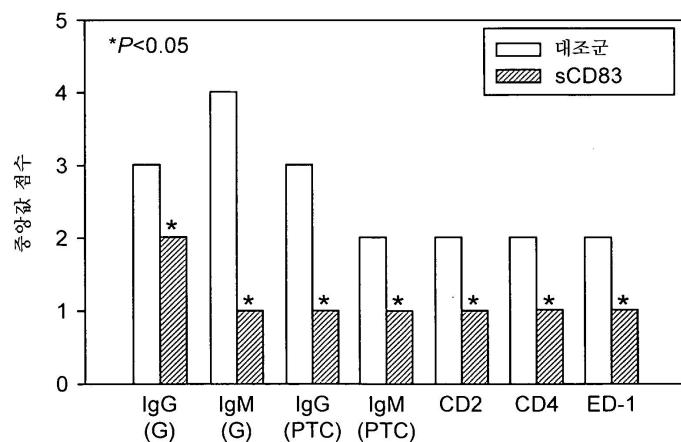
도면35



도면36



도면37



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Argos Therapeutics, Inc.

Brand, Stephen

Chou, Chih-Hsiung

Moo-Young, Murray

<120> NOVEL SOLUBLE CD83 POLYPEPTIDES, FORMULATIONS AND METHODS OF USE

<130> ARG047WO

<150> US 61/128,709

<151> 2008-05-23

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1761

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1761)

<223> Nucleic acid sequence also set forth in GENBANK Accession No.

Z11697

<220><221> CDS

<222> (11)..(628)

<220><221> sig_peptide

<222> (11)..(67)

<400> 1

gaattccgcc atg tcg cgc ggc ctc cag ctt ctg ctc ctg agc tgc gcc 49

Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Ser Cys Ala

1 5 10

tac agc ctg gct ccc gcg acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa 97

Tyr Ser Leu Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu

15 20 25

gat gtg gac ttg ccc tgc acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac 145

Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr

30 35 40 45

acg gtc tcc tgg gtc aag tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag 193

Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu

50 55 60

aca ccc cag gaa gac cac ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg 241

Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly

65 70 75

caa aat ggt tct ttc gac gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag 289

Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys

80 85 90

atc cga aac act acc agc tgc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg 337

Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu

95 100 105

cag gac ccg gat ggg cag aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga 385

Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg

110 115 120 125

gtg aca gga tgc cct gca cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac 433

Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr

130 135 140

aga gcg gag att gtc ctg ctg gct ctg gtt att ttc tac tta aca 481

Arg Ala Glu Ile Val Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr

145	150	155	
ctc atc att ttc act tgt aag ttt gca cg ^g cta cag agt atc ttc cca			529
Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro			
160	165	170	
gat ttt tct aaa gct ggc atg gaa cga gct ttt ctc cca gtt acc tcc			577
Asp Phe Ser Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser			
175	180	185	
cca aat aag cat tta ggg cta gtg act cct cac aag aca gaa ctg gta			625
Pro Asn Lys His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val			
190	195	200	205
tga gcaggatttc tg ^c agg ^t tct tcttc ^t gaa gctgaggctc aggggtgtgc			678
ctgtctgtta cactggagga gagaagaatg agcctacgct gaagatggca tcctgtgaag			
tccttcac ^t cactgaaaac atctggaagg ggatcccacc ccatttctg tggcaggcc			798
tcgaaaacca tcacatgacc acatagcatg aggccactgc tg ^t tc ^t cca tggcac ^t t			
ttcagcgatg tatgcagcta tctggtaac ctc ^t ggaca tttttc ^t gt catataaaag			
ctatggtgag atgcagctgg aaaagggtct tggaaat ^t at gaatgc ^{ccc} agctggcccg			
tgacagactc ctgaggacag ctgc ^t ctt ctgc ^t ctt gggacatctc tttgaat ^t tt			
ctgtgttttgc ctgtaccagc ccagatgttt tacgtctgg agaaat ^t gac agatcaagct			
gtgagacagt gggaaatatt tagcaaataa ttcc ^t gg ^t tgaagg ^t c ^t gctattacta			
aggagtaatc t ^t gttacaaa gaaataacaa gtcgatgaac tattccccag cagg ^t ctt			1218
tcatctgg ^t aagacatcca taaagaagca ataaagaaga gtgccacatt tattttata			
tctatatgta ctgtcaaag aagg ^t ttgt ^t ttttctg ^t tttgaaatct gtatctgt ^t g			
tgagatagca ttgt ^t gactg acaggcagcc tggacataga gagggagaag aagt ^t cagaga			
gggtgacaag atagagagct attaatggc cggctggaaa tg ^t gggctg acgg ^t gcagt			
ctgggtgctc gtcc ^t cttgc ^t cccactatct gggtgc ^t atga tcttgagcaa gttc ^t ctg			
gtgtctgctt tctccattgt aaaccacaag gctgttgc ^t at gggctaatga agatcatata			
cgtgaaaatt ctgt ^t aaaac atataaagca ctatacagat tcgaaactcc attgagtcat			1638
tatcc ^t tgct atgatgatgg tg ^t tttgggg atgagaggt gctatccatt tctcatgttt			
tccattgttt gaaacaaaga aggttaccaa gaagc ^t ttc ctgt ^t gc ^t tt ctgttaggaat			
tcc			1761

<211> 205

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp

20 25 30

Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser

35 40 45

Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln

50 55 60

Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly

65 70 75 80

Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn

85 90 95

Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro

100 105 110

Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly

115 120 125

Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu

130 135 140

Ile Val Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile

145 150 155 160

Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser

165 170 175

Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys

180 185 190

His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val

195 200 205

<210> 3

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(375)

<223> Nucleic acid sequence encoding extracellular domain of human CD83

<400> 3

acgcggagg tgaagggtggc ttgctccgaa gatgtggact tgccctgcac cgcccccgtgg	60
gatccgcagg ttccctacac ggtctcctgg gtcaagttat tggaggggtgg tgaagagagg	120
atggagacac cccaggaaga ccacctcagg ggacagcact atcatcagaa gggccaaat	180
ggttcttcg acgccccaa taaaaaggccc tattccctga agatccgaaa cactaccagc	240
tgcaactcgg ggacatacag gtgcactctg caggaccgg atggcagag aaacctaagt	300
ggcaagggtga tcttgagagt gacaggatgc cctgcacagc gtaaagaaga gactttaag	360

aaatacagag cgtag	375
------------------	-----

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(125)

<223> Extracellular domain of human CD83

<400> 4

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95
 Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala

100 105 110
 Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu

115 120 125
 <210> 5
 <211> 130

<212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic extracellular domain of human CD83 with the addition of
 Gly-Ser-Pro-Gly at the N-terminus and Ile at the C-terminus

<400> 5
 Gly Ser Pro Gly Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val

1 5 10 15

Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val

20 25 30

Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro

35 40 45

Gln Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn

50 55 60

Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg

65 70 75 80

Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp

85 90 95

Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr

100 105 110

Gly Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala

115 120 125

Glu Ile

130

<210> 6

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic extracellular domain of human CD83 with the addition of

Gly-Ser-Pro-Gly and the N-terminus and Ile at the C-terminus,
 with Cys to Ser (C2S) mutation at position 114

<400> 6

Gly Ser Pro Gly Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val

1 5 10 15

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

Glu Ile

130

<210> 7

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic extracellular domain of human CD83 with the addition of

Gly-Ser-Pro-Gly and the N-terminus and Ile at the C-terminus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be any amino acid residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa can be any amino acid residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (85)..(85)

<223> Xaa can be any amino acid residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (92)..(92)

<223> Xaa can be any amino acid residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (114)..(114)

<223> Xaa can be any amino acid residue

<400> 7

Gly Ser Pro Gly Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Xaa Ser Glu Asp Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Leu Pro Xaa Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val

20	25	30
----	----	----

Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro

35	40	45
----	----	----

Gln Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn

50	55	60
----	----	----

Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg

65	70	75	80
----	----	----	----

Asn Thr Thr Ser Xaa Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Xaa Thr Leu Gln Asp

85	90	95
----	----	----

Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Xaa Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala

115	120	125
-----	-----	-----

Glu Ile

130

<210> 8

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic GST-hCD83ext fusion protein

<400> 8

Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Thr Pro Glu

1 5 10 15

Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro

20 25 30

Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu

35 40 45

Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly

50 55 60

Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn

65 70 75 80

Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser

85 90 95

Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu

100 105 110

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

115 120 125

Glu Glu Thr Phe Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

130 135

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(126)

<223> Extracellular domain of human CD83 plus 1st Ile from
transmembrane domain

<400> 9

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

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

100 105 110

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 10

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m5

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 10

acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc tgc 48

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag 96

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac 144

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac 192

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acc agc 240

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

tgc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag 288

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tcc cct gca 336

Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala

100 105 110

cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga 381

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 11

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser
 65 70 75 80
 Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln
 85 90 95
 Arg Asn Leu Ser Gly Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala

100 105 110
 Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 12

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m2

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 12

acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc agt 48
 Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Ser

1 5 10 15

act gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag 96
 Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac 144
 Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac 192
 Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acc agc 240
 Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

tgc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag 288

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tgc cct gca 336

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

100 105 110

cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga 381

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 13

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Ser

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

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

100 105 110

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 14
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m3
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(381)
 <400> 14

acg	ccg	gag	gtg	aag	gtg	gct	tgc	tcc	gaa	gat	gtg	gac	ttg	ccc	tgc	48
Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Val	Ala	Cys	Ser	Glu	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Cys	
1	5		10		15											
acc	gcc	ccc	tgg	gat	ccg	cag	gtt	ccc	tac	acg	gtc	tcc	tgg	gtc	aag	96
Thr	Ala	Pro	Trp	Asp	Pro	Gln	Val	Pro	Tyr	Thr	Val	Ser	Trp	Val	Lys	
20		25		30												
tta	ttg	gag	ggt	ggt	gaa	gag	agg	atg	gag	aca	ccc	cag	gaa	gac	cac	144
Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	Glu	Glu	Arg	Met	Glu	Thr	Pro	Gln	Glu	Asp	His	
35		40		45												
ctc	agg	gga	cag	cac	tat	cat	cag	aag	ggg	caa	aat	ggt	tct	ttc	gac	192
Leu	Arg	Gly	Gln	His	Tyr	His	Gln	Lys	Gly	Gln	Asn	Gly	Ser	Phe	Asp	
50		55		60												
gcc	ccc	aat	gaa	agg	ccc	tat	tcc	ctg	aag	atc	cga	aac	act	acg	agc	240
Ala	Pro	Asn	Glu	Arg	Pro	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Arg	Asn	Thr	Thr	Ser	
65		70		75		80										
tcc	aac	tcg	ggg	aca	tac	agg	tgc	act	ctg	cag	gac	ccg	gat	ggg	cag	288
Ser	Asn	Ser	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Thr	Leu	Gln	Asp	Pro	Gly	Gln		
85		90		95												
aga	aac	cta	agt	ggc	aag	gtg	atc	ttg	aga	gtg	aca	gga	tgc	cct	gca	336
Arg	Asn	Leu	Ser	Gly	Lys	Val	Ile	Leu	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Ala	
100		105		110												
cag	cgt	aaa	gaa	gag	act	ttt	aag	aaa	tac	aga	gcg	gag	att	tga	381	
Gln	Arg	Lys	Glu	Glu	Thr	Phe	Lys	Lys	Tyr	Arg	Ala	Glu	Ile			

115	120	125	
<210> 15			
<211> 126			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> Synthetic Construct			
<400> 15			
Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys			
1	5	10	15
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys			
20	25	30	
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His			
35	40	45	
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp			
50	55	60	
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser			
65	70	75	80
Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln			
85	90	95	
Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala			
100	105	110	
Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile			
115	120	125	
<210> 16			
<211> 381			
<212> DNA			
<213> Artificial sequence			
<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m4			
<220><221> CDS			
<222> (1)..(381)			
<400> 16			

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag 96

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac 144

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac 192

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acc agc 240

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

tgc aac tcg ggg aca tac agg agt act ctg cag gac ccg gat ggg cag 288

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tgc cct gca 336

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

100 105 110

cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga 381

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 17

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

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

100 105 110

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 18

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m2,3

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 18

acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc agt 48

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Ser

1 5 10 15

act gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag 96

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac 144

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac	192
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp	
50 55 60	
gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acg agc	240
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser	
65 70 75 80	
tcc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag	288
Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln	
85 90 95	
aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tgc cct gca	336
Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala	
100 105 110	
cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga	381
Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Tyr Arg Ala Glu Ile	
115 120 125	
<210> 19	
<211> 126	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 19	
Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Ser	
1 5 10 15	
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys	
20 25 30	
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His	
35 40 45	
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp	
50 55 60	
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser	
65 70 75 80	
Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln	

85 90 95
 Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala

100 105 110
 Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125
 <210> 20
 <211> 381

<212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m3,4

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 20

acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc tgc 48
 Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15
 acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag 96
 Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30
 tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac 144
 Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His
 35 40 45

ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac 192
 Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60
 gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acg agc 240
 Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser
 65 70 75 80
 tcc aac tcg ggg aca tac agg agt act ctg cag gac ccg gat ggg cag 288

Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln
 85 90 95

aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tgc cct gca 336
 Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala
 100 105 110
 cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga 381
 Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
 115 120 125
 <210> 21
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 21
 Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys
 1 5 10 15
 Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys
 20 25 30
 Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His
 35 40 45
 Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp
 50 55 60
 Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser
 65 70 75 80
 Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln
 85 90 95
 Arg Asn Leu Ser Gly Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala
 100 105 110
 Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
 115 120 125
 <210> 22
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m2,5

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 22

acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc agt 48

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Ser

1 5 10 15

act gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag 96

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac 144

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac 192

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acc agc 240

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

tgc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag 288

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tcc cct gca 336

Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala

100 105 110

cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga 381

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 23

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Ser

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala

100 105 110

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 24

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m3,5

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 24

acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc tgc 48

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag 96

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20	25	30	144
tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac			
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His			
35	40	45	
ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac	192		
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp			
50	55	60	
gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acg agc	240		
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser			
65	70	75	80
tcc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag	288		
Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln			
85	90	95	
aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tcc cct gca	336		
Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala			
100	105	110	
cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga	381		
Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile			
115	120	125	
<210> 25			
<211> 126			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> Synthetic Construct			
<400> 25			
Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys			
1	5	10	15
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys			
20	25	30	
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His			

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp
 50 55 60
 Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser
 65 70 75 80
 Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln
 85 90 95
 Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala

100 105 110
 Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
 115 120 125

<210> 26

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m4,5

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 26

acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc tgc 48
 Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15
 acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag 96
 Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys
 20 25 30
 tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac 144
 Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His
 35 40 45

ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac 192
 Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp
 50 55 60
 gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acc agc 240
 Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65	70	75	80	
tgc aac tcg ggg aca tac agg agt act ctg cag gac ccg gat ggg cag				288
Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln				
85	90	95		
aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tcc cct gca				336
Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala				
100	105	110		
cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga				381
Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile				
115	120	125		
<210> 27				
<211> 126				
<212> PRT				
<213> Artificial sequence				
<220><223> Synthetic Construct				
<400> 27				
Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys				
1	5	10	15	
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys				
20	25	30		
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His				
35	40	45		
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp				
50	55	60		
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser				
65	70	75	80	
Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln				
85	90	95		
Arg Asn Leu Ser Gly Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala				
100	105	110		
Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile				

115	120	125		
<210> 28				
<211> 381				
<212> DNA				
<213> Artificial sequence				
<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m2,3,5				
<220><221> CDS				
<222> (1)..(381)				
<400> 28				
acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc aag			48	
Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Ser				
1	5	10	15	
act gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag				96
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys				
20	25	30		
tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac				144
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His				
35	40	45		
ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac				192
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp				
50	55	60		
gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acg agc				240
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser				
65	70	75	80	
tcc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag				288
Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln				
85	90	95		
aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tcc cct gca				336
Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala				
100	105	110		
cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga				381

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 29

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Ser

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala

100 105 110

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile

115 120 125

<210> 30

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide encoding hCD83ext-m3,4,5

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 30

acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc tgc	48
Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys	
1 5 10 15	
acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag	96
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys	
20 25 30	
tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac	144
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His	
35 40 45	
ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac	192
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp	
50 55 60	
gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acg agc	240
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser	
65 70 75 80	
tcc aac tcg ggg aca tac agg agt act ctg cag gac ccg gat ggg cag	288
Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln	
85 90 95	
aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tcc cct gca	336
Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala	
100 105 110	
cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tga	381
Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile	
115 120 125	
<210> 31	
<211> 126	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 31	
Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys	

1	5	10	15
Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys			
20	25	30	
Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His			
35	40	45	
Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp			
50	55	60	
Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser			
65	70	75	80
Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln			
85	90	95	
Arg Asn Leu Ser Gly Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala			
100	105	110	
Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Tyr Arg Ala Glu Ile			
115	120	125	
<210> 32			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Artificial sequence			
<220><223> Synthetic primer			
<400> 32			
gtggacttgc ccagtactgc cccctggat			30
<210> 33			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Artificial sequence			
<220><223> Synthetic primer			
<400> 33			
atccgaaaca ctacgagctc caactcgagg			30
<210> 34			
<211> 30			
<212> DNA			

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 34

gggacataca ggagtactt gcaggacccg 30

<210> 35

<211> 205

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 35

Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp

20 25 30

Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser

35 40 45

Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln

50 55 60

Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly

65 70 75 80

Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn

85 90 95

Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro

100 105 110

Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Val Ile Leu Arg Val Thr Gly

115 120 125

Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu

130 135 140

Ile Val Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile

145 150 155 160

Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser

165 170 175

Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys

180	185	190
His Leu Gly Pro Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val		
195	200	205
<210> 36		
<211> 196		
<212> PRT		
<213> Canis lupus familiaris		
<400> 36		
Met Ser Arg Gly Leu Arg Leu Leu Leu Ser Cys Ala Cys Ser Leu		
1	5	10
Ala Pro Ala Ala Arg Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Ala Val Asp		
20	25	30
Leu Pro Cys Ala Val Arg Arg Glu Pro Arg Gly Pro Tyr Asp Val Ser		
35	40	45
Trp Ala Lys Leu Thr Glu Gly Glu Glu Lys Ile Glu Glu Leu Arg		
50	55	60
Asp Gly Leu His Ser Gln Lys Glu Gly Ser Leu Ala Ala Pro Glu Glu		
65	70	75
Arg Leu His Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Thr Ser Asp Ser Gly Thr		
85	90	95
Tyr Arg Cys Thr Val Glu Glu Leu Asp Gly Gln Arg Asn Gln Ser Gly		
100	105	110
Thr Val Thr Leu Lys Val Thr Gly Cys Pro Lys Glu Arg Lys Glu Thr		
115	120	125
Phe Gln Lys Tyr Arg Ala Glu Ile Val Leu Leu Ala Leu Val Val		
130	135	140
Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Gln Gln Gln		
145	150	155
Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser Lys Pro Arg Met Glu Arg Ala Phe Leu		
165	170	175
Pro Val Thr Ser Pro His Lys His Leu Glu Ser Val Thr Phe His Lys		
180	185	190

Thr Glu Val Val

195

<210> 37

<211> 199

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 37

Met Ser Arg Glu Leu Gln Leu Leu Leu Ser Cys Ala Cys Ser Leu

1 5 10 15

Ala Pro Ala Thr Gln Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp

20 25 30

Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Leu Val Thr Tyr Thr Val Ser

35 40 45

Trp Ala Lys Leu Thr Asp Gly Gly Ala Glu Arg Val Glu Val Thr Gln

50 55 60

Glu Asp Leu Gln Ser Pro Gln Gln Arg Asn Ser Ser Glu Ala Pro Arg

65 70 75 80

Glu Arg Leu Tyr Ser Leu Arg Ile Gln Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser

85 90 95

Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Val Gly Gln Glu Gly Gln Arg Asn Leu

100 105 110

Thr Gly Thr Val Ile Leu Lys Val Thr Gly Cys Phe Lys Gly His Arg

115 120 125

Gly Glu Thr Phe Lys Asn Tyr Arg Ala Glu Ile Val Leu Leu Ala

130 135 140

Leu Val Ile Phe Tyr Val Thr Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys His Leu Glu Pro Val Thr

180 185 190

Leu His Lys Thr Glu Leu Val

195

<210> 38

<211> 196

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 38

Met Ser Gln Gly Leu Gln Leu Leu Phe Leu Gly Cys Ala Cys Ser Leu

1 5 10 15

Ala Pro Ala Met Ala Met Arg Glu Val Thr Val Ala Cys Ser Glu Thr

20 25 30

Ala Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Leu Ser Tyr Ala

35 40 45

Val Ser Trp Ala Lys Val Ser Glu Ser Gly Thr Glu Ser Val Glu Leu

50 55 60

Pro Glu Ser Lys Gln Asn Ser Ser Phe Glu Ala Pro Arg Arg Arg Ala

65 70 75 80

Tyr Ser Leu Thr Ile Gln Asn Thr Thr Ile Cys Ser Ser Gly Thr Tyr

85 90 95

Arg Cys Ala Leu Gln Glu Leu Gly Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Thr

100 105 110

Val Val Leu Lys Val Thr Gly Cys Pro Lys Glu Ala Thr Glu Ser Thr

115 120 125

Phe Arg Lys Tyr Arg Ala Glu Ala Val Leu Leu Phe Ser Leu Val Val

130 135 140

Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln

145 150 155 160

Ser Ile Phe Pro Asp Ile Ser Lys Pro Gly Thr Glu Gln Ala Phe Leu

165 170 175

Pro Val Thr Ser Pro Ser Lys His Leu Gly Pro Val Thr Leu Pro Lys

180 185 190

Thr Glu Thr Val

195

<210> 39

<211> 196

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 39

Met Ser Gln Gly Leu Gln Leu Leu Leu Gly Cys Ala Cys Ser Leu

1 5 10 15

Ala Pro Ala Leu Ala Met Arg Glu Val Thr Val Ala Cys Ser Glu Thr

20 25 30

Ala Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Leu Ser Tyr Thr

35 40 45

Val Ser Trp Ala Lys Val Ser Glu Ser Gly Asn Glu Arg Leu Glu Leu

50 55 60

Pro Glu Ser Lys Gln Asn Ser Ser Val Glu Ala Pro Lys Lys Arg Pro

65 70 75 80

Tyr Ser Leu Thr Ile Gln Asn Thr Thr Ile Cys Ser Ala Gly Thr Tyr

85 90 95

Arg Cys Ala Leu Gln Glu Leu Gly Gly Gln Arg Asn Phe Ser Gly Thr

100 105 110

Val Val Leu Lys Val Thr Gly Cys Pro Lys Glu Ala Thr Glu Ser Thr

115 120 125

Phe Arg Lys Tyr Arg Ala Glu Ala Val Leu Phe Ser Leu Val Val

130 135 140

Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln

145 150 155 160

Ser Ile Phe Pro Asp Ile Ser Lys Pro Gly Thr Glu Gln Ala Phe Leu

165 170 175

Pro Val Thr Ser Pro Ser Lys His Leu Gly Pro Val Thr Leu Pro Lys

180 185 190

Thr Glu Thr Val

195

<210> 40

<211> 215

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 40

Met Ala Ser Ala Ala Tyr Thr Leu Leu Phe Thr Leu Cys Asn Val Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Phe Glu Glu Ala Leu Leu Ser Cys Lys Val Leu Gln Asp Ser Ser

35 40 45

Ile Ala Tyr Gln Ala Val Ser Trp His Lys Met Ala Gly Val Gly Asp

50 55 60

Arg Ile Ala Trp Lys Val Leu Asp Val Glu Ser Arg His Pro Lys Gly

65 70 75 80

Leu Gly Gly Ser Leu Glu Leu Ser Asn Thr Thr Phe Gln Leu Arg Ile

85 90 95

Arg Asn Ala Thr Ser Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Lys Cys Ala Leu Gly

100 105 110

Glu Gln Arg Gly Asp His Asn Leu Ser Gly Ile Ile Thr Leu Lys Val

115 120 125

Thr Gly Cys Pro Arg Ile Glu Asp Glu Lys Leu Lys Tyr Lys Thr

130 135 140

Glu Leu Phe Met Leu Thr Cys Leu Gly Ile Phe Tyr Leu Leu Ile

145 150 155 160

Phe Phe Thr Cys Thr Cys Leu Arg Lys Glu Ser Met Ser Pro Ser Asp

165 170 175

Lys Ser Arg Arg Asp Ser Lys Arg Thr Leu Thr Leu Ile Asn Ala His

180 185 190

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

195 200 205

Gly Leu Thr Ser Ser Ser Ile

210

215

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 41

Gly Ser Pro Gly

1