



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098678
(43) 공개일자 2008년11월11일

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7023697(분할)

(22) 출원일자 2008년09월26일

심사청구일자 2008년10월21일

(62) 원출원 특허 10-2007-7020353

원출원일자 2007년09월06일

심사청구일자 2007년10월08일

번역문제출일자 2008년09월26일

(86) 국제출원번호 PCT/NL2000/000253

국제출원일자 2000년04월19일

(87) 국제공개번호 WO 2000/63251

국제공개일자 2000년10월26일

(30) 우선권주장

60/176,924 2000년01월20일 미국(US)

99201204.7 1999년04월19일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

카트호리이케 유니버시테이트 니지메겐
네덜란드 앤엘-6525 이엑스 니지메겐 필립스 반
레이텐라안 25

(72) 발명자

피그도르 칼 구스타프
네덜란드 앤엘-5211 디디 텐 보쉬 웨스트월 54
케이즈텐비크 튜니스 베나드 허만
네덜란드 앤엘-6536 지알 니지메겐 위젠힌
34-71
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김성기, 김진희

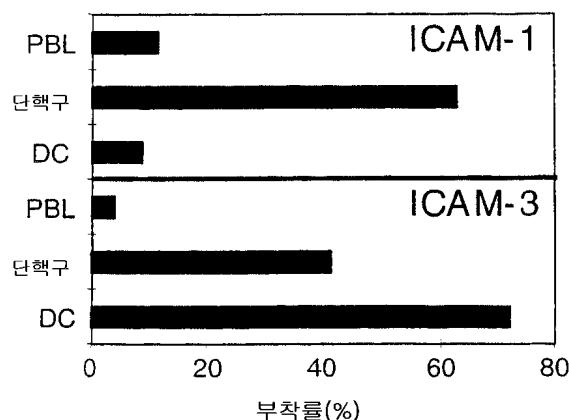
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 수상 세포와 T 세포 사이의 상호 작용을 조절하는 조성물 및 방법

(57) 요 약

본 발명은 동물, 구체적으로 인간 또는 기타 포유 동물에서 면역 반응을 조절, 구체적으로 억제하는 조성물의 제조시, 수상 세포상의 C 형 렉틴에 결합하는 화합물의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 화합물은 구체적으로 수상 세포와 T 세포, 더욱 구체적으로 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴과 T 세포 표면상의 ICAM 수용기 사이의 상호 작용을 조절한다. 상기 조성물은 특정 항원에 대한 면역 반응의 예방/억제, 내성 유도, 면역요법, 면역 억제, 자가 면역 질환 치료, 알레르기 치료 및/또는 HIV 감염 억제용으로 사용될 수 있다. C 형 렉틴에 결합하는 화합물로서는 만노즈, 푸코즈, 식물성 렉틴, 항체, 당, 단백질 또는 C 형 렉틴에 대한 항체로부터 선택되는 것이 바람직하다. 본 발명은 또한 이러한 항체 및 이러한 항체를 사용하여 수상 세포를 분리하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(72) 발명자

반 쿠이크 이베트

네덜란드 엔엘-6813 케이디 아른헴 포겐비크스트라
트 5

토렌스마 러드

네덜란드 엔엘-6531 알페 니지메겐 뉴슈른스트라트
6

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호 2 또는 도 9의 아미노산 서열을 갖는 C-형 렉틴(DC-SIGN)의 세포외 부분에 대하여 유도된 항체로서, 상기 항체는 T-세포의 표면상의 ICAM 수용체와 DC-SIGN 사이의 상호 작용을 저해할 수 있는 것인 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 것인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ICAM 수용체가 ICAM-2 수용체 또는 ICAM-3 수용체인 것인 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, ECACC 수탁 번호 99040818로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체 또는 ECACC 수탁 번호 99040819로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체인 것인 항체.

청구항 5

동물에서 특이적인 항원에 대한 면역 반응의 방지 또는 억제, 면역관용 유도, 면역억제, 자가면역 질환 치료, 알레르기 치료 및/또는 인간 또는 기타 포유 동물에서 HIV 감염 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물로서, 제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 따른 하나 이상의 항체 및 그 자체로 공지된 하나 이상의 추가 담체, 부형제, 면역보강제 및/또는 배합제(formulant)를 포함하는 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 항체가 ECACC 수탁 번호 99040818로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체 또는 ECACC 수탁 번호 99040819로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체인 것인 약학 조성물.

청구항 7

생물학적 시료 중의 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 C-형 렉틴의 존재 및/또는 발현 여부를 결정하기 위한 분석에 사용되는, 제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항의 항체를 포함하는 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 항체가 ECACC 수탁 번호 99040818로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체 또는 ECACC 수탁 번호 99040819로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체인 것인 조성물.

청구항 9

생물학적 시료 또는 배양 배지로부터 수상 세포를 생산, 분리 및/또는 정제하는 방법으로서,

- a) 수상 세포를 함유하는 생물학적 시료 또는 배양 배지를 제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항의 항체와 접촉시키는 단계;
 - b) 상기 항체에 결합하지 않은 세포로부터, 그리고 임의적으로는 상기 시료 또는 배지 중의 임의의 추가의 구성 성분으로부터, 상기 항체에 결합한 세포들을 분리하는 단계를 포함하고; 경우에 따라서, 추가로
 - c) 상기 항체에 결합한 세포를 상기 항체로부터 분리하는 단계
- 를 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체가 ECACC 수탁 번호 99040818로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체 또는 ECACC 수탁 번호 99040819로 기탁된 하이브리도마 세포주가 생산하는 항체인 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 항체가 컬럼 또는 매트릭스, (상)자성 비드 또는 이와 유사한 고체 지지체에 부착되는 것인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장 또는 림프액과 같은 생물학적 유체인 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장 또는 림프액과 같은 생물학적 유체인 것인 방법.

청구항 14

서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 수상 세포 표면상의 C-형 렉틴의 세포외 부분에 대하여 유도된 항체를 포함하는, 동물에서 특이적인 항원에 대한 면역 반응의 방지 또는 억제, 면역관용 유도, 면역억제, 자가면역 질환 치료 및/또는 알레르기 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 이식 거부의 방지를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 갑상선염, 류마티스성 관절염, 전신 홍반 루프스(SLE), 다발성 경화증 및 자가 면역성 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 자가 면역 질환의 치료를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 암의 치료를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 18

제14항에 있어서, 감염성 질병의 치료를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 기생체, 원생 동물 또는 바이러스 감염의 치료를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 인플루엔자, 볼거리, 홍역, 풍진, 디프테리아, 파상풍, HIV 감염 또는 허파스 감염의 치료를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 네이세리아(*Neisseria*), 보르데렐라 페르 투시스(*Bordetella pertussis*), 폴리오밀레투스(*Polyomyletus*), 인플루엔자 바이러스 또는 뉴모코코스 (*Pneumococcus*)로의 감염으로 인한 질병의 치료를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 22

제14항에 있어서, 상기 항체가 수상 세포와 T 세포 사이의 하나 이상의 상호 작용을 감소시키는 것인 약학 조성물.

청구항 23

제14항 또는 제22항에 있어서, 상기 항체가 수상 세포와 T 세포 사이의 부착을 감소시키는 것인 약학 조성물.

청구항 24

1) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 갖는 수상 세포 표면상의 C-형 렉틴의 세포외 부분에 대하여 유도되며 거기에 부착되는 항체; 2) 항원의 조합물을 포함하는, 상기 항원에 대한 면역 반응을 증가 또는 촉진시키기 위한 약학 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 항원이 상기 항체와 공유 결합되거나 또는 융합되는 것인 약학 조성물.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 항원이, 암 항원을 포함하거나 또는 발현시키는 종양 세포에 대한 면역 반응을 형성하는 데 사용될 수 있는 암 항원, 또는 감염성 질병에 대한 백신으로 사용되는 항원으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 27

제14항, 제22항, 제24항 또는 제25항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 것인 약학 조성물.

청구항 28

제23항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 것인 약학 조성물.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 것인 약학 조성물.

청구항 30

제14항, 제22항, 제24항 또는 제25항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항체가 하이브리도마 세포주 ECACC 수탁 번호 99040818 또는 하이브리도마 세포주 ECACC 수탁 번호 99040819에 의해 생산되는 것인 약학 조성물.

청구항 31

제14항에 있어서, 상기 동물이 인간 또는 기타 포유 동물인 것인 약학 조성물.

청구항 32

제14항 또는 제22항에 있어서, 상기 항체가 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴과 T 세포 표면상의 ICAM 수용체 사이의 부착을 감소시키는 것인 약학 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 ICAM 수용체가 ICAM-2 또는 ICAM-3 수용체인 것인 약학 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 인간 또는 기타 포유 동물과 같은 동물내 면역 반응을 조절, 구체적으로 증가 또는 감소시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다.
- <2> 하나의 구체예에서, 본 발명은 T 세포에의 수상 세포의 부착을 조절, 구체적으로 감소시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다.
- <3> 더욱 구체적으로, 본 발명의 구체예에는 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴 수용기가 T 세포 표면상의 ICAM 수용기에 부착하는 작용을 조절, 구체적으로 감소시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 상기 부착 과정을 조절함으로써, 클러스터 형성 및 항원 제공과 같은 수상 세포와 T 세포 사이의 상호 작용과, 예를 들어 이에 의존되는 1차 T 세포 반응에 영향을 미쳐 면역 반응을 조절할 수 있다.

- <4> 따라서 본 발명의 조성물 및 방법은 자가 면역 질환 또는 알레르기에서 발생할 수 있는 것과 같은, 면역계 이상에 의하여 발생하는 면역 반응과 특정 항원에 대한 면역 반응을 변경시키는 데에 사용될 수 있다.
- <5> 본 발명의 추가의 구체예에서, 본 발명의 방법은 HIV 감염 및 이와 유사한 면역계 이상을 치료하고 조직 이식 이후의 이식편에 대한 면역 반응을 조절하는 데에 사용될 수 있다.
- <6> 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 인간 또는 기타 포유 동물과 같은 동물의 면역 반응을 조절, 구체적으로 증가시키는 화합물, 조성물 및 방법에 관한 것이다.
- <7> 더욱 구체적으로, 본 구체예에서, 특정 항원에 대한 면역 반응은 수상 세포의 표면상의 C 형 렉틴 수용기와 결합할 수 있는 형태로 수상 세포에 상기 항원 또는 이들의 항원성 부분을 제공함으로써 발생, 증가 또는 촉진된다. 이러한 방식으로 제공된 항원은 수상 세포로 도입되는데, 그후 항원을 T 세포에 제공하여, 면역 반응을 유발시키거나 또는 상기 항원에 대한 면역 반응을 증가시킨다.
- <8> 본 발명의 추가의 구체예는 상기 조성물을 사용하고/또는 전술된 방법을 구체화시키는 예방 기술 및 진단 기술에 관한 것이다.
- <9> 본 발명은 T 세포에의 수상 세포의 부착이 수상 세포 표면의 C 형 렉틴 수용기에 의하여 매개된다는 놀라운 발견에 기초하는 것이다. 또한 상기 C 형 렉틴은 T 세포 표면의 ICAM 수용기에 결합한다는 사실도 발견하게 되었다. "ICAM 수용기"란 용어는 ICAM-2 및 ICAM-3 수용기를 의미하는 것으로서, 구체적으로 ICAM -3 수용기를 의미한다.
- <10> 본 발명은 추가로 상기 C 형 렉틴의 공지된 억제제 및/또는 C 형 렉틴 수용기에 대해 유도된 특정 항체에 의하여 수상 세포상의 C 형 렉틴 수용기를 억제함으로써 수상 세포에의 T 세포의 부착을 조절, 더욱 구체적으로 감소시킬 수 있으며, 이로써 면역 반응, 구체적으로 면역 반응의 초기 단계에 영향을 미칠 수 있다는 발견에 기초한다.

배경기술

- <11> WO 96/23882 에서는 수상 세포 및 흉선 상피 세포의 표면상에 다양으로 발현되는 C 형 렉틴 도메인을 보유하는 쥐 및 인간 수용기에 관하여 기술하고 있다. 상기 쥐 수용기(일명 "DEC-205")는 등전점이 약 7.5 인 205 kDa 의 단백질로서, 10 개의 C 형 렉틴 도메인을 함유하고 대식 세포 만노즈 수용기(MMR)의 상동체라고 기술되어 있다.
- <12> WO 96/23882 에서는 DEC-205 에 대한 단클론 또는 다클론 항체에 관하여 기술하고 있다. 그러나, 상기 항체들은 수상 세포 기능을 억제할 수는 없었다. 구체적으로, 단클론 및 다클론 항 DEC-205 항체들은 시험관내(한가지 방식의 혼합 백혈구 반응에서 항 DEC-205 가 동종 T 세포 증식을 억제시키지 못하는 것으로써 측정) 및 생체내(생체내 반응, 즉 국부 이식편 대 숙주(GVH) 반응을 항 DEC-205 가 억제시키지 못하는 것으로써 측정) 모든 경우에서의 수상 세포와 조력 T 세포 사이의 상호 작용을 억제할 수 없었다. 이러한 결과를 통하여 상기 DEC-205 수용기는 수상 세포와 T 세포 사이의 상호 작용(즉, 부착)에 관여하지 않으며 항 DEC-205 항체는 면역 반응을 조절하는 데에 사용될 수 없다는 사실을 파악할 수 있다.
- <13> Curtis 외 다수 공저, *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, 89(1992) p.8356-8360 및 WO 93/01820 에서는 인간의 태반 조직으로부터 분리 및 클로닝된 비 CD4 gp120 수용기에 관하여 기술하고 있다. 상기 gp120 수용기는, 예를 들어 태반, 골격근, 뇌, 신경 및 점막 세포와 결장, 흉선, 심장, T 세포, B 세포 및 대식 세포를 포함하는 기타 조직들 및 세포들과 같은 CD4 가 높은 수준으로 발현되지 않는 포유 동물 세포상에 발현된다(단, 간 또는 신장 세포는 제외). WO 93/01820 의 서열 1 및 서열 2 에 개시된 C 형 렉틴 gp120 수용기의 아미노산 서열은 상기 수상 세포에 존재하는 것으로 밝혀진 C 형 렉틴과 서열 상동성 정도가 높다(> 98 %).

- <14> Curtis 의 저서 및 WO 93/01820 에서는 또한 상기 C 형 렉틴 수용기가 주요 HIV 피막 당단백질 gp120에 결합한 후 바이러스 입자가 세포내에서 내부 통합화(internalization)됨으로써 전술된 세포/조직들이 HIV에 감염되는 과정에서 중요한 역할을 담당한다는 사실에 관하여 기술하고 있다. 상기 C 형 렉틴 gp120 수용기를 억제하면 상기 세포/조직들이 HIV에 감염되는 것을 감소시키거나 또는 억제할 수 있다는 사실을 알 수 있다. 적당한 억제제로서, WO 93/01820 에는 만노즈 탄수화물, 푸코즈 탄수화물, 콘카나발린 A와 같은 식물성 렉틴, 프라디마이신 A 와 같은 특정 항생제 및 N-아세틸-D-글루코사민 및 갈락토즈와 같은 당이 개시되어 있으나, 효력이 약한 것으로 기술되어 있다. 상기 억제제들을 함유하는 화합물 및 조성물은 시험관내 또는 생체내에서 사용되어 상기 세포 표면에 HIV가 결합하는 것을 억제할 수 있다.

- <15> 또한 WO 93/01820 에서는 COS-7 세포에의 HIV의 결합은 gp120 및 항 gp120 단클론 항체(일명 "항체 110.1")의 예비 항온처리에 의하여 억제될 수 있다는 사실에 관하여 기술하고 있다. 그러나, 상기 항체는 C 형 렉틴에 의하여 유도되는 것이 아니라, gp120 단백질에 의하여 유도되는 것이다.
- <16> 그러나, Curtis의 저서 및 WO 93/01820 중 어느 문헌에서도 이러한 C 형 렉틴이 수상 세포에 존재한다는 사실에 대하여 언급되거나 또는 논의되어 있지 않으며, 상기 참고 문헌들 중 어느 것도 면역 반응의 초기 단계에서 수상 세포와 T 세포의 상호 작용에 관한 역할에 대해서 언급되어 있거나 또는 논의되어 있지 않다.
- <17> WO 95/32734 에는 특정 항원에 대한 면역 반응을 조절하는 데에 사용되는 Fc γ RII (CD 32) 교 형성(또는 가교 형성) 조성물 및 이의 용도에 관하여 기술하고 있다. 상기 참고 문헌은 항원 제공 세포(APCs)상의 Fc γ RII (CD 32) 분자들이 교를 형성함으로써 필수적인 공동 자극 분자들 B7-1/2 을 손상시키며(즉, 이들의 상승 조절 작용을 억제함으로써), 이에 따라 단핵구가 항원 특이적 T 세포의 활성화를 공동으로 자극하는 능력을 기능적으로 손상시켜 부착 분자인 ICAM-3 의 발현을 억제시키게 된다(즉, 하강 조절). 상기 교 형성체는 응집된 인간 IgG 분자 또는 이들의 Fc 단편들 ; Fc γ RII 에 대한 2가 또는 다가성 단클론 항체 또는 이들의 단편들, 또는 2 이상의 인간 IgG Fc 부분의 융합체로부터 선택된다.
- <18> 따라서 WO 95/32734 는 T 세포 활성화에 요구되는 공동 자극 신호(즉, TcR/CD3 상호 작용의 1차 신호 이외의 신호)를 조절(즉, 억제), 구체적으로 효과기 세포들의 증식 및 성숙을 유도하는 방법에 관한 것이다. WO 95/32734 는 수상 세포와 T 세포의 부착을 조절하는 것에 관한 것이 아니며, 수상 세포(이의 표면)상에 C 형 렉틴이 존재한다는 사실 또는 T 세포상 ICAM-3 수용기와 이들의 상호 작용에 관하여 개시하는 것도 아니고 또한 이에 관하여 논의되어 있는 것도 아니다.
- <19> WO 98/02456 에는 자극된 인간 대식 세포 라이브러리로부터 분리된 II군 인간 C 형 렉틴에 관하여 개시되어 있다. WO 98/49306 에는 인간 체장염 관련 단백질("PAP")에 존재하는 IV군 C 형 렉틴에 관하여 개시되어 있다. WO 98/41633 에는 인간 종양 클론으로부터 분리해낸 V군 인간 C 형 렉틴에 관하여 개시되어 있다.
- <20> WO 98/02456, WO 98/49306 및 WO 98/41633 에는 상기 C 형 렉틴에 대한 항체를 생성하는 방법에 관하여 개시되어 있다.
- <21> 그러나, 상기 참고 문헌들중 어느 것도 수상 세포상의 C 형 렉틴에 관한 것은 아니며 ; 상기 참고 문헌들에 개시되어 있는 C 형 렉틴은 여기에 기술된 C 형 렉틴과 근원상, 생물학적 기능상 그리고 구조상으로 상이하다.
- <22> 수상 세포(DC)는 말초 조직에서 항원을 포획하며 이를 림프 또는 혈액을 통하여 방출원인 림프 소체 및 비장의 T 세포 지역으로 이동시키는 전적인 항원 제공 세포이다. 이들이 프로세싱된 항원들을 원형 T 세포에 제공함으로써, 항원 특이적 1차 T 세포 반응이 개시된다.
- <23> 면역 감시 세포와 같은 세포체 표면에서의 이들의 위치로 인하여, 상기 DC 는 점막 노출 이후 HIV-1 에 의하여 감염된 첫번째 세포로서 HIV의 면역 병인에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 보인다. 현재 HIV는 DC의 정상적인 순환 과정을 변환시켜 림프 소체로 도입되어 CD4 $^{+}$ T 세포에 접근하는 것으로 알려져 있으며, 이는 깊은 꼬리 원숭이를 모델 시스템으로 하여 여기에 원숭이 면역 결핍 바이러스를 1차적으로 감염시키는 생체내 실험을 통하여 설명될 수 있다[Spira 외 다수 공저, 1996 ; Joag 외 다수 공저, 1997]. HIV-1 에 의한 DC의 증식성 감염에 관하여는 몇몇 연구자에 의하여 보고되어 있으며[Granello-Piperno 외 다수 공저, J.Virol 72(4), 2733-7, 1998][Blauvelt 외 다수 공저, Nat Med 3(12), 1369-75, 1997], 실질적으로 시험관내에서 HIV-1 으로 펠스를 가하여준 DC는 T 세포와 공동 배양될 경우 실질적으로 유효하게 감염을 일으킬 수 있다는 것을 입증하는 것이다[Cameron 외 다수 공저, Science 257(5068), 383-7, 1992]. HIV-1 감염된 개체내에서도 이와 유사한 현상이 발생하는지 여부는 확실하지 않지만, DC로부터 T 세포까지 HIV-1 이 전이되면 AIDS 에서 관찰되는 CD4 $^{+}$ T 세포의 감소 현상에 기여할 수 있다. HIV 및 DC 의 상호 작용을 연구하면 HIV 감염의 초기 현상을 이해하는 데에 도움이 될 수 있으며, 이로써 상기 전이의 초기 현상을 차단하는 것을 목적으로 하는 방법을 도출해 낼 수 있다. 이에 관하여는 참고 문헌 WO 95/32734 및 WO 96/23882 에 또한 상세히 설명되어 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <24> DC 는 휴지 상태인 T 세포와 상호 작용하고 이를 활성화시키는 능력이 있다는 점이 특징이다. 그러나, 본 발명의 이전에는 DC-T 세포 접촉이 어떻게 개시되고 조절되는지에 관해서는 거의 공지된 바가 없었다. 본원에서는

DC-T 세포 상호 작용에서 ICAM-3의 역할에 관하여 논의되고 있다. DC가 ICAM-3에 강력히 부착됨에도 불구하고, 이와 같은 부착은 LFA-1, αD 또는 기타 다른 인테그린에 의하여 매개되는 것은 아니라는 사실이 기술되어 있다. 이러한 DC 상의 신규한 ICAM-3 수용기를 연구함에 있어서, DC에 의하여 우선적으로 발현되는 DC-SIGN으로 표기되는 C 형 렉틴 수용기가 클로닝되었다. DC-T 세포의 클러스터 형성 및 T 세포 반응의 개시에 있어서 이들의 두드러진 역할 이외에도, 상기 DC-SIGN이 DC의 감염 및 이에 후속하는 HIV-1의 T 세포로의 전이에 관여하는 주요 HIV-1 수용기라는 사실을 파악할 수 있었다. 그러므로 HIV-1 및 휴지 상태의 T 세포는 DC와 상호 작용하는 고도로 발현된 유사 수용기를 이용한다.

과제 해결수단

- <25> 본 발명의 제1측면은 동물, 구체적으로 인간 또는 기타의 포유 동물에서의 면역 반응을 조절, 구체적으로 감소시키는 조성물의 제조시, 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물의 용도에 관한 것이다.
- <26> 구체적으로, 본 발명의 상기 측면은 수상 세포와 T 세포 사이의 상호 작용을 조절, 구체적으로 억제하는 조성물 제조시, 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물의 용도에 관한 것이다.
- <27> 더욱 구체적으로, 본 발명의 상기 측면은 수상 세포와 T 세포 사이의 부착을 조절, 구체적으로 감소시키는 조성물 제조시, 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물의 용도에 관한 것이다.
- <28> 특히, 본 발명의 상기 측면은 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴과 T 세포 표면상의 ICAM 수용기 사이의 부착을 조절, 구체적으로 감소시키는 화합물 제조시 수상 세포의 표면상에 C 형 렉틴이 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물의 용도에 관한 것이다.
- <29> 수상 세포가 T 세포에 결합하는 데에 관련되는 것으로 알려진 하나의 C 형 렉틴의 아미노산 서열을 서열 1 및 도 9에 나타내었다. 상기 C 형 렉틴 수용기는 근본적으로 Curtis 외 다수 공저, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 89(1992), p.8356-8360 및 WO 93/01820에 기술된 C 형 렉틴 gp120 수용기와 유사하다. 구체적으로, WO 93/01820의 서열 1로 나타낸 아미노산 서열과의 상동성 정도가 높다(< 98 %). 상기 C 형 렉틴 수용기는 404 아미노산의 II 군 C 형 렉틴으로서 ; 결보기 분자량이 약 44 kDa이고 ; 세포질성 아미노 말단을 포함하는 제1 도메인(Met 1 내지 Ala 76), 반복적 직렬 구조를 포함하는 제2 도메인(Ile 77 내지 Val 249) 및 II 형 막 단백질인 기타 공지된 C 형 렉틴과의 상동성이 매우 높은 제3 도메인(Cys 253 내지 Ala 404)을 포함한다. 추가의 특징들을 이하에 나타내었다.
- <30> 본 발명에서, 수상 세포상의 상기 C 형 렉틴은 T 세포 표면상의 ICAM 수용기에 결합하는 것으로 파악되었다.
- <31> 따라서, 본 발명의 조성물은 수상 세포와 T 세포 사이의 상호 작용을 조절(즉, 변경 및/또는 변형), 더욱 구체적으로 억제(즉, 감소 및/또는 하강 조절)시키는 데에 사용될 수 있다.
- <32> 이러한 상호 작용의 추가 예로서는 수상 세포에 T 세포가 부착되는 것을 포함하는데, 예를 들어 수상 세포와 T 세포의 클러스터 형성, T 세포 활성화 및 수상 세포와 T 세포 사이의 접촉에 관련된 모든 상호 작용, 즉 직접적인 세포 대 세포간 접촉 또는 수상 세포와 T 세포의 접근 등을 포함한다.
- <33> 이와 같은 추가의 상호 작용들에는, 구체적으로 T 립프구의 1차 감작/활성화(즉, 항원 및/또는 T 세포에 대한 NHC-결합형 웨타이드의 제공) 및 T 세포의 공동 자극과 같은 초기 면역 단계 동안, 면역 응답을 발생시키는 데에 관련된 과정 ; 및 화학 신호 전달, 엔도사이토시스 및 경표피성 수송과 같은 과정들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일반적으로 수상 세포와 T 세포 사이의 상호 작용에 관하여 논의함에 있어서는, 이하에 언급된 참고 문헌들 및 WO 95/32734 및 WO 96/23882를 참조할 수 있다.
- <34> 따라서 본 발명의 조성물은 수상 세포의 면역 조절 능력에 영향을 미치고 ; 수상 세포 매개성 (1차) T 세포 반응을 조절, 구체적으로는 감소시키며/또는 일반적으로 면역계에 영향, 구체적으로 억제하는 데에 사용될 수 있다.
- <35> 몇몇 특정 적용예로서는 특정 항원에 대한 면역 반응의 예방 또는 억제 ; 내성의 유도 ; 면역 요법 ; 예를 들어 이식 거부에 대한 면역 감시 ; 갑상선염, 류마티스성 관절염, 전신 홍반 루프스(SLE), 다발성 경화증 및 자가 면역성 당뇨병과 같은 자가 면역 질환의 치료 ; 및 알레르기 예방 또는 치료를 포함한다.
- <36> 본 발명의 조성물은 또한 T 세포에 수상 세포가 부착되거나 또는 근접하는 데에 따른 T 세포상의 기타 수용기의 활성화를 조절할 수도 있다. 더욱이, 본 발명에 있어서 T 세포상의 ICAM 수용기에 결합하는 수상 세포상의 C 형

렉틴은 일반적으로 수상 세포와 T 세포 사이의 상호 작용에 영향을 주어 면역계를 조절하는 새로운 기술 또는 가능성을 열어줄 수 있다.

- <37> 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은, 예를 들어 화학 물질, 케모카인 및/또는 인터루킨 등과 같은 신호 전달 인자 및 구체적으로 HIV 와 같은 바이러스 입자들을 수상 세포로부터 T 세포로 운반시키는 것을 예방 및 감소시키는 데에 사용될 수 있다. 이 과정에서, 본 발명의 조성물을 사용하면, 수상 세포에 HIV가 초기에 부착되는 것을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 수상 세포로부터 T 세포에 HIV 감염이 확산되는 것을 억제할 수도 있다.
- <38> 수상 세포가, 구체적으로 HIV 감염의 초기 단계에 HIV "저장체"로서 사용될 수 있다고 생각되는데, 이와 같은 발견은 특히 중요한 의미를 갖는다. 따라서 본 발명의 조성물은 수상 세포에 HIV가 감염되는 것을 예방하고, 수상 세포가 HIV 에 감염된 이후에 상기 감염이 T 세포로 확산되는 것을 감소시켜 질병의 발생 과정을 억제하는 데에 사용될 수 있다.
- <39> 또한 T 세포, 즉 림프선의 활성화는 HIV 감염 환자의 AIDS 의 진행에 중요한 역할을 한다는 사실이 공지되어 있다. 본 발명의 조성물은 상기 T 세포 활성화를 예방, 억제 또는 최소한 지연시켜 상기 질병의 개시 및/또는 진행을 늦추는데에 사용될 수 있다.
- <40> 따라서 추가의 측면에 있어서, 본 발명은 수상 세포에 HIV가 감염되는 것, 구체적으로 HIV 표면 단백질(즉, gp120)이 수상 세포 표면에 부착되어 HIV 가 상기 수상 세포에 침투하는 것을 억제하는 조성물 제조시, 수상 세포의 표면상에 있는 C 형 렉틴에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물의 용도에 관한 것이다.
- <41> 본 발명은 추가로 감염된 수상 세포로부터 감염되지 않은 T 세포로 HIV 가 전이되는 것을 억제하는 조성물의 제조시, 수상 세포 표면의 C 형 렉틴에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물의 용도에 관한 것이다.
- <42> 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 화합물에는 전술한 WO 93/01820 에 기술된 것들을 포함하는 공지의 C 형 렉틴의 억제제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <43> 일반적으로, 상기 화합물들은 C 형 렉틴, 구체적으로 서열 1/도 9의 C 형 렉틴 또는 이들의 균등물에 결합 또는 부착(바람직하게는 가역적 방식으로)될 수 있거나, 또는 이들에 대한 리간드로서 사용될 수 있다. 상기 화합물의 예로서는 만노즈 및 D-만노즈와 같은 만노즈 탄수화물 ; L-푸코즈와 같은 푸코즈 탄수화물 ; 콘카나발린 A와 같은 식물성 렉틴 ; 프라디마이신 A와 같은 항생제 ; N-아세틸-D-글루코사민 및 갈락토즈와 같은 당류(본원에서는 효력이 미흡한 것으로 기술됨) ; 및 적당한 웨타이드 유사 화합물 및 파아지 디스플레이 기술을 사용하여 동정될 수 있는 작은 약품 분자들이 있다. 더욱이, gp120 및 이의 유사체 또는 단편이나 수상 세포상 C 형 렉틴과 결합하는 능력을 보유하는 유사한 단백질과 같은 단백질들 및 분리된 ICAM 수용기 및 이들의 일부 또는 단편을 포함하는 이들의 유사체가 사용될 수 있다. 이러한 일부 또는 단편들은 이후 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴과 결합할 수 있다.
- <44> 그러나, 상기 탄수화물은 생체내에서 급속하게 대사될 수 있기 때문에, 탄수화물을 사용하는 것은 치료학적 관점에서는 바람직하지 못하다. 또한 콘카나발린 A 와 같은 식물성 렉틴 및 프라디마이신 항생제를 사용하는 것은 치료의 세팅, 구체적으로 자가 면역 이상 및/또는 HIV 감염 환자들을 치료할 때 불리할 수 있다.
- <45> 바람직하게, WO 93/01820 에 정의된 바와 같은 하나 이상의 내성 및/또는 치료학적으로 허용 가능한 화합물들이 사용될 수 있다. 예를 들어, gp120 또는 이들의 유도체들을 사용할 경우 바람직하지 않은 부작용을, 구체적으로 신경계에 일으킬 수 있다(WO 93/01820 참조).
- <46> 따라서 본 발명에 의하면, 수상 세포 표면상에 존재/발현된 C 형 렉틴에 대하여 유도된 항체 또는 이들의 일부, 단편 또는 에피토프가 사용된다. 본원에 사용된, 항체라는 용어는 특히 다클론성, 단클론성, 키메라 및 단일 사슬 항체 및 단편들(Fab, Fv, Fa) 및 Fab 발현 라이브러리를 포함한다. 뿐만 아니라, 예를 들어 WO 98/49306 에 기술된 바와 같이, "인간화된(humanized)" 항체들이 사용될 수 있다.
- <47> 본 발명의 C 형 렉틴에 대한 이러한 항체들은 이하에 기술된 바와 같이 얻어질 수 있거나 또는 예를 들어 WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 및/또는 WO 98/49306 에 기술된 당 업계에 공지된 기타의 방법으로 얻을 수 있다.
- <48> 예를 들어, 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 래트, 돼지 또는 마우스와 같은 적당한 숙주를 C 형 렉틴 또는 면역 원성 부분, 이들의 단편 또는 융합체, 임의적으로는 면역원성 담체(예를 들어, 소 혈청 알부민 또는 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin)과 같은) 및/또는 Freund's, 사포닌, ISCOM's, 수산화 알루미늄 또는 유사 광물성 겔 또는 키홀 림펫 헤모시아닌 또는 유사한 표면 활성화 물질과 같은 애쥬반트로 면역화하여 얻을

수 있다. C 형 렉틴에 대한 면역 반응이 발생한 이후(보통 1 일 내지 7 일 이내), 항체는 본질적으로 공지된 방법으로 면역화된 동물로부터 얻어진 혈액 또는 혈청으로부터 분리될 수 있는 것으로서, 이는 예를 들어, WO 96/23882 에 예시된 바와 같은, 공지된 면역 검정법 기술을 사용하여 목적 성질(즉, 특이성)을 보유하는 항체의 스크리닝 단계를 포함할 수도 있다.

<49> 모노클론은 림프 잡종 세포종을 포함하는 배양액내 연속 세포주 및 전술한 참고 문헌에 기술된 방법과 유사한 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

<50> 디설파이드 결합을 환원시키는 웨신 또는 기타 프로테아제로 항체를 분해하고 파페인 및 환원제로 각각 처리하여 $F(ab)_2$, Fab' 및 Fab 단편들과 같은 Fab 단편을 얻을 수 있다. Fab 발현 라이브러리는 예를 들어 Huse 외 다수 공저, 1989, *Science* 245:1275-1281 의 방법에 의하여 얻어질 수 있다.

<51> 상기 수상 세포상의 C 형 렉틴에 대한 단클론 항체가 사용되는 것이 바람직한데, 서열 1 및 서열 2 그리고 도 9에 나타낸 또는 이에 의하여 암호화된 아미노산 서열을 보유하는 웨타이드, 또는 이들의 (항원성) 일부가 더욱 바람직하며 ; 이러한 단클론들은 본 발명의 추가의 측면이다. C 형 렉틴에 대한 특이성이 상당히 높은 유사 단클론이 사용될 수도 있으나, 이하에서 본 발명은 AZN-D1 및 AZN-D2로 불리워지는 2개의 단클론에 의하여 기술될 것이다.

<52> 본 발명의 추가의 측면에서는 수상 세포상의 C 형 렉틴, 더욱 바람직하게는 서열 1 및 서열 2 그리고 도 9에 나타낸 또는 이에 의하여 암호화되는 아미노산 서열을 보유하는 웨타이드, 또는 이들의 (항원성) 일부에 대한 항체, 바람직하게는 단클론 항체를 생성하는 림프 잡종 세포와 같은 세포주를 제공한다. 전술한 본 발명의 단클론 AZN-D1 및 AZN-D2를 생성하는 림프 잡종 세포는 각각 ECACC 수탁 번호 99040818 및 99040819로 유럽 세포 배양 수집소(European Collection of Cell Cultures)에 1999년 4 월 8 일자로 기탁되었다.

<53> 또한 본 발명은 바람직하게는 수상 세포상의 C 형 렉틴, 더욱 바람직하게는 서열 1 및 서열 2 그리고 도 9에 나타낸(암호화된) 아미노산 서열을 보유하는 웨타이드, 또는 이들의 (항원성) 일부에 대한 항체, 바람직하게는 단클론 항체의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 상기 항체를 생성하는 세포 또는 세포주를 배양한 후, 상기 세포 배양액으로부터 항체를 수집/분리하는 단계를 포함한다.

<54> 수상 세포상의 C 형 렉틴에 대한 항체(단클론) 또는, 이러한 항체들을 생산하는 세포 또는 세포주 어느 것에 관하여도 당 업계에 알려진 데이터가 없지만, 본 발명의 신규의 항체가 광범위하게 적용(즉, 본원에 기술된 약학적/치료학적 용도 이외)될 것이라는 사실은 예측 가능한 것이다. 상기 적용예 -본 발명의 다른 측면을 이루지는 않는- 중 몇몇은 본원에 공개된 문헌의 숙련자에게 명백할 것이다.

<55> 예를 들어, 본 발명의 항체들은 조직내 또는 전체 세포상의 C 형 렉틴의 존부를 검출하는 데에 사용될 수 있으며, 또한 세포 단편들 또는 세포 제조물과 같은 기타의 생물학적 시료내 C 형 렉틴의 존부를 검출할 수도 있다. 이후 이와 같이 얻어진 정보는 본 발명의 방법 또는 조성물이 이러한 조직 또는 세포에 적용될 수 있는지의 여부를 결정할 수 있는데에 사용될 수도 있다. 본 발명의 항체들은 또한, 예를 들어 혈액, 혈장 또는 림프액과 같은 생물학적 유체를 포함하는 생물학적 시료 ; 골수, 피부 조직, 종양 조직등과 같은 조직 시료 또는 세포 시료 ; 또는 세포 배양액 또는 배양 배지내에 존재하거나 또는 그로부터 얻어진 수상 세포를 검출(양적으로 및/또는 질적으로), 분리, 정제 및/또는 제조하는 데에 사용될 수 있다.

<56> 예를 들어, 현재 생물학적 시료로부터 수상 세포를 분리/제조하는 데에 유용한 소수의 방법들(예를 들어, US-A-5,643,786 에 기술된 방법으로서, 백혈구 분리 반출법 이후 형광 활성화 세포 분리법을 수행하는 것을 포함하는 방법)은 수율이 매우 낮으며 시료가 매우 이질적인, 비효율적 다단계 방법이다. 결과적으로, 수상 세포의 유용성이 제한적이기 때문에, 중요한 세포 군의 연구를 방해한다.

<57> 본 발명의 단클론들을 이용함으로써, 수상 세포들은 높은 수율로 그리고 특이적으로 분리 및 제조될 수 있다. 이러한 방법에서, 상기 단클론들은 항체를 이용하여 생물학적 유체로부터 세포들을 수집, 분리 및/또는 정제하는 공지된 방법에 사용될 수 있다.

<58> 예를 들어, 상기 단클론들은 컬럼 또는 매트릭스, 상자성 비드 또는 이와 유사한 고체 지지체에 부착될 수 있으며, 이것들은 이후 수상 세포를 함유하는 생물학적 시료 또는 배양 배지와 접촉할 수 있다. 상기 담체에 결합하지 않은 세포들은 수상 세포가 공지된 방법으로 상기 담체로부터 분리되어 정제된 이후, 분리 또는 제거(예를 들어, 세정에 의하여)된다.

<59> 또한 본 발명의 단클론은 수상 세포(및/또는 C 형 렉틴)의 존부 및/또는 생물학적 시료에서 이들을 암호화하는

유전자의 발현을 검출/측정하는 데에 사용될 수 있는데, 상기 항체들은 또한 경쟁적 억제 검정법 또는 ELISA 형 면역 검정법과 같은 항체 분석에 관한 공지의 방법에 사용될 수도 있다. 예를 들어, 상기 항체들은 현미경적 기술, 유동성 혈구 측정법 및 FACS 를 포함하는 세포 분류 기술, 고체 지지체 및/또는 검출 가능한 라벨 또는 마커(항체에 부착될 수 있는)를 기초로 한 기술, 상자성 비드를 기초로 하는 기술 또는 항체가 사용될 수 있는 공지의 검출 방법 또는 검정 기술을 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 검정법들 및 본원에 사용된 키트들은 본 발명의 항체들 이외에 공지된 항체 기초 검정법 및 매뉴얼의 다른 구성 성분들을 모두 포함할 수 있다.

- <60> 그러므로, 본 발명의 단클론은 시험관내 및 생체내에서 사용될 수 있는 유용한 진단 도구 및 연구 방법을 구성 한다. 적용 가능한 분야들로서는, 수상 세포 및 이들의 기능과 상호 작용 연구 ; 면역계 연구 ; 세포내 수상 세포 및/또는 C 형 렉틴 검출 ; 활액 조직 및 피부 조직/피부 세포(피부 수상 세포) ; 및 암(종양 형성 및 진행 과정을 규명하는 생체내 임상 실험에 사용되는 수상 세포) 및 자가 면역 질환(예를 들어, 류마티스성 관절염 포함)과 같은, 생물학적 경로 또는 질환의 기작에서 중요한 역할을 수행하는 수상 세포의 연구를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <61> 본 발명의 항체들이 사용될 수 있는 당 업계에 공지된 방법들 및 기술들을 더욱 상세히 설명하기 위하여, 예를 들어 D.P. Sites, A.I.Terr, T.G. Parslow : "Basic and clinical immunology", 8th Ed., Prentice-Hall(1994) ; I. Roitt, J.Brostoff, D.Male :"Immunology", 2nd Ed., Churchill Livingstone(1994) ; 및 본원에 참고 문헌으로서 첨부된 모든 문헌들과 같은 일반 서적을 참고할 수 있다. 특정 참고 문헌에서는 일반적으로 항체를 사용하고 여기에 포함된 기술들은 Janeway-Travers : "Immunobiology, the immune system in health and disease", 3rd Edition 에 기술된 연구 방법의 섹션 2.7 및 2.17 에 언급된 기술들을 포함한다.
- <62> 본 발명의 조성물은 전술한 2 이상의 활성 화합물을 함유하며, 이러한 화합물들은 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 항 C 형 렉틴 항체는 만노즈 또는 푸코즈 탄수화물, 렉틴 및/또는 프리다마이신 A와 같은 항생제로 제형되어, 상승 효과를 얻을 수 있다.
- <63> 본 발명의 조성물은 또한 처리될 조건에 따라서, 항 LF3A 와 같은 공지의 공동 억제 화합물 및 기타 당 업계에 공지된 활성 물질을 함유할 수도 있으며 또는 이들을 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물들은 면역 억제제(즉, 이식 거부 현상 방지용), 면역 조절제, 항체, 자가 항원 또는 알레르기 항원(예를 들어, WO 95/3234 또는 WO 96/23882 에 기술된 바와 같은), 종양 고사 인자(TNF) 및 항 HIV 제제 및 예를 들어, Leu-3A 와 같은 CD4 유도성 항체를 포함하는 CD4 억제제를 제형할 수 있거나 또는 이들을 조합하여 제형하여, 상승 효과를 얻을 수 있다.
- <64> 또한 본 발명의 조성물은 공지의 담체 및/또는 애쥬반트를 사용하여 제형되어 정제, 캡슐, 분말, 냉동 건조 제조물, 주사용 용액등과 같은 당 업계의 공지된 제약 형태, 바람직하게는 단위 투여 형태로서 제형될 수 있다. 이러한 제약 형태, 이의 용도 및 투여 방법(단일 또는 복수 투여 형태) 및 담체, 부형제, 애쥬반트 및/또는 이것들에 사용되는 제제는 일반적으로 당 업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 모두 본원에 참고 문헌으로서 첨부되어 있는 WO 93/01820, WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 및/또는 WO 98/49306에 기술되어 있다. 뿐만 아니라, 상기 제형은 WO 93/01820 에 기술된 바와 같은 리포좀의 형태일 수 있다.
- <65> 항체의 약학 제형 및 용도에 관하여는 일반적으로 WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 및/또는 WO 98/49306 에 기술되어 있다.
- <66> 본 발명의 조성물은 추가로, 예를 들어 바이알, 병, 주머니, 발포고 등으로 포장될 수 있으며 ; 관련 환자 정보 리플릿 및/또는 사용 지침서에 이에 대하여 기재할 수 있다.
- <67> 본 발명의 추가의 측면은 면역 반응을 변경 또는 변형시키는데에 충분한 양으로, 수상 세포 표면의 C 형 렉틴에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물을, 바람직하게는 전술한 조성물의 형태로 동물에 투여하는 단계를 포함하는, 동물, 구체적으로 인간 또는 기타 포유 동물에서의 면역 반응을 조절하는 방법에 관한 것이다.
- <68> 상기 화합물 또는 조성물은 구체적으로 수상 세포와 T 세포 사이의 상호 작용을 변경시키거나 또는 변형시키는 양으로 투여되는데, 더욱 바람직하게는 T 세포 및 수상 세포의 부착이 감소되는 양만큼 투여된다.
- <69> 본 방법은 면역계의 이상 현상을 예방 및/또는 치료하고 전술한 바와 같이 이식 거부 현상을 방지하는 데에 사용될 수 있다.
- <70> 본 발명은 추가로 HIV 감염을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것으로, 이는 HIV 감염 환자 또는 HIV 감염 위험이 있는 사람에게, 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴과 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물을 수상 세포와

HIV, 구체적으로 HIV 의 gp120 피막 단백질과 수상 세포상의 C 형 렉틴의 부착이 억제될 수 있는 양으로 투여하는 단계를 포함하는 HIV 감염 억제 방법에 관한 것이다.

<71> 또한, 본 발명은 HIV 감염 환자에게 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 화합물을 감염된 수상 세포로부터 감염되지 않은 T 세포로 HIV 가 전이되는 것을 억제하는 양으로 투여하는 단계를 포함하는 HIV 감염의 치료 방법에 관한 것이다.

<72> 추가의 측면에서, 본 발명은 동물, 예를 들어 인간 기타 포유 동물의 특정 항원 또는 항원의 조합물에 대한 면역 반응을, 상기 항원 또는 이들의 하나 이상의 항원성 일부를 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴 수용기에 결합할 수 있는 형태로 수상 세포에 제공함으로써 조절, 구체적으로 유발, 증가 및/또는 촉진하는 테에 사용된다. 이러한 방식으로 제공된 항원들은 수상 세포로 도입되어 이후, T 세포에 대한 항원을 제공하고, 이로써 상기 항원들에 대한 면역 반응을 유도한다.

<73> "수상 세포 표면상의 C 형 렉틴 수용기에 결합할 수 있는 형태" 란, 일반적으로 항원 또는 항원성 단편이, 예를 들어 전술한 화합물/리간드 또는 이들의 일부와 같은 수상 세포 표면의 C 형 렉틴에 결합할 수 있는 화합물, 리간드 또는 잔기를 의미한다. 상기 부착은 예를 들어, 결합(바람직하게는 공유 결합), 리간드 대 리간드의 상호 작용, 착화, 결찰, 단백질 융합(예를 들어, 상기 융합체의 발현을 통한), 또는 수상 세포에 제공된 항원이 C 형 렉틴의 리간드와 함께, 즉 안정성 또는 반안정성 실재물로서 수상 세포에 제공될 수 있는 기타 임의의 물리적 또는 화학적 상호 작용에 의하여 이루어질 수 있다.

<74> 예를 들어, 상기 항원은 공유 결합기 또는 측쇄로서 전술한 만노즈 및 푸코즈 탄수화물과 함께 제공될 수 있으며 ; 콘카나발린 A 와 같은 식물성 렉틴 또는 프라디마이신 A 와 같은 항생제에 공유적으로 부착될 수도 있고 ; 또는 N-아세틸-D-글루코사민 및 갈락토즈(이는 그다지 바람직하지는 않음)와 같은 당 잔기들과 함께 제공될 수 있으며, 이들 모두는 수상 세포에 대한 "직접적" 항원으로서 사용될 수 있다.

<75> 상기 항원은, 예를 들어 gp120 및 이의 유사체와 같은 C 형 렉틴 또는 ICAM-수용기 및 이들의 유사체에 대한 리간드로서 사용될 수 있거나 또는 이에 결합할 수 있는 단백질, 또는 이러한 단백질의 단편의 일부에 부착되는 것이 바람직하다. 이와는 달리, 상기 항원은 C 형 렉틴 유도성 항체, 바람직하게는 전술한 AZN-D1 및 AZN-D2와 같은 단클론 항체 ; 또는 전술한 항체의 단편 또는 일부에 부착(예를 들어, 융합되거나 또는 공유적으로 결합된 형태로)될 수 있다.

<76> 상기 항원은 (증가된) 면역 반응을 발생시키는 임의의 항원, 또는 이들의 임의의 단편이나 일부일 수 있다. 바람직하게, 이러한 단편의 일부는 면역 반응을 규명할 수 있는, 에피토프와 같은 것일 수 있다. 그러나, 이것이 필수적인 것은 아니다. 본 발명에 의하면 상기 단편은 특이성 또는 친화성이 증가된 수상 세포를 유도할 수 있으며, 일반적으로 면역 반응을 규명할 수 없는 일부 단편들이 본원에 기술된 바와 같은 C 형 렉틴에 대한 리간드와 함께 사용될 때 면역 반응을 제공할 수 있다. 또한 일반적으로, C 형 렉틴에 대한 리간드와 함께 사용되는 항원을 사용하면 항원의 효력을 증가시킬 수 있는데, 즉 투여된 항원 단위당 면역 반응을 더욱 상승시키거나 또는 강화시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 항원 - 혈청 또는 백신에 존재하는 항원들 및 목적 항원을 암호화하는 레트로바이러스 벡터 포함 - 은 그 자체의 투여량은 낮으나 충분한 면역 반응을 제공할 수 있는 양으로 투여될 수 있다.

<77> 적당한 항원의 예로서는 gp100, g250, p53, MAGE, BAGE, GAGE, MART1, 티로시나아제 관련 단백질 II 및 티로시나아제 관련 단백질을 포함하는 암 항원이 있으며 ; 이들 모두는 상기 항원을 함유 또는 발현시키는 종양 세포에 대한 면역 반응을 유발시키는데에 사용될 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 다른 형태의 항원으로서는 근본적으로 인플루엔자, 볼거리, 홍역, 풍진, 디프테리아, 파상풍과 같은 (감염성) 질병, 해모필러스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*)(예를 들어, b 형), 네이세리아(*Neisseria*), 보르데렐라 페르투시스(*Bordetella pertussis*), 폴리오밀레투스(*Polyomaviridae*) 인플루엔자 바이러스 및 뉴모코커스(*Pneumococcus*)와 같은 미생물로 인한 감염으로 인한 질병 및 일반적으로 기타 백신이 개발될 수 있거나 또는 개발될 수 있을것으로 예상되며, 기생체, 원생 동물 및/또는 HIV 및 허파스와 같은 바이러스 감염을 포함하는 기타 감염 또는 질병에 대한 백신에 사용되는 모든 항원들을 포함한다. 혈청 또는 백신을 제공하기 위하여, 본 발명의 화합물이 추가로 당 업계에 공지된 항원들과 함께 사용될 수 있다.

<78> 따라서 본 발명의 이러한 측면은 1) 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴에 결합하는 화합물 ; 및 여기에 부착된 화합물과, 2) 동물, 구체적으로 인간 또는 기타 포유 동물에서 상기 항원에 대한 면역 반응을 조절, 구체적으로 유발, 증가 및/또는 촉진시키는 조성물 제조시 항원 또는 단편 또는 이의 일부의 조합물의 용도에 관한 것이다.

- <79> 본 발명의 다른 측면을 이루는, 상기 조합물들(즉, 착물, 화학 물질 또는 실재물, 또는 융합 단백질 또는 단백질 구조물의 형태)은 또한 전술한 바와 같은 당 업계의 공지된 방법으로 제형 및 투여될 수도 있다.
- <80> 전술한 모든 방법들의 구체예에서, 사용된 화합물/조성물은 치료학적으로 유효량만큼 투여될 것이며, 이때의 기간은 일반적으로 WO 93/01820, WO 95/32734 및/또는 WO 96/23882에 기술된 바를 참고로 할 수 있다. 투여 방법은 단일 투여 방법일 수 있으나, 하루 이상 또는 수 주 또는 수 개월에 걸쳐서 수행되는 복수 투여 방식 중의 일부인 것이 바람직하다.
- <81> 본원에 사용된 모든 용어들은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 용어로서, 그중에서도 WO 93/01820, WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 및/또는 WO 98/49306에 기술되어 있는 정의들과 유사하게 사용될 수 있다.
- <82> 뿐만 아니라, 본원에 개시된 특정 44 kDa의 C 형 렉틴 수용기에 관하여 본원에 기술된 발명은 다른 것을 배제하는 것은 아니지만, 일반적으로 서열 1 및 도 9의 서열에 대한 자연 발생적 변이체를 포함하는, 유사한 C 형 렉틴이 수상 세포에 존재할 수도 있으며/또는 수상 세포- T 세포 상호 작용에 관여할 수 있다. 이러한 변이체들은 일반적으로 고도의 아미노산 상동성(80% 이상 내지 90% 이상)을 보유할 것이며/또는 본원에 개시된 특정 C 형 렉틴의 기능적 균등체일 것이다. 또한 임의의 수용기는 일반적으로 본원에 개시된 특성들을 디스플레할 것이며 ; 구체적으로 상기 수용기는 탄수화물 억제제 또는 특정 항체에 의하여 억제될 것이며, 이로써 수상 세포/T 세포 상호 작용이 변경될 것이다. 그러나, 이러한 임의의 변이체 수용기는 수상 세포와 T 세포의 상호 작용을 억제시키지 않는 억제에 관한, WO 96/23882에 개시된 C 형 렉틴 수용기와 구별된다.

<83> 본 발명은 이하에 제시된 실험 부분 및 도면들을 통하여 더욱 상세히 기술될 것이다.

효과

- <84> 본 발명의 화합물은 수상 세포 표면상의 C 형 렉틴과 T 세포 표면상의 ICAM 수용기 사이의 상호 작용을 조절하여, 특정 항원에 대한 면역 반응의 예방/억제, 내성 유도, 면역요법, 면역 억제, 자가 면역 질환 치료, 알레르기 치료 및/또는 HIV 감염 억제용으로 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <85> 수상 세포가 원형의 T 세포에 항원을 제공할 경우, 수상 세포(DC)는 항원을 포획하여 2차 림프 조직으로 이전한다. HIV-1은 이러한 특정 능력을 파괴시켜 CD4⁺ T 세포에 접근할 수 있다. 본 발명에서는 DC 특이적 C 형 렉틴을 클로닝하여 DC-SIGN으로 표시하였는데, 이는 ICAM-2 및/또는 ICAM-3에 고친화도로 결합할 뿐만 아니라, HIV-1에 결합할 수 있는 특성을 갖는다. 또한, 항 DC-SIGN 항체들은 발생되어 전이적 DC-T 세포 상호 작용 및 DC 유도성 T 세포 증식을 억제할 뿐만 아니라, DC의 HIV-1 감염을 효과적으로 억제하기도 한다. 이러한 발견은 CD4 독립성 HIV가 DC에 도입되는 과정을 이해하는 데에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 1차 면역 반응을 개시하는 데에 있어서 DC-SIGN의 역할에 새로운 영향을 미친다.

<86> 실시예 1 : ICAM-3에 대한 DC의 부착은 인테그린에 의하여 막개되지 않는다.

- <87> 1차 DC-T 세포 접촉에 있어서 ICAM-3 매개성 부착 현상의 역할을 관찰하였다. 형광 비드 피복된 ICAM-3-Fc 키메라(Geijtenbeek의 다수 공저), DC의 수용력, 허지 말초 혈액 림프구(PBL) 및 상기 인테그린 리간드에 결합하는 단핵구를 포함하는 신규의 훌립 세포 계측 부착 검정법을 이용하여 실험을 수행하였다. IL-4 및 GM-CSF 존재하에서 7 일 동안 단핵구를 배양한 후 얻어진 미성숙 DC는 사전에 β 2 인테그린을 활성화시키지 않은채로 ICAM-3에 강하게 결합하였다(72%, 도 1a). 도 1은 DC와 ICAM-3의 부착이 Ca^{2+} 의존성이며 인테그린 비의존성이라는 사실을 나타내는 것이다. 도 1a, 1b 및 1c에서는 3 가지 이상의 대표적인 실험 결과를 나타내는 것이다 (SD < 5%).

<88> 도 1a : 백혈구의 ICAM-1 및 ICAM-3 와의 자발적 부착률.

<89> 분리된지 얼마 안되는 PBL, 단핵구 및 DC를 30 분 동안 37°C에서, ICAM-1Fc 또는 ICAM-3Fc 형광 비드와 함께 항온처리하였다. 이를 세정한후, 비드와 결합한 세포의 %를 훌립 세포 계측법으로 측정하였다.

<90> 도 1b : β 2 인테그린 활성화 이후의 ICAM-3에 대한 백혈구의 부착률.

<91> 980 nM의 PMA 또는 항 β 2 인테그린 항체 KIM185 (10 μ g/ml)의 존재하, 37°C에서 30 분 경과후 형광성 ICAM-

3Fc 비드의 결합 여부를 측정하였다. PMA 활성화 이후 LFA-1 특이적 부착이 억제되는지 여부에 관하여는 차단된 항 LFA-1 항체 NKL-L15 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재하에서 측정하였다.

<92> 도 1c : β 2 인테그린 (NKI-L19), β 1 인테그린(AIIB2), ICAM-3(CBR-IC3/1, CBR-IC3/2)에 대한 차단 항체(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 EDTA(5mM) 또는 EGTA(5mM)의 존재하에서 ICAM-3에 대한 DC의 부착. 상기 부착 여부는 도 1a에 나타낸 바와 같이 측정하였다.

<93> ICAM-3와 DC의 자발적 결합은 단핵구의 경우보다 강하였으며, 반면에 휴지 PBL(resting PBL)은 ICAM-3와 거의 결합하지 않았다(도 1a). ICAM-3에 DC가 부착되는 것은 어떠한 항 α L 또는 항 β 2 인테그린 항체로도 차단되지 않았다(도 1a). 이와는 반대로, ICAM-3에 단핵구가 부착되는 것은 항 α L 항체에 의하여 차단되는 것으로 보아 LFA-1의 존성이다. 기타 β 2 인테그린 일원들(α D β 2, α M β 2, α X β 2; 이에 관한 데이터는 나타내지 않음)에 의하여 유도된 항체 또는 기타 인테그린(β 1, β 7 인테그린, 도 1b) 어느 것도 DC와 ICAM-3의 부착을 차단하지 않았던 것으로 보아, ICAM-3에 DC가 결합하는지 여부는 인테그린의 존성이라는 결론을 도출해 낼 수 있었다.

<94> DC와 ICAM-3-Fc 비드의 상호 작용은 ICAM-3 특이적인데, 왜냐하면 본 발명의 항 ICAM-3 항체들, CBR3/1, CBR3/2 그리고 상기 양 항체들의 조합체가 상기 부착을 상당한 정도로 억제할 수 있기 때문이다(도 1b). 놀랍게도, DC 및 ICAM-3의 부착은 EDTA 및 EGTA에 의하여 완벽하게 차단될 수 있었다(도 1b).

<95> 이러한 발견은 DC가 β 1 또는 β 2 인테그린 패밀리에 속하지 않는 Ca^{2+} 의 존성 표면 수용기를 통하여 DC가 ICAM-3와 결합하는 것을 강력하게 뒷받침해 주는 증거가 된다. 상기 분자를 다음과 같이 표시하였다 : DC-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin (DC-SIGN).

<96> 실시예 2 : DC-SIGN에 대한 항체는 DC-ICAM-3 상호 작용을 억제한다.

<97> DC-SIGN을 더욱 상세히 설명하기 위하여, ICAM-3 결합 수용기에 대한 항체의 생산을 증가시켰다. DC로 면역화된 마우스의 비장을 SP2/0 골수종 세포와 융합시켜 결과로 형성된 림프 잡종 세포종의 상등액으로 DC와 ICAM-3의 특이적 부착을 억제할 수 있는 항체의 존재 여부에 관하여 스크리닝하였다. 2개의 림프 잡종 세포들을 선택한 후, 클로닝하여 결과로 형성된 항체들을 각각 AZN-D1 및 AZN-D2로 칭하였다. 상기 정제된 항체들 모두는 DC가 ICAM-3에 부착되는 것을 강하게 억제하지만, ICAM-3에 대한 단핵구의 LFA-1 매개성 부착에는 영향을 미치지 않는다(도 2a). 도 2에서는 항체 AZN-D1 및 AZN-D2가 ICAM-3와 DC의 부착을 억제하며 DC에 의하여 특이적으로 발현되는 항원을 인지한다는 사실을 설명하고 있다.

<98> 도 2a : 단클론 항체 AZN-D1 및 AZN-D2 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)는 DC의 부착을 차단시켰지만, 형광 ICAM-3Fc 비드에 대한 분리된지 얼마 안되는 단핵구의 단클론 항체는 그렇지 않았다. 3 가지의 대표적인 실험 결과를 나타내었다 (SD < 5%).

<99> 도 2b : DC 발생 동안, DC-SIGN 발현 정도는 증가하였다. DC를 GM-CSF 및 IL-4의 존재하에서 단핵구로부터 배양하였다. 상이한 시점에서 발생된 DC가 단핵구 마커인 CD14, β 2 인테그린 LFA-1 및 DC-SIGN을 발현시키는지 여부에 관하여 분석하였다. 세포들을 전측 산란시켜 차단하였으며, 이때의 평균 형광도를 히스토그램의 상부 우측 코너에 나타내었다. 3 가지의 대표적인 실험 결과를 나타내었다.

<100> 도 2c : GM-CSF 및 IL-4의 존재하에서 단핵구로부터 발생된 DC가 ICAM-3와 DC-SIGN의 존성 방식으로 부착되는 정도는 점차적으로 증가하였다. 상이한 시점의 세포 배양액으로부터 각각의 세포들을 수집한 후, 이들을 차단성 항 β 2 인테그린 항체인 AZN-L19 또는 AZN-D1 항체 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재하에서 형광성 ICAM-3Fc 비드와 함께 항온 처리하였다. 부착률을 도 1에 기술된 바와 같이 측정하였다. AZN-D2는 AZN-D1과 유사하게 ICAM-3와의 부착을 억제하였다(결과는 나타내지 않음). 3 가지의 대표적인 실험 결과를 나타내었다(SD < 5%).

<101> 도 2d : DC의 발생에 따른 ICAM-3에 대한 β 2 인테그린 및 DC-SIGN 매개성 부착의 상대적 분포율. 상대적 분포율은 도 2c에 나타낸 바와 같은 AZN-D1 또는 AZN-L19의 존재하에서 계산하였다.

<102> 훌럼 세포 계측 분석법에서 AZN-D1 항체를 사용하면 DC-SIGN이 단핵구에 의하여 발현되지 않는다는 사실을 알 수 있다(도 2b). DC-SIGN 발현 세포들은 배양 후 1일 경과시부터 검출될 수 있었다. DC-SIGN의 발현 정도는 배양 기간 중에 증가하였다(도 2b). 단핵구 마커 CD14의 발현은 CD14 발현율이 저하되는 7일 경과시에 감소되었다(도 2b). 추가의 훌럼 세포 계측 분석법을 추가로 실시한 결과, 7일 경과시의 세포들 또한 MHC I 군, II 군, β 2 인테그린 p150, p95 및 CD86(데이터는 나타내지 않음)를 높은 수준으로 발현시켰다는 사실을 알아냈는데, 이는 미성숙 DC에서의 단핵구 분화와 일치하였다. 이러한 결과들로 DC-SIGN이 7일 경과시에 DC에 의하여

다양으로 발현되었으며, 이러한 발현 수준은 LFA-1의 경우보다 몇배나 더욱 높다는 것을 알 수 있었다.

<103> 이와 동시에, 단핵구 세포가 미성숙 DC로 분화될 때, ICAM-3 결합에 DC-SIGN 이 관여한다는 사실이 밝혀졌다(도 2c). 배양 개시시(0 일 경과) 단핵구에 의한 ICAM-3의 결합은, 차단 항 $\beta 2$ 인테그린 항체 L19와 부착되는 경우 억제되는 것으로부터 알 수 있는 바와 같이(도 2c), 완전히 $\beta 2$ 인테그린(LFA-1) 의존성이다. DC-SIGN 이 낮은 수준으로 발현되는 때인 1 일 경과시(도 2b), ICAM-3 특이적 부착은 $\beta 2$ 인테그린(LFA-1) 및 DC-SIGN (도 2c) 모두에 의존적이다. ICAM-3 특이적 부착율이 증가하는 때인 2 일 내지 7 일 경과시, 항 DC-SIGN 이 상기 부착을 완전히 차단하였기 때문에, 이는 $\beta 2$ 인테그린 비의존성(도 2c)이었으며, 2일 경과시에는 DC-SIGN 에 의해서만 매개되었다. DC-SIGN 을 통한 부착율은 7일 경과시에 최대였다(도 2c).

<104> 상기 결과들을 종합하여 본 결과, DC-SIGN 발현의 증가는 ICAM-3 결합이 증가하는 것과 일치하였다는 사실을 알 수 있었다(도 2a 및 2b). 이러한 사실로부터 항체 AZN-D1 및 AZN-D2에 의하여 인지되는 DC-SIGN은 DC에 의하여 발현되는 신규의 ICAM-3 결합 수용기라는 사실을 알 수 있었다.

<105> 실시예 3 : DC-SIGN 은 44kDa 의 단백질이다.

<106> DC-SIGN의 분자량에 관한 정보를 얻기 위하여, DC-SIGN을 ^{125}I -표면 라벨링된 DC의 용균물로부터 면역 침전시켰다. 환원 조건하에서 SDS-PAGE 분석법을 수행하여 44kDa의 단일 단백질을 동정하였다(도 3a, 레인 1~2). 도 3은 DC-SIGN이 인간 태반 HIV gp120 결합 C 형 렉틴과 동일하다는 것을 나타내는 것이다.

<107> 도 3a : DC-SIGN 은 44kDa 였다. DC 는 ^{125}I 로 표면 라벨링된 것으로서, 용균물 및 DC-SIGN 은 항 DC-SIGN 항체인 AZN-D1(레인 1), AZN-D2(레인 2) 및 AZN-L19(항 $\beta 2$ 인테그린 ; 레인 3)으로 면역 침전되었다. SDS-PAGE에 의하여 상기 면역 침전물을 분석하였으며(5~15% 겔) 이후 방사선 사진 촬영을 하였다. 분자량 마커의 이동을 좌측에 표시하였다. 화살표는 LFA-1(α L, 180 kDa), MAC-1(α M, 165 kDa) 및 p150, p95(α X, 150 kDa), $\beta 2$ 인테그린 사슬(95 kDa) 및 DC-SIGN (44 kDa)의 α 사슬들을 나타내는 것이다. 실험을 3 회 더 수행하여 유사한 결과를 얻어 냈다.

<108> 도 3b : 인간 DC로부터 분리된 DC-SIGN의 개략도. 2개의 박스 내부에 나타낸 웹타이드들(인간 태반 gp120 결합 C 형 렉틴의 아미노산 위치 : 296~306 번 위치 및 187~197 번 위치)을 Edman 분해법을 사용하여 면역 침강된 DC-SIGN 를 내부 웹타이드 시퀀싱함으로써 동정하였다. 이후 상기 cDNA 암호화 DC-SIGN을 DC로부터 분리하였다. 이때 추론된 아미노산 서열은 인간 태반 gp120 결합 C 형 렉틴의 아미노산 서열과 100% 동일하였다. 막 통과 지역, 렉틴 도메인 및 7개의 완전 반복 부위 및 8개의 부분 반복 부위(R1~R8)를 도시하였다.

<109> 비활원성 SDS-PAGE 겔상에서의 면역 침전 분석법을 통하여, DC-SIGN 은 단량체로서 존재한다는 사실을 알 수 있었다(결과는 나타내지 않음). 뿐만 아니라, ICAM-3-Fc 피복된 비드를 사용한 경우에도 DC 용균물로부터 44 kDa 단백질이 추출될 수 있었던 반면에, 차단 항 DC-SIGN 항체의 존재하에서 상기 단백질은 ICAM-3-Fc 피복된 비드를 사용하여도 침전되지 않았다(결과는 나타내지 않음). 이러한 결과는 곧 DC-SIGN 이 환원 조건하에서 44 kDa 단백질인 DC에 의하여 발현된다는 사실을 입증하는 것이다. ICAM-3 Fc 커플링된 비드만이 DC 용균물로부터 44 kDa 의 단백질을 추출해낼 수 있다는 사실은 DC-SIGN 이 ICAM-3 에 대해서 친화도가 높고, 또한 DC 에 의하여 발현되는 LFA-1 또는 α DB β 보다 더욱 친화도가 높다는 것을 의미하며(도 3a), 이것이 ICAM-3 와 결합한다는 사실이 보고된 바 있다(Vandervieren 외 다수 공저, Immunity.3, 683-690, 1995). DC-SIGN 에 비하여 매우 소량의 LFA-1 가 면역 침전되는 것으로 보아(도 3a, 레인 1 및 3), 상기 LFA-1 보다 DC-SIGN이 DC 에 의하여 더욱 왕성하게 발현된다는 사실을 알 수 있었다. 이와 함께, 상기 데이터들은 DC-SIGN이 44 kDa의 단일 폴리웹타이드이며 DC상의 ICAM-3 에 대한 1차 수용기라는 사실을 말해주는 것이다.

<110> 실시예 4 : DC-SIGN 은 인간 HIV gp120 결합 C 형 렉틴과 동일하다.

<111> DC-SIGN 을 동정하기 위하여, 항 DC-SIGN 항체 AZN-D1으로 DC 용균물로부터 예비 면역 침전시킨후 SDS-PAGE 겔로부터 44 kDa 의 단백질을 잘라냈다. 이후 트립신 분해를 수행하였으며 그 결과로 생성된 웹타이드를 상기 겔로부터 추출하여 예비 HPLC 를 사용하여 정제하였다. 이후 Edman 분해 방법을 통하여 2개의 웹타이드(0.5~1 pmol)의 아미노산 서열들을 측정하였다. 11개의 아미노산 잔기로 이루어진 웹타이드(도 3b) 및 웹타이드 서열들을 사용하여 공지된 단백질들과의 상동성에 대한 EMBL 데이터베이스를 스크리닝하였다. 상기 양 웹타이드들은 모두 인간 HIV gp120 결합 C 형 렉틴의 추론된 아미노산 서열과 100% 동일한 것으로 판명되었다(Curtis 외 다수, 1992). 상기 단백질은 이미 태반에서 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 피막 당단백질 gp120 에 대한 CD4 독립성 수용기로서 동정된 바 있다.

- <112> 상기 gp120 결합 C 형 렉틴 서열을 기초로 하는 프라이머를 사용하여 DC로부터 분리된 RNA에 대하여 RT-PCR 분석법을 수행한 결과, 예상 길이인 1237 nt의 PCR 생성물을 얻었다. 상기 DC 특이적 PCR 생성물을 클로닝후 시퀀싱한 결과 인간 gp120 결합 렉틴과 100% 동일하다는 것을 확인하였다(도 3b). 태반 gp120 결합성 C 형 렉틴을 암호화하는 cDNA로 트랜스펙션된 COS7 세포들을 훌림 세포 계측 분석법으로 분석한 결과, 상기 gp120 결합성 C 형 렉틴이 실질적으로 DC-SIGN과 동일하다는 사실을 확인할 수 있었다(도 4a). 도 4는 COS7 세포들내에서 과발현된 DC-SIGN은 항 DC-SIGN 항체 AZN-D1에 의하여 인지되며 ICAM-3 와 결합한다는 사실을 보여주는 것이다.
- <113> 도 4a : AZN-D1은 DC-SIGN을 암호화하는 cDNA로 트랜스펙션된 COS7 세포를 인지하였으며(폐쇄 부분), 트랜스펙션된 COS7 세포를 모의하지는 않았다(개방 부분). AZN-D2 도 이와 유사하게 염색되었다(결과는 나타내지 않음).
- <114> 도 4b : ICAM-3 와 COS7-DC-SIGN 의 부착. COS7 세포를 트랜스펙션시킨후, 부착 여부를 각각 도 1a에 나타낸 바와 같이 측정하였다.
- <115> EGTA(5 mM) 및 DC-SIGN(AZN-D1), ICAM-3 (CBR-IC3/1, CBR-IC3/2) 및 β 2 인테그린(AZN-L19)의 존재하에서 ICAM-3 와 COS7-DC-SIGN 세포들의 부착 여부를 측정하였다. 3 가지의 대표적인 실험 결과를 나타내었다 (SD < 5%).
- <116> 트랜스펙션된 COS7 세포의 약 30% 정도가 항 DC-SIGN 항체로 염색된 것으로보아 DC-SIGN을 발현시킨 것을 알 수 있었다. 더욱이, 상기 COS7-DC-SIGN 세포는 ICAM-3 와 결합할 수 있었던 반면에 트랜스펙션된 COS7 세포의 모사체는 ICAM-3 와 결합할 수 없었다(도 4b). COS7에 의하여 발현된 DC-SIGN의 결합은 ICAM-3 및 DC-SIGN에 대한 항체에 의하여 완전히 억제될 수 있었으며, EGTA 가 상기 부착을 완전히 차단한 것으로보아 이는 Ca^{2+} 의존성이었다(도 4b).
- <117> DC(DC-SIGN)에 의하여 발현된 ICAM-3 결합 수용기는 태반 HIV gp120 결합 C 형 렉틴 (Curtis 외 다수, 1992), 3개의 도메인으로 이루어진 404 a.a의 II형 막 통과 단백질과 동일하다는 결론을 얻었다. 40 a.a 잔기의 N 말단 세포질 도메인은 거의 동일한 서열의 7개의 완전한 반복 배열 부위와 1개의 불완전한 반복 배열 부위로 이루어진 지역과 분리되어 있다. 잔류하는 C 말단 지역 (Cys253-Ala404)은 Ca^{2+} 의존성(C 형) 렉틴과 상동성을 갖는 것으로 나타났다(도 3b).
- <118> 실시예 5 : DC-SIGN은 DC에 의하여 특이적으로 발현된다.
- <119> AZN-D1/D2 항체를 사용하여 조혈 세포의 외부 패널을 훌림 세포 계측 분석법을 수행한 결과, 상기 항원은 DC에 의하여 바람직하게 발현된다는 사실을 알 수 있었다(표 1). 시험된 모든 조혈 세포들은 DC의 경우를 제외하고는 DC-SIGN 발현에 대하여 음성적이었다. 더욱이, RT-PCR 분석법을 통하여 DC-SIGN 을 암호화하는 mRNA 는 DC-SIGN 단백질의 발현 패턴에 따른 DC에서 특이적으로 전사된다는 사실을 확인할 수 있었다(표 1).
- <120> 생체내에서의 DC-SIGN의 발현을 더욱 상세히 관찰하기 위하여, 2차 림프 조직을 사용하여 항 DC-SIGN 항체로 면역 해부 화학적 분석법을 수행하였다. 상기 조직들은 수상 세포를 함유하는 것으로 공지되어 있다. 편도선 및 림프 소절의 검편들은 DC-SIGN 발현 세포들을 함유하였는데, 이들은 편도선 및 림프 소절 모두의 T 세포 지역에서 매우 양호하게 관찰되는 것이었다(도 5). 도 5는 DC-SIGN의 조직내 분포를 나타내는 것이다 : 편도선 및 림프 소절 검편내 DC-SIGN 발현의 면역 해부 화학적 분석법(OM $\times 100$). 검편을 아세톤으로 고정시키고 해마테인으로 핵을 염색하였다. AZN-D1으로 DC-SIGN 을 염색하였다. 아세포 중심(GC), T 세포(T) 및 B 세포(B) 지역을 나타내었다.
- <121> 수상 세포의 분포 및 형태와 동일하게, DC-SIGN 발현 세포는 림프 조직의 아세포 중심 및 외투 지역에서는 검출되지 않았다(도 5). CD3 및 CD14의 검편들을 염색한 결과 DC-SIGN 발현 세포는 상기 세포들의 훌림 세포 계측 분석법 및 RT-PCR 모두에 의하여 나타내어 지는 바와 같이, T 세포 및 단핵구(데이터는 나타내지 않았음)와 뚜렷이 구별되었다(표 1).
- <122> 실시예 6 : DC-SIGN/ICAM-3 상호 작용은 일시적 DC-T 림프구의 클러스터 형성을 매개한다.
- <123> DC-SIGN 의존성 방식으로 ICAM-3 발현 감염체에 DC 가 결합하는 것을 설명하기 위하여, ICAM-3 를 암호화하는 cDNA로 트랜스펙션된 백혈병 세포주 K562가 DC에 결합하는 능력을 관찰하였다. 도 6a에 나타낸 바와 같이, 상기 상호 작용은 항 DC-SIGN 항체에 의하여 차단될 수 있기 때문에, DC 는 DC-SIGN 의존성 방식으로 K562-ICAM-3 와 클러스터를 형성하였다. DC 와 K562 사이에서는 클러스터 형성을 관찰할 수 없었는데, 이는 ICAM-3 가 DC-

SIGN에 대한 리간드라는 것을 말해주는 것이다. 도 6은 DC와 ICAM-3의 DC-SIGN 매개성 부착이 DC-T 림프구 상호 작용과 관련이 있다는 사실을 말해주는 것이다.

<124> 도 6a : DC와 ICAM-3의 DC-SIGN 매개성 부착은 원형 세포 골격 의존성이다. 시토칼라신 D의 존재하에서 차단 DC-SIGN 항체 AZN-D1과 함께(-□) 또는 이것 없이(-●) DC가 ICAM-3 비드와 부착되는지 여부를 측정하였는데, 이는 다양한 농도하에서 적정된 것이었다. 2 가지의 대표적인 실험 결과를 나타내었다 (SD < 5%).

<125> 도 6b : K562-ICAM-3 세포와 DC의 이형성 세포의 클러스터 형성. ICAM-3를 암호화하는 cDNA로 안정하게 트랜스펙션된 K562 및 K562 세포들(K562-ICAM-3)을 적색 염료인 HE(히드로에티딘)으로 라벨링하였다. DC를 녹색 염료인 SFDA로 라벨링하였다. 37°C에서 차단 항 DC-SIGN 항체의 존재하 또는 부재하에서, K562 및 K562-ICAM-3을 DC(50×10^3 cells/cell type)와 함께 항온 처리하였다. 각각 상이한 시점에서 상기 세포들을 파라포름알데히드(0.5%)로 고정시킨 후 상기 이형성 세포의 클러스터 형성을 훌림 세포 계측 분석법으로 측정하였다. 2 가지의 대표적인 실험 결과를 나타내었다.

<126> 도 6c : 휴지 PBL과 DC의 동적 세포 클러스터 형성은 DC-SIGN에 의하여 매개되는 것이다. DC(50×10^3 cells)를 실온에서 10분 동안 항 DC-SIGN 항체인 AZN-D1 및 AZN-D2($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)의 존재하 또는 부재하에서 예비 항온 처리하였다. 형광 염료인 Calcein-A로 라벨링시킨 동종 PBL(1×10^6 cells)($25 \mu\text{g}/10^7$ cells/mL, 37°C 및 30분 동안)을 첨가한 후 상기 세포 혼합물을 37°C에서 항온 처리하였다. 클러스터 형성 여부를 훌림 세포 계측법으로 측정하였다. 2 가지의 대표적인 실험 결과를 나타내었다.

<127> 도 6d : DC-SIGN-ICAM-3 상호 작용은 DC 유도성 T 세포 증식에 중요한 역할을 한다. 동종 반응자 T 림프구(100×10^3)를 LFA-3(TS2/9) 및 DC-SIGN(AZN-D1, AZN-D2)에 대한 차단 항체($20 \mu\text{g}/\text{mL}$)의 존재하에서 DC-자극제(1.5×10^3)에 첨가하였다. 이후 상기 세포들을 4일 동안 배양하였다. 배양 후 4일 경과시 세포들을 6시간 동안 [^3H] 메틸-티미딘으로 펄스를 가한 후 이의 흡수율을 측정하였다. 결과를 3개의 웰로부터 얻은 CPM의 평균 %로 나타내었다.

<128> DC-SIGN의 의존성 클러스터 형성은 일시적인 것으로서, DC-SIGN-ICAM-3 상호 작용을 DC가 능동적으로 조절할 수 있는, 60분 경과시의 시점에서 최대였다. 뿐만 아니라, 이러한 현상은 TCR 점령 후 상호 작용이 강화될 때까지 DC가 다수의 원형 T 세포와 일시적으로 상호 작용할 수 있도록 만든다.

<129> 이에 관하여 시험하기 위해서 DC와 T 세포의 클러스터 형성 여부가 DC-SIGN에 의하여 매개되는지 여부와 상기 상호 작용 또한 일시적인 것인지 여부를 관찰하였다. DC를 휴지 동종 T 세포(DC:T 세포, 1:20)와 함께 항온 처리한 후 DC-T 세포 클러스터 형성 여부를 측정하였다. 도 6b에 나타난 바와 같이, DC와 T 세포의 클러스터 형성은 일시적인 것이며 20분 경과 후 최대(32%)에 이르렀다. 뿐만 아니라, DC-T 세포 상호 작용은 항 DC-SIGN에 의하여 억제될 수 있는데(약 50%), 이는 상기 DC-T 세포의 클러스터 형성 역시 기타 표면 수용기에 의하여 매개된다는 사실을 의미하는 것이다. 그러므로, 상기 DC-T 세포의 클러스터 형성은 실질적으로는 일시적인 것이며, 부분적으로는 DC-SIGN/ICAM-3 상호 작용에 의하여 매개되는 것이었다. 이와 유사하게, 도 8은 DC-SIGN이 ICAM-3를 암호화하는 cDNA를 발현하는 K562 세포와 함께 결합할 뿐만 아니라, ICAM-3를 암호화하는 cDNA를 발현하는 K562 세포에 결합하며, 상기 결합은 만난 및 DC-SIGN 항체에 의하여 억제될 수 있었다.

<130> 실시예 7 : 동종 DC에 의하여 유도되는 휴지 T 세포의 증식은 DC-SIGN의 의존성이다.

<131> ICAM-3와 DC-SIGN의 결합 여부가 DC와 T 세포의 클러스터 형성에 중요한 비중을 차지하므로, DC 유도성 T 세포 증식에 있어서의 DC-SIGN의 역할에 관해서도 연구하였다. 휴지 T 림프구를 차단 항 DC-SIGN 항체의 존재하 또는 부재하에서 동종 DC로 자극시켰다. 도 6c에 나타낸 바와 같이, 항 DC-SIGN 항체인 AZN-D1 및 AZN-D2는 모두 T 림프구의 증식을 75% 이상 억제하였다. 이와 유사하게, T 세포상의 CD2와 결합하여 T 세포 증식을 매개하는 것으로 공지되어 있는 공동 자극 분자 LFA-3에 대한 항체도 T 세포 증식을 억제하였다. 항 LFA-3 및 항 DC-SIGN 항체를 조합 사용하면 T 세포 증식을 완전히 억제하였다(도 6c).

<132> 실시예 8 : DC-SIGN은 DC의 HIV-1 감염에 관여한다.

<133> 전술한 바와 같이 DC-SIGN은 태반 HIV gp120 결합성 레틴과 동일한 것으로서, 이는 HIV-1이 DC로 도입되는 과정을 촉진시키는 DC, DC-SIGN에 의하여 다양으로 발현된다. 이를 관찰하기 위하여, HIV-1으로 DC에 펄스를 가하였으며 이로써 DC-T 세포 공동 배양액내 증식성 감염을 측정하였다. CD4가 낮은 수준으로 발현되는 경우(Blauvelt 외 다수, 1997; Granelli-Piperno 외 다수, J. Exp. Med. 184(6), 2433-8, 1996) 및 DC-SIGN이 높

은 수준으로 발현되는 경우(도 7), IL-4 및 GM-CSF의 존재하에서 배양후 7일 경과시의 DC를 수집하였다. 도 7에 나타낸 바와 같이, DC에 2시간 동안 HIV-1으로 펠스를 가한 후 활성화된 PBMC 세포의 존재하에서 세정 및 배양하였을때, 강력한 증식성 감염이 발생하였다. DC-T 세포를 p24 Gag 단백질과 공동 배양시킨후 3일 경과시까지의 HIV-1 복제율을 측정하였는데, 이때 p24 항원은 배지(도 7)내에 축적되기 시작하였으며 이로써 HIV-1이 기타의 경우에서 나타낸 바와 유사하게, 공동 배양액내에서 효과적으로 복제한다는 사실을 입증할 수 있었다 [Blaauvelt 외 다수 공저, 1997 ; Granelli-Piperno 외 다수 공저, 1998 ; Granelli-Piperno 외 다수, *Curr Biol*. 9(1), 21-29, 1999]. 그러나, HIV-1으로 펠스를 가하기 이전의 DC를 항 DC-SIGN 항체로 예비 항온 처리한 후 다시 활성화된 PBMC로 항온 처리하였을때, HIV-1 복제는 75% 이상 억제되었으며, 이러한 현상은 T 세포와 공동 배양후 3일 또는 5일 경과시 관찰할 수 있었다(도 7). HIV-1으로 펠스를 가한후 항 DC-SIGN 항체로 DC를 항온 처리하였을때, DC-T 세포 공동 배양시 HIV-1은 효과적으로 복제할 수 있었다(도 7). 이러한 결과를 통하여 항 DC-SIGN 항체들은 HIV-1을 DC로부터 T 세포까지 전이시키지 않고, DC와 HIV-1의 결합을 억제함으로써 HIV-1의 감염을 차단한다는 것을 알 수 있었는데, 이는 DC-SIGN이 DC상에서 HIV-1에 대한 주요 수용기로서 작용한다는 사실을 시사하는 것이다. 그러므로, DC-SIGN은 DC 상에서 고도로 발현되며, ICAM-3 및 HIV-1 모두에 대한 DC 특이적 수용기로서 작용 한다.

<134>

상기 실험 결과들 중에서도, DC와 T 림프구의 초기 상호 작용은 항원 독립성이며 일시적이라는 결론을 도출해 낼 수 있다. 이러한 일시적 성질은 DC에 TCR이 증식적으로 발현될 때까지 다수의 T 세포들과 상호 작용하는 능력을 부여한다. 지금까지는, 상기 일시적 과정의 개시 기작에 관하여 명확히 밝혀진 바 없었다. 그러나, 본원에서는 신규의 DC 특이적 수용기, DC-SIGN과 ICAM-3 와의 상호 작용이 상기 일시적 DC-T 세포의 상호 작용을 매개한다는 사실을 설명하고 있다. 즉 DC-SIGN은 DC에 의하여 다량으로 발현되고, DC-SIGN은 DC상의 주요 HIV-1 수용기로서 작용한다는 사실을 나타내고 있다. HIV-1 감염 기간 동안 DC의 주요 역할은 과다 복제하여 CD4+ T 세포를 사멸시키는 HIV-1을 T 세포로 전이시킨다는 것이다[Cameron 외 다수 공저, 1992 ; Cameron: AIDS Res Hum Retroviruses 10(1), 61-71, 1994]. DC의 증식성 HIV-1 감염에 관하여는 명확히 밝혀진 바 있으며, 이는 상기 DC의 발생 단계에 의존적이다[Granelli-Piperno 외 다수 공저, 1998]. IL-4 및 GM-CSF의 존재하에서 단핵구로부터 배양된, 미성숙 DC는 M 성향 HIV-1 균주에 의하여 증식적으로 감염되는 반면에[Granelli-Piperno 외 다수 공저, 1996; Granelli-Piperno 외 다수 공저, 1998][Blaauvelt 외 다수 공저, 1997], 성숙 DC에 도입된 M 성향 및 T 성향 HIV-1은 모두 증식성 감염을 일으키지는 않았다[Granelli 외 다수 공저]. 그러나, DC의 2 가지 형에 HIV-1 가 도입되는 경우는 휴지성 또는 활성화 T 세포와 공동 감염됨에 따라서 HIV-1이 폭발적으로 증식하였다 [Granelli 1998, 1999]. 타겟 세포로의 HIV-1의 초기 감염시 발생하는 현상으로서는 수용기 결합 및 막 융합을 포함한다. 상기 과정은 피막 당단백질 gp120이 CD4와 고친화도로 결합함으로써 개시된다. 그러나, CD4 단독으로는 상기 융합을 개시하기에 충분하지는 않았으며, 이때 CCR5 및 CXCR4와 같은 케모카인 수용기들이 발생하게 될 최종 융합 단계에 있어서의 공동 수용기로서 요구된다[Littman 외 다수 공저, 1998][Dragic 외 다수, *Nature* 381(6584), 667-73, 1996 ; Feng 외 다수, *Science* 272(5263), 872-7, 1996]. DC는 CD4를 소량으로 발현시키지만 DC-SIGN은 상기 세포상에 다량으로 발현된다. 이는 DC의 증식성 감염 및 이를 포획하여 결국에는 HIV-1을 전이시키는 능력은 독립적 경로를 통하여 조절된다는 사실을 나타내는 것이다. DC의 증식성 감염은 CD4 의존성 경로에 의하여 매개되는 것인 반면에, HIV-1은 DC가 HIV-1을 T 세포로 전이시킬 수 있도록 만드는 CD4 독립성 경로를 통하여 DC에 의해서 포획된다. 항 DC-SIGN 항체와 DC를 예비 항온 처리한후 HIV-1으로 펠스를 가하여 줄 때 DC-T 세포 공동 배양에 있어서의 증식성 감염이 소멸되는 사실을 통하여 파악되는 바와 같이, 본원을 통하여 HIV-1이 DC에 도입되는 과정을 DC-SIGN이 특이적으로 매개한다는 사실을 알 수 있었다. 항 DC-SIGN 항체들은 HIV-1이 DC로 도입되는 것을 완전히 억제하지는 않았다. 이러한 DC-SIGN 독립성 경로는 아마도 DC상에서 소량 발현되는 CD4에 의해서 매개되는 것으로 추정된다. 이러한 결과들을 통하여 바이러스가 DC로 도입되는 경로는 CD4 의존성 경로 및 CD4 독립성 경로가 있다는 사실을 확인할 수 있었다. DC-T 세포 접촉을 방해함으로써 DC로부터 T 세포까지 HIV-1이 전이되는 것을 억제할 수 있다는 사실을 파악할 수 있었다[Tsunetsugu-Yokota 외 다수, 1997]. DC-T 세포 상호 작용을 억제하기 위하여 항 DC-SIGN 항체들에 HIV-1으로 펠스를 가하였을 때, 항 DC-SIGN 항체들은 HIV-1이 T 세포로 전이되는 것을 막을 수는 없었다. 상기 데이터들은 HIV-1이 DC로 도입될 때 DC-SIGN이 주요 수용기로서 사용된다는 사실을 시사하는 것이다. DC가 DC-SIGN을 높은 수준으로 발현시키고 CD4를 낮은 수준으로 발현시킨다는 사실(도 7)은 상기 HIV-1이 DC로 도입되는 과정은 DC-SIGN에 의하여 지배적으로 조절된다는 사실을 추가로 입증해 주는 것이다. DC-SIGN이 HIV-1 수용기로서 사용된다는 발견은 HIV-1가 DC로 도입되는 과정을 더욱 양호하게 정의할 수 있도록 중요한 역할을 한다. 뿐만 아니라, 항 DC-SIGN 항체 존재시 관찰되는 HIV-1 감염 억제 현상을 통하여, 바이러스 감염 및 HIV-1의 국부적 확산에 대한 치료 기술에 있어서 항 DC-SIGN 항체를 발생시킬 수 있을 것이다.

- <135> DC는 다양한 조직내에서 점점 증가하는 세포들의 이종 군집을 구성한다. 상기 상이한 군집들을 더욱 잘 한정하기 위한 다수의 노력들이 항체 합성시에 행하여 졌다. 지금까지 인간 DC 특이적 항원들을 인지하는 소수의 항체들만이 합성되었다[Hock 외 다수, *Immunol.* 83, 573-581, 1994], [de Saint-Vis 외 다수 공저, *Immunity* 9(3), 325-36, 1998], [Hart 외 다수, 1997]. 본원에서는 시험될 조혈 세포들 중 DC만이 DC-SIGN을 단백질 및 mRNA 수준에서 발현시키는 것으로 기술되어 있기 때문에, 현재는 DC-SIGN을 인간 DC 특이적 항원의 리스트에 추가시켜 놓았다(표 1). 시험관내에서 DC-SIGN은 편도선 및 림프 소절의 T 세포 지역에 존재하는 DC 하위 세트에 의하여 우세하게 발현된다. 상기 성숙 DC는 원형 T 세포 활성화에 매우 유용하다. 따라서, 시험관내 DC-SIGN 발현은 DC-T 세포의 클러스터 형성에 중요한 매개자로서의 역할을 하며 이로써 T 세포를 활성화시킨다.
- <136> 항원 제공 세포에 의하여 휴지 T 림프구가 활성화되는 단계는 후천성 면역 반응에서 상당히 중요한 단계이다. 대부분의 조직에 존재하는 DC는 항원을 포획한 후 프로세싱시켜 원형의 항원 특이적 T 세포와 상호 작용하고 이를 활성화시키는 림프 조직으로 이동시킨다. 상기 T 세포는 항원 제공 위치에 대한 케모카인에 의하여 유도된다. 최근들어, 원형의 T 세포를 면역 개시 위치로 특이적으로 끌어 들이는 DC 특이적 케모카인 DC-CK1이 동정되었다[Adema 외 다수, *Nature* 387, 713-717, 1997]. 2차 림프 조직에 도달할 때, T 세포들은 DC와 상호 작용하며 MHC 분자에 의하여 제공된 항원에 대한 TCR의 친화도가 매우 낮으며 APC 상의 특정 MHC-펩타이드 복합체의 수는 제한되어 있기 때문에, TCR과 항원 사이의 상호 작용은 일반적으로 완전한 활성화에 필요한 DC와 T-림프구 사이의 긴밀한 막 접촉을 형성하는 데에 충분하지 못하다.
- <137> LFA-1 과 접촉하는 과정은 DC상의 ICAM-3에 대하여 매우 중요한 수용기이다. 그러나, 본원에 따른 DC-SIGN을 발견함으로써 ICAM-3 결합시 그의 역할에 관해서는 현재 논란이 많다. DC 및 ICAM-3의 부착은 DC-SIGN에 의하여 완벽하게 매개된다. DC-SIGN은 LFA-1에 의한 경우보다 DC에 의하여 보다 다양으로 발현된다(도 2b). 뿐만 아니라, LFA-1은 DC상에서는 불활성화되었으며(도 2c) 그의 ICAM-3에 대한 친화도는 DC-SIGN의 그것보다 훨씬 낮았다. 상기 데이터는 DC-SIGN은 DC상의 ICAM-3에 대한 1차 수용기라는 사실을 설명해 주는 것이다. DC 상의 DC-SIGN의 역할은 항 DC-SIGN 항체들이 일시적 DC-T 세포의 클러스터 형성을 부분적으로 억제한다는 사실에 의하여 규명되었다. 그러므로, DC-SIGN은 면역 반응시 DC-T 세포의 초기의 상호 작용에서, 이미 LFA-1에 부여된 역할을 수행한다. DC-SIGN에 의하여 매개된 DC-T 세포 상호 작용의 일시적 성질은, 상기 증식성 TCR 매개성 상호 작용이 안정화될 때까지, DC가 다수의 휴지 T 세포와 상호 작용 할 수 있도록 만든다. DC-SIGN에 대한 항체들이 동종 DC 유도성 T 림프구의 증식을 억제할 수 있다는 사실을 발견함으로써 DC-SIGN-ICAM-3의 상호 작용의 중요성이 추가로 규명되었다. 더욱이, DC-SIGN 및 LFA-3에 대한 항체들의 조합물, 공기의 공동 자극 분자는 거의 완벽하게 T 림프구 증식을 억제하였다. 따라서, DC-SIGN 및 ICAM-3의 일시적 고친화도 부착은 DC 및 원형 T 세포 사이의 초기 항원 독립성 상호 작용에서 중요한 역할을 한다. 아마도, 이러한 초기의 고친화도 상호 작용은 MHC 결합성 항원에 의하여 TCR을 발현시킬 수 있도록 만들며, 결과적으로 이는 LFA-1-ICAM-1 상호 작용과 같은 DC 및 T 세포 사이의 몇몇 부착성 상호 작용을 개시하게 된다. LFA-1은 T 세포상에서 불활성화되기 때문에, DC에 의한 항원 제공 이후의 상기 TCR/CD3 복합체의 활성화는 LFA-1을 활성화시킬 것이며 그 결과 DC상에 발현된 ICAM-1에 LFA-1이 강하게 부착되도록 만든다. 중복 접촉을 통하여 DC 및 T 세포 사이의 상호 작용을 강화시키면 DC 자극자에 의하여 T 림프구가 완전히 활성화되는 결과를 가져온다.
- <138> 결과적으로, DC상의 신규의 ICAM-3 수용기를 동정하여 DC-SIGN이라 칭하였으며, 상기 수용기는 인간 DC에 의하여 특이적으로 발현되고 또한 면역 반응 개시에 필요한 초기의 일시적 DC-T 세포 상호 작용에 관여한다. 흥미롭게도, DC-SIGN은 또한 HIV 피막 단백질인 gp120와 결합하여 HIV-1이 DC로 도입되는 과정을 촉진시킬 수 있다. 본원에 개시된 사항들을 기초로 하여, 당 업계의 숙련자는 다수의 치료 및 예방 가능성을 제시할 수 있을 것이다.
- <139> 실시예 9 : 실험 방법
- <140> 실시예 9A : 항체
- <141> 다음의 항체들을 사용하였다 : KIM185(항 β 2 인테그린 ; Andrew 외 다수, *Eur.J.Immunol.* 23, 2217-2222, 1993), AZN-L19(항 β 2 인테그린), NKI-L15(항 α L ; Keizer 외 다수, *Eur.J.Immunol.* 15, 1142-1147, 1985), AIIIB2(항 β 1 인테그린 ; Da Silva 외 다수, *J.Immunol.* 143, 617-622, 1989), CBR-IC3/1 및 CBR-IC3/2 (항 ICAM-3 ; de Fougerolles 외 다수, *J.Exp.Med.* 177, 1187-1192, 1993), CD14 (WT14), CD4(WT4). BALB/c 마우스를 DC로 면역화시킨 후 림프 잡종 세포 상등액을 형광 비드 부착 검정법에 의하여 측정되는 바와 같이 ICAM-3에 DC가 부착되는 것을 차단시키는 능력에 대해서 스크리닝하여 항 DC-SIGN 항체 AZN-D1 및 AZN-D2를 얻었다.

<142> 실시예 9B : 세포

Sallusto 및 Lanzavecchia, J.Exp.Med. 179, 1109-1118 ; Romani 외 다수, J.Exp.Med. 180, 83-93, 1994 에 기술된 바와 같이 DC를 단핵구로 배양하였다. 간단히 말해서, 부착 단계를 통하여 신선한 PBMC로부터 단핵구를 분리하였다. 이후 상기 단핵구를 IL-4 존재하에서 7일 동안 배양하였다(Schering-Plough, Brussels, Belgium ; 1000 U/ml). 이때 4 일 경과시 신선한 시토킨을 첨가하였다. 7일 경과시 I 군 및 II 군 MHC, CD1a, p150,95 및 CD80의 발현의 유동성 혈구 계수 측정 분석법으로 배양된 DC의 표현형을 확인하였다. 전기 천공법(Lub 외 다수, Mol.Biol.Cell 8, 719-728, 1997)으로 K562 를 10 μ g 의 PCR II ICAM-3 R1 플라스미드(Dr. D. Simmons 제공) 및 2 μ g의 PGK-hyg 벡터(te Riele 외 다수, 1990)로 트랜스펙션시켜 ICAM-3 를 발현하는 안정한 K562 감염체(K562-ICAM-3)를 제조하였다. 이후 Figdor 외 다수, J.Immunol.Methods 68, 73-87, 1984 에 기술된 바와 같이, PBMC를 건강한 기증자의 골수로부터 원심 분리법으로 용출시켜 휴지 T 세포(>90% CD3 양성)를 얻었다.

<144> 실시예 9C : 방사능 라벨링, 면역 침전 및 단백질 서열 분석

락토페옥시다아제 방법(Pink 및 Ziegler, 1979 ; Research Methods in immunology, L. Lefkovits 및 B. Pernis eds. (New York : Academic Press), pp169-180)으로 세포 표면을 Na ¹²⁵I(Amersham, Buckinghamshire, UK)로 라벨링시켰다. 용균 완충액(1% NP-40, 50 mM 트리에탄올아민(pH 7.8), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.02 mg/ml 류펩틴)내에서 DC를 4°C, 1 시간 동안 용균시켰다. 4°C에서 15 분 동안 13,000 g 로 원심 분리시켜, 상기 용균물로부터 핵 단편을 제거하였다. 이후 예비 세정시킨 용균물을 3 시간 동안 Protein A-세파로즈 CL-4B 비드(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)에 공유적으로 커플링시킨 특정 mAb 와 함께 항온 처리하였다. 이후 Lammlie 방법의 변형법(Lammlie, Nature 227, 680-685, 1970)에 따라서, 면역 침전물을 용균 완충액으로 격렬하게 세정한후 SDS-PAGE 에 의하여 분석하였다. 이로부터 잘라낸 단백질을 트립신으로 분해한후, 결과로 얻어진 웹타이드를 정제하여 Eurosequence BV(Groningen, The Netherlands)로 서열 분석하였다.

<146> 실시예 9D : DC-SIGN을 암호화하는 cDNA 의 분리 및 발현

전체 RNA를 산성 구아니디늄 이소티오시아네이트 폐놀 클로로포름법 (Chomczynski 및 Sacchi, Anal Biochem 162(1), 156-9, 1987)으로 분리하였다. 태반 gp120 결합형 C 형 렉틴을 암호화하는 cDNA를 RT-PCR 에 의하여 DC의 전체 RNA 상에서 증폭시켰다. PCR 프라이머는 태반 gp120 결합 C 형 렉틴의 뉴클레오타이드 서열(수탁 번호 M 98457)(Curtis 외 다수, 1992)을 기초로 하는 것으로서, 뉴클레오타이드 서열(5' --> 3')들은 다음과 같았다 : XF29, AGAGTGGGTGACATGAGTG ; XR1265, GAAGTTCTGCTACGCAGGAG. 상기 PCR 단편을 pGEM-T (Promega, Madison WI)벡터로 클로닝시킨후 시퀀싱하였다. 상기 클로닝된 cDNA의 뉴클레오타이드 서열은 태반 gp120 결합 C 형 렉틴의 뉴클레오타이드 서열과 동일하였다(Curtis 외 다수, 1992). 상기 cDNA를 진핵 세포 발현 벡터인 pRc/CMV(pRc/CMV-DC-SIGN)로 클로닝시킨후, DEAE 텍스트란 방법을 사용하여 COS7 세포를 pRc/CMV-DC-SIGN 로 트랜스펙션시켰다[Seed and Aruffo, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 84, 3365-3369, 1987].

<148> 실시예 9E : 형광 비드 부착 검정법

전술한 바와 같이, 카복실레이트 변형성 TransFluorSpheres(488/645 nm, 1.0 μ g ; Molecular Probes, Eugene, OR)를 ICAM-1 Fc 및 ICAM-3 Fc로 피복시켰다[Geijtenbeek 외 다수, 1999 제출]. 간단히 말해서, 20 μ l의 스트렙타비딘(50 mM MES 완충액내 5 mg/ml)을 50 μ l의 TransFluorSpheres에 첨가하였다. 이후 30 μ l의 EDAC(1.33 mg/ml)을 첨가한후 이 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 항온 처리하였다. 이후 글리신을 첨가하여 최종 농도가 100 mM이 되도록 만들어 상기 반응을 정지시켰다. 스트렙타비딘 피복된 비드를 PBS(50 mM 포스페이트, 0.9% NaCl pH 7.4)로 3회 세정한후 150 μ l PBS, 0.5% BSA (w/v)에 재현탁시켰다. 스트렙타비딘 피복된 비드(15 μ l)를 0.5 ml PBA내 바이오틴화시킨 염소 항 인간 항 Fc Fab 단편(6 μ g/ml)에 37°C에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 이후 상기 비드를 PBS, 0.5% BSA로 세정한후 4°C의 0.5 ml 의 인간 IgG1 Fc 용합 리간드(ICAM-1 Fc, VCAM-1 Fc ; 250 ng/ml)로 밤새 동안 항온 처리하였다. 리간드 피복된 비드를 세정한후, 100 μ l PBS, 0.5% BSA 내에 재현탁시켰으며 이를 다시 4°C에 방치하였다. ICAM-1 Fc 및 ICAM-3 Fc는 인간 IgG1 Fc 단편(Dr.D.Simmons 제공)에 용합된 단백질의 세포외 부분을 구성한다. Geijtenbeek 외 다수(제출)에 의하여 기술된 방법에 따라서, 형광 비드 부착 검정법을 수행하였다. 즉, 세포들을 Tris-나트륨-BSA 완충액(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0.5% BSA ; 5 \times 10⁶ cells/ml)내에 재현탁시켰다. 50,000개의 세포들을 차단 mAb (20 μ g/ml) 존재/부재하, 실온에서 10 분 동안, 96 웰 V 형 바닥 플레이트내에서 예비 항온 처리하였다. 리간드 피복된 형광 비

드(20 beads/cell) 및 상이한 자극제/억제제들을 첨가한후 이 혼탁액을 37°C에서 30 분 동안 항온 처리하였다. 이후 이 세포들을 세정한후 100 μl TSA 내에 재현탁시켰다. 형광 비드에 결합된 세포의 %를 FACScan(Becton and Dickinson & Co., Oxford, CA)을 사용하는 유동성 세포 계수 측정법으로 측정하여 부착 여부를 평가하였다.

<150> **실시예 9F : 이형성 세포 클러스터 형성 검정법**

DC 및 ICAM-3 발현 세포들의 클러스터 형성 여부를 유동성 세포 계수 측정법으로 평가하였다. DC 및 ICAM-3 발현 세포들(2×10^6 cells/ml)을 37°C에서 각각 설포플루오세인(Molecular Probes, Eugene, OR ; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 히드로에티딘(Molecular Probes, Eugene, OR ; 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 1 시간 동안 라벨링시켰다. 세정후, DC 및 ICAM-3 발현 세포들을 혼합하고(50×10^3 cells/ml) 이를 37°C에서 항온 처리하였다. 각각 상이한 시점에서 세포들을 파라포름알데히드(0.5%)로 고정시킨후, FACScan(Becton and Dickinson & Co., Oxford, CA)을 사용하는 유동성 세포 계수 측정법으로 이형 세포의 클러스터 형성 여부를 측정하였다.

<152> DC와 휴지 T 세포 사이의 클러스터 형성 여부를 상이한 방법으로 평가하였다. DC(50×10^3 cells)를 실온에서 10 분 동안, 항 DC-SIGN 항체인 AZN-D1 및 AZN-D2 (10 g/ml)의 존재하/부재하에서 예비 항온 처리 시켰다. 형광 염료인 Calcein-A로 라벨링시킨(Molecular Probes, Eugene, OR ; 25 $\mu\text{g}/10^7$ cells/ml, 30 분 동안, 37°C) 동종 PBL(1×10^6 cells)를 첨가한후 이 세포 혼합물을 37°C에서 항온 처리하였다. 이후 FACScan(Becton and Dickinson & Co., Oxford, CA)을 사용하는 유동성 세포 계수 측정법으로 형광 T 세포에 결합된 DC의 %를 측정함으로써 클러스터 형성 여부를 평가하였다.

<153> **실시예 9G : DC 유도성 T 세포 증식 검정법**

<154> 차단 항체(20 g/ml)의 존재하에서 동종 반응자인 T 림프구(100×10^3)를 DC 자극제(1.5×10^3)에 첨가하였다. 이후 상기 세포들을 4일 동안 배양하였다. 배양후 4일 경과시 세포들을 16 시간 동안 [^3H]메틸-티미딘(1.52 TBq/mmol, 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$; Amersham, Buckinghamshire, UK)으로 펄스를 가함후 흡수율을 정량하였다.

<155> **실시예 9H : DC의 HIV-1 감염**

<156> HIV-1 $_{\text{Ba-L}}$ 을 단핵구 유도성 대식 세포(MDM)에서 고적정 농도로 생장시켰다. 상기 MDM 상의 바이러스 스톡을 적정한후 7일 경과시, p24 항원 ELISA(Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France)로 TCID₅₀을 측정한 결과, 측정값은 $10^4/\text{ml}$ 이었다. 항원으로 20 분 동안 실온에서 예비 항온 처리시킨, DC(50×10^3)에 2 시간 동안 야생형 HIV-1 $_{\text{Ba-L}}$ 으로 펄스를 가한후(10^5 세포당 10^3 감염 유니트 감염 증식) 세정하고, 이를 PHA/IL-2 활성화된 PBMC (50×10^3)와 공동 배양하였다. DC-T 세포 공동 배양후 3 일 및 5 일 경과시의 상등액을 수집한후 p24 항원 ELISA(Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France)로 p24 항원 수준을 측정하였다. 이후 IL-2(10 U/ml) 및 PHA(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재하에서 이들을 배양하여 PBMC 를 활성화시켰다.

<157> **실시예 9I : 면역 해부 화학적 분석법**

<158> 편도성 및 림프 소结의 냉동 검편($8\mu\text{m}$)을 100% 아세톤(10 분)으로 고정시킨후, PBS로 세정하고, 이어서 60 분 동안 실온에서 1차 항체($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)와 함께 항온 처리하였다. 세정후, 제조자 지침에 따라서, ABC-AP Vectastain 키트(Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 사용하여 최종적으로 염색하였다. 혜마테인으로 핵을 염색하였다.

표 1

세포 형태	DC-SIGN 발현*	DC-SIGN mRNA ‡
단핵구	-	-
7일 경과시의 DC	+++	+
PBL	-	-
T 세포	-	-
B 세포	-	-
B 세포(편도선)\$	-	n.d.

흉선 림프구	-	-
과립구	-	-
CD34 ⁺ 세포	-	n.d.
PBMC(활성화된#)	-	-
T 세포주†	-	-
단핵구 세포주††	-	-

<160> * : 형광도를 의미함. - 는 <20인 경우이며, +++ 는 >400 인 경우임(AZN-D1으로 염색)

<161> ‡ : 상이한 세포로부터 분리된 전체 RNA 상의 DC-SIGN 특이적 프라이머인 XF29 및 XR1265를 사용한 RT-PCR

<162> \$: 편도선으로부터 분리된 검편

<163> # : 2 일 동안 PHA(10 μ g/ml) 및 IL-2(10 U/ml)로 활성화됨.

<164> † : T 세포주 : HSB, PEER, CEM 및 Jurkat

<165> †† : 단핵구 세포주 : THP-1, MM6 및 U937

<166> n.d. : 측정되지 않음

도면의 간단한 설명

<167> 도 1a ~ 1c 는 백혈구와 ICAM-1 및 ICAM-3의 자발적 부착률(도 1a) ; β 2 인테그린 활성화 이후 백혈구의 ICAM-3에의 부착률(도 1b) ; β 2 인테그린(NKI-L19), β 1 인테그린(AIIB2), ICAM-3(CBR-IC3/1, CBR-IC3/2)에 대한 차단 항체(blocking antibody)(20 μ g/ml), 또는 EDTA (5 mM) 또는 EGTA (5 mM)의 존재하에서 DC 및 ICAM-3의 부착률(도 1c)을 나타내는 그래프이다.

<168> 도 2a ~ 2c 는 ICAM-3 및 DC의 부착을 항체 AZN-D1 및 AZN-D2가 억제하며 이들이 DC에 의하여 특이적으로 발현된 항원을 인지하는 것을 나타내는 그래프이다.

<169> 도 3a 및 3b 는 SDS-PAGE(도 3a) 및 인간 DC로부터 분리된 DC-SIGN을 모식적으로 제공하는 인간 태반 HIV gp120 결합성 C 형 렉틴과 동일한 DC-SIGN을 나타내는 것이다.

<170> 도 4a 및 4b 는 COS7 세포에 과발현된 DC-SIGN이 항 DC-SIGN 항체인 AZN-D1에 의하여 인지되고 ICAM-3와 결합하는 것을 나타내는 것이다.

<171> 도 5 는 편도선(A 및 B)과 림프 소절 색선(C 및 D)내 DC-SIGN의 발현을 면역 해부 화학적으로 분석하여 측정된 DC-SIGN의 조직내 분포를 나타내는 것이다 (OM \times 100).

<172> 도 6a ~ 6d 는 ICAM-3에 대한 DC의 DC-SIGN 매개성 부착률(도 6a) ; K562-ICAM-3 세포와 DC의 이종성 세포 클리스터 형성률(도 6b) ; 휴지 PBL과 DC의 동적 세포 클리스터 형성률 ; 및 DC 유도성 T 세포 증식에서의 DC-SIGN-ICAM-3 상호 작용의 역할(도 6d)에 의하여 기술되는 바와 같이, ICAM-3와 DC의 DC-SIGN 매개성 부착이 DC-T 림프구 상호 작용과 관련되어 있음을 나타내는 것이다.

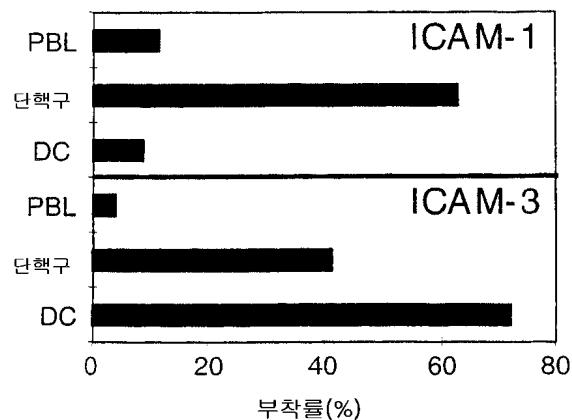
<173> 도 7 은 DC-SIGN 이 DC 상의 HIV-1 수용기임을 나타내는 것이다.

<174> 도 8 은 DC-SIGN 이 ICAM-3 및 ICAM-3 발현 K562 세포 모두에 결합되는 것을 나타내는 것이다.

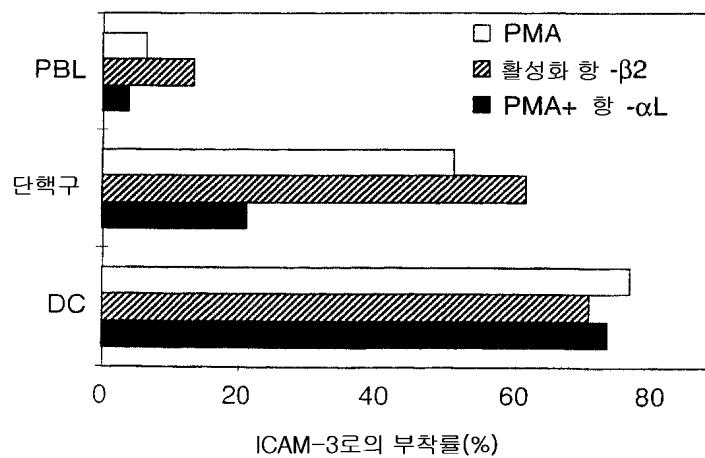
<175> 도 9 는 DC-SIGN의 서열을 나타내는 것이다.

도면

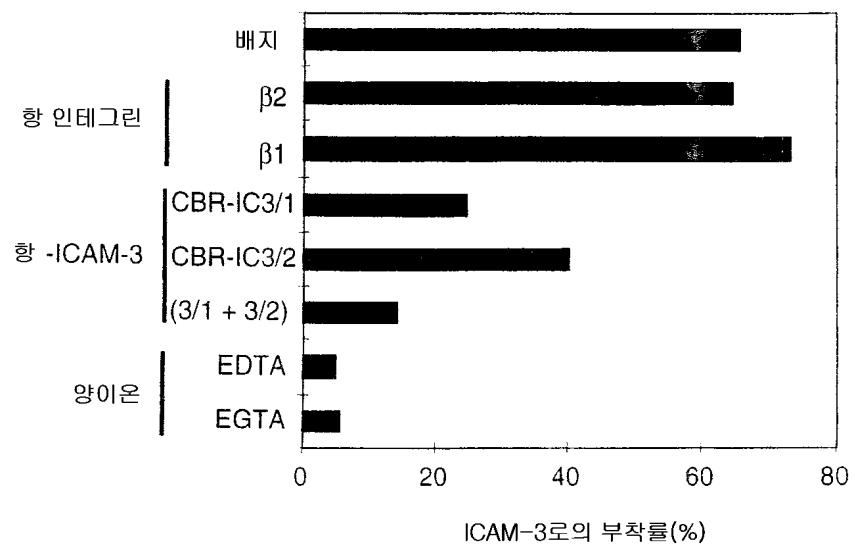
도면1a



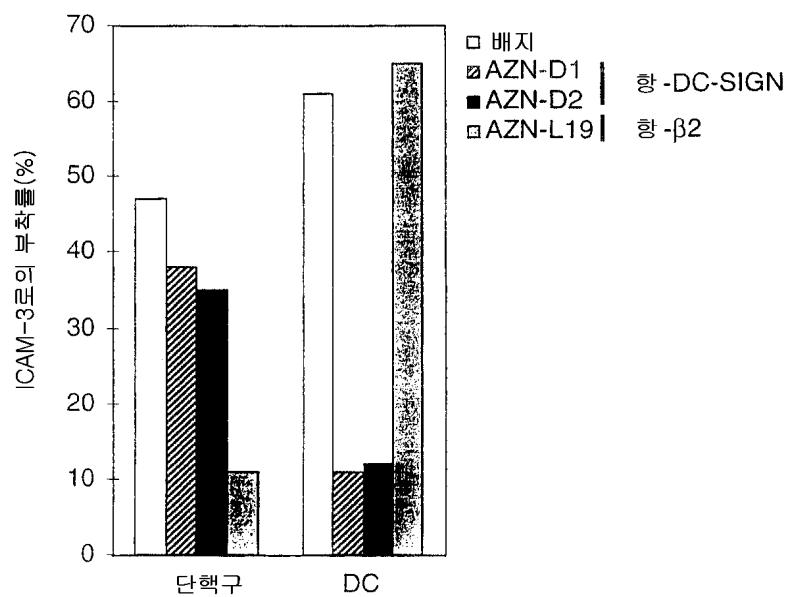
도면1b



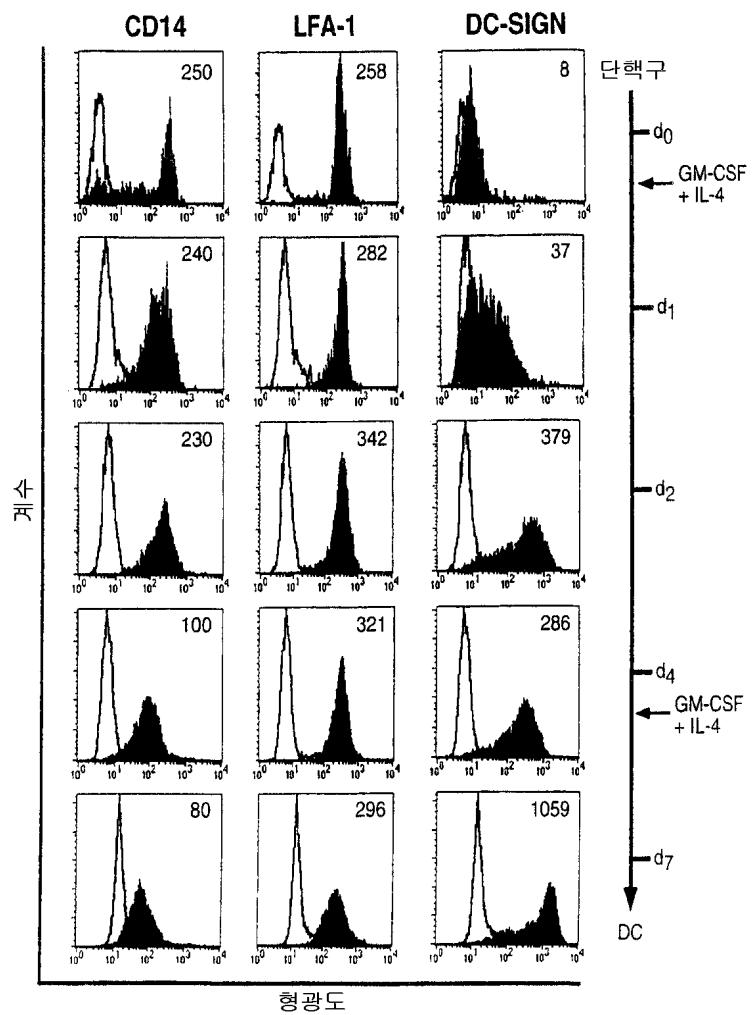
도면1c



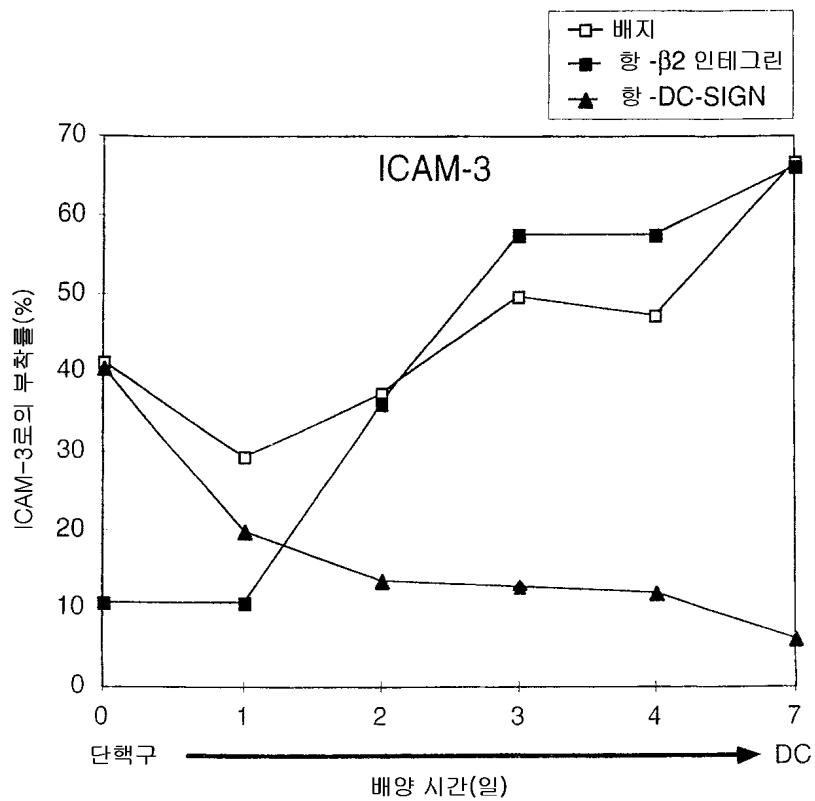
도면2a



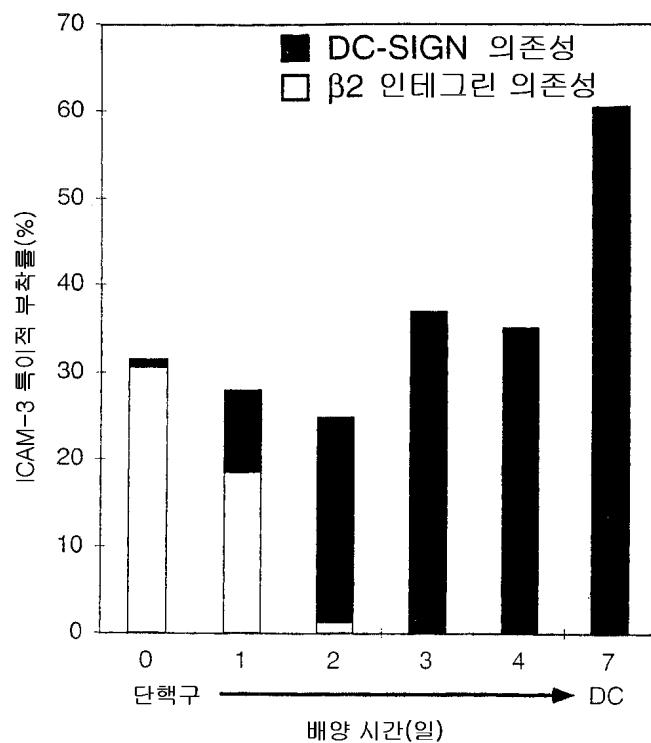
도면2b



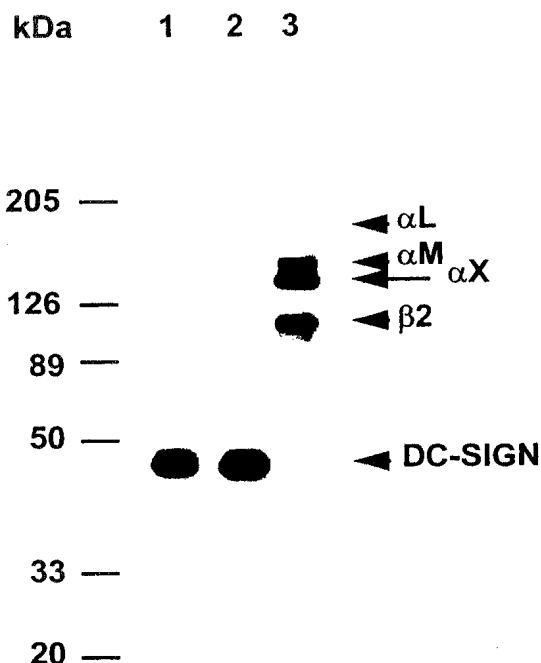
도면2c



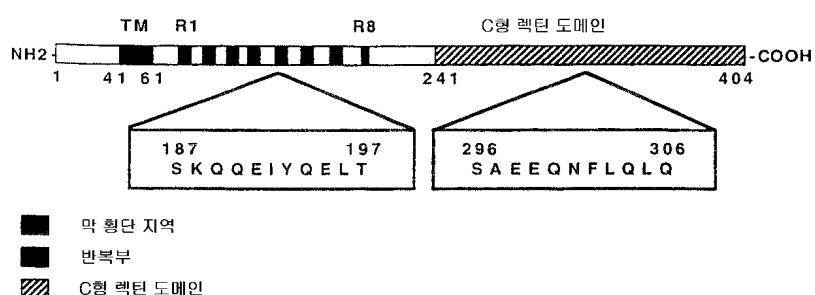
도면2d



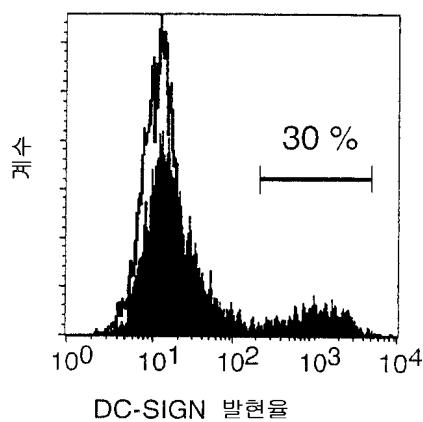
도면3a



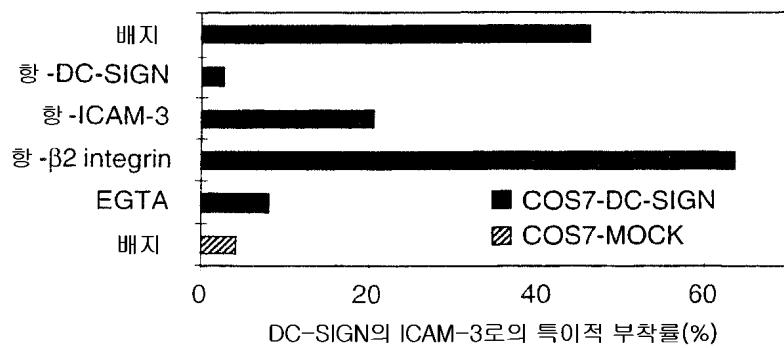
도면3b



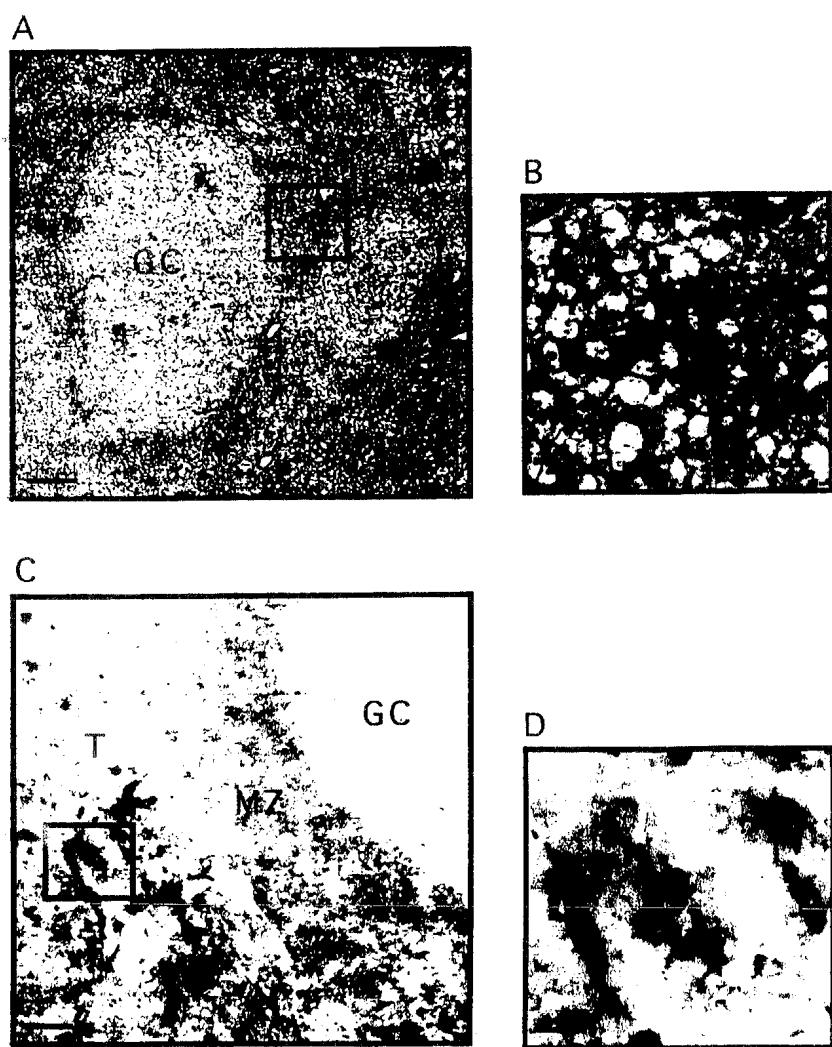
도면4a



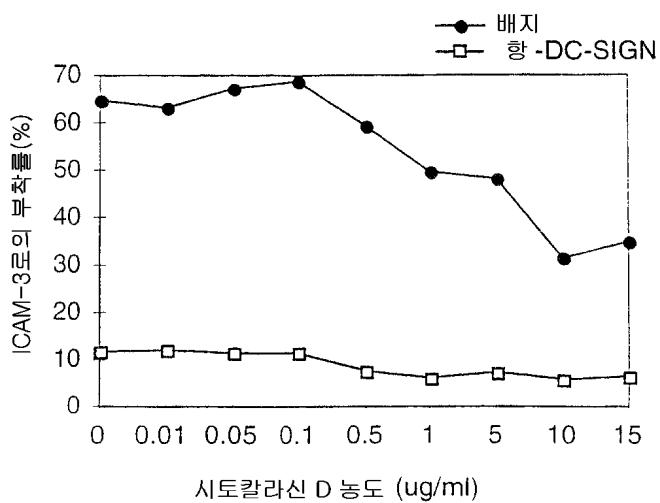
도면4b



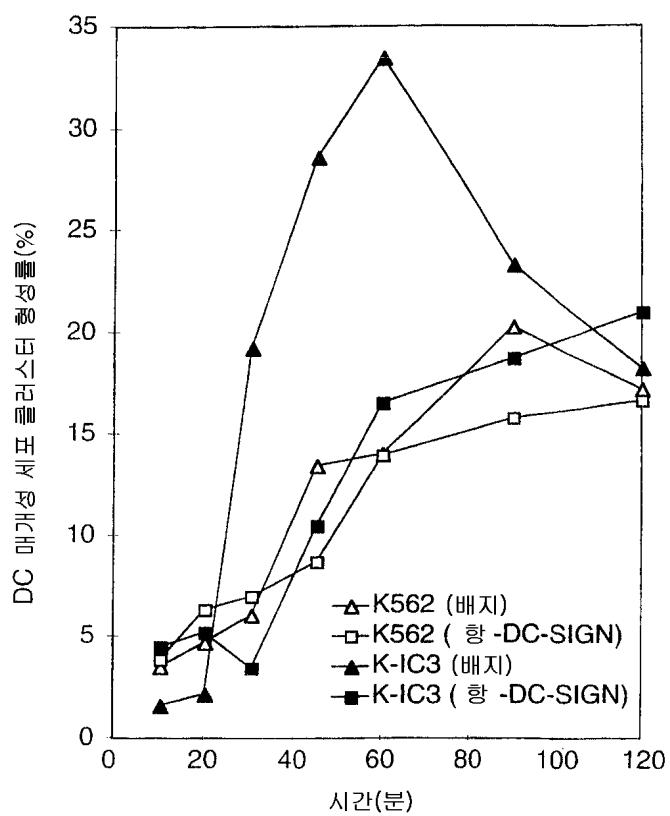
도면5



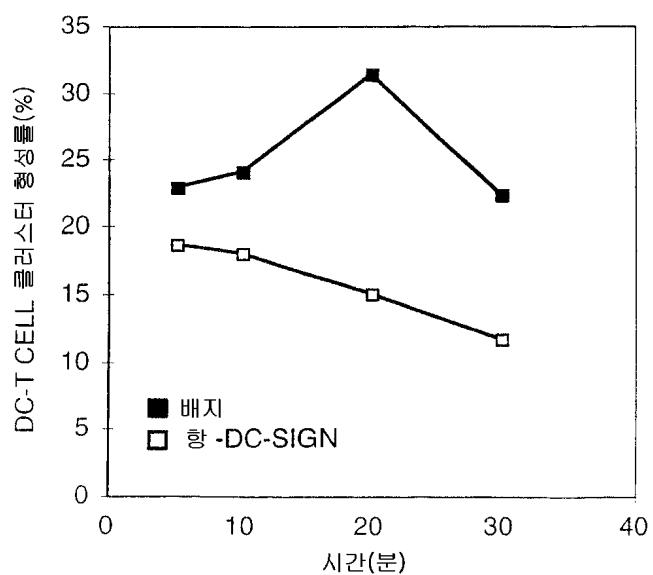
도면6a



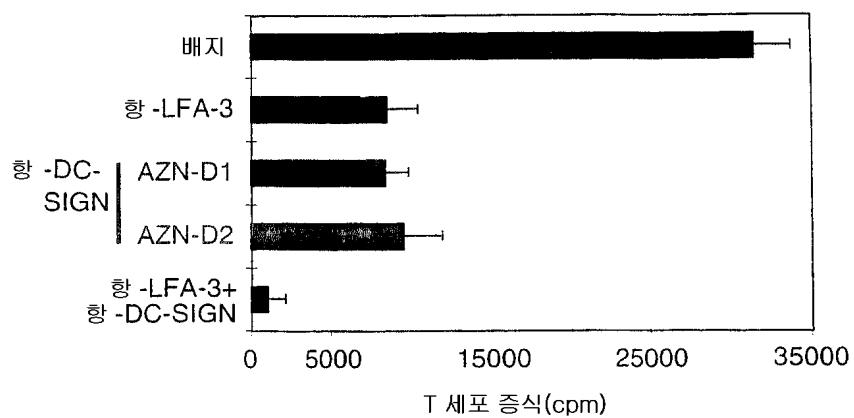
도면6b



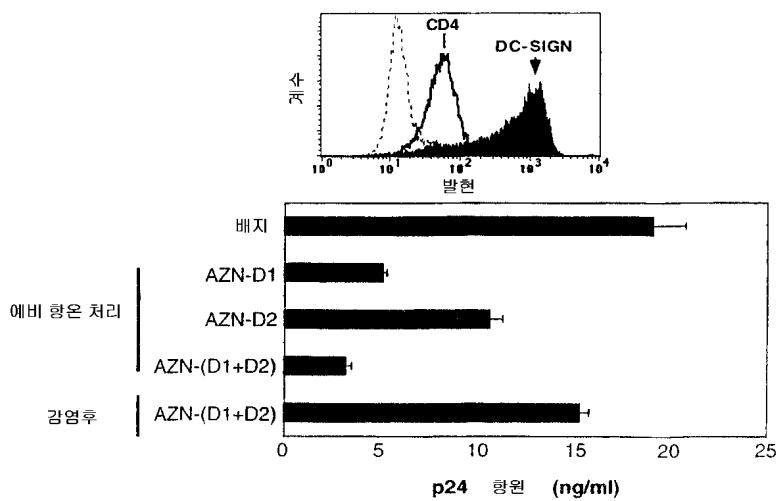
도면6c



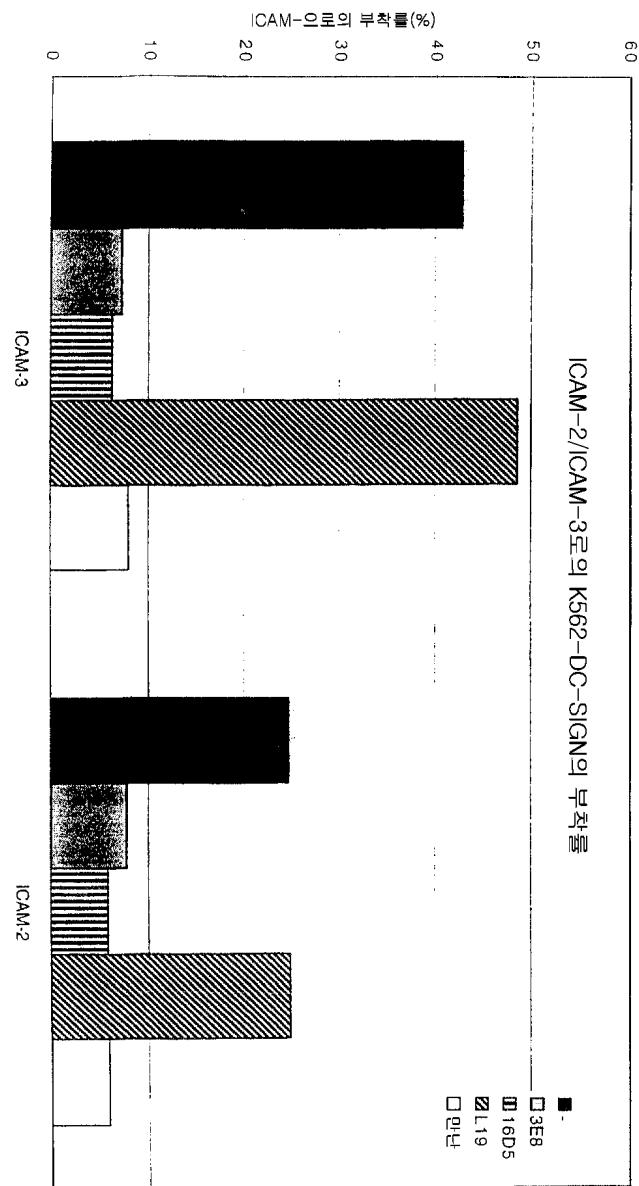
도면6d



도면7



도면8



도면9

1/1 31/11
 ATG AGT GAC TCC AAG GAA CCA AGA CTG CAG CAG CTG GGC CTC CTC GAG GAG GAA CAG CTG
 Met ser asp ser lys glu pro arg leu gin gin leu gly leu leu glu glu glu gin leu
 61/21 91/31
 AGA GGC CTT GGA TTC CGA CAG ACT CGA GGA TAC AAG AGC TTA GCA GGG TGT CTT GGC CAT
 arg gly leu gly phe arg gin thr arg gly tyr lys ser leu ala gly cys leu gly his
 121/41 151/51
 GGT CCC CTG GTG CTG CAA CTC CTC TCC ACG CTC TTG GCT GGG CTC CTC GTC CAA GTG
 gly pro leu val leu gin leu leu ser phe thr leu leu ala gly leu leu val gin val
 181/61 211/71
 TCC AAG GTC CCC AGC TCC ATA AGT CAG GAA CAA TCC AGG CAA GAC GGG ATC TAC CAG AAC
 ser lys val pro ser ser ile ser gin glu gin ser arg gin asp ala ile tyr gin asn
 241/81 271/91
 CTG ACC CAG CTT AAA GCT GCA GTG GGT GAG CTC TCA GAG AAA TCC AAG CTG CAG GAG ATC
 leu thr gin leu lys ala ala val gly glu leu ser gin lys leu gin glu ile
 301/101 331/111
 TAC CAG GAG CTG ACC CAG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CTG
 tyr gin glu leu thr gin leu iys ala ala val gly glu leu pro glu lys ser lys leu
 361/121 391/131
 CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC CGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA
 gin glu ile tyr gin glu leu thr arg leu lys ala ala val gly glu leu pro glu lys
 421/141 451/151
 TCT AAG CTG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC TGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT
 ser lys leu gin glu ile tyr gin glu leu thr trp leu lys ala ala val gly glu leu
 481/161 511/171
 CCA GAG AAA TCT AAG ATG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACT CGG CTG AAG GCT GCA GTG
 pro glu lys ser lys met gin glu ile tyr gin glu leu thr arg leu lys ala ala val
 541/181 571/191
 GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC CGG CTG AAG
 gly glu leu pro glu lys ser lys gin gin glu ile tyr gin glu leu thr arg leu lys
 601/201 631/211
 GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC
 ala ala val gly glu leu pro glu lys ser lys gin gin glu ile tyr gin glu leu thr
 661/221 691/231
 CGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG
 arg leu lys ala ala val gly glu leu pro glu lys ser lys gin gin glu ile tyr gin
 721/241 751/251
 GAG CTG ACC CAG CTG AAG GCT GCA GTG GAA CGC CTG TGC CAC CCC TGT CCC TGG GAA TGG
 glu leu thr gin leu lys ala ala val gly arg leu cys his pro cys pro trp glu trp
 781/261 811/271
 ACA TTC TTC CAA GGA AAC TGT TAC TTC ATG TCT AAC TCC CAG CGG AAC TGG CAC GAC TCC
 thr phe phe gin gly asn cys tyr phe met ser asn ser gin arg asn trp his asp ser
 841/281 871/291
 ATC ACC GCC TGC AAA GAA GTG GGG GCC CAG CTC GTC GTA ATC AAA AGT GCT GAG GAG CAG
 ile thr ala cys lys glu val gly ala gin leu val val ile lys ser ala glu gin
 901/301 931/311
 AAC TTC CTA CAG CTG CAG TCT TCC AGA AGT AAC CGC TTC ACC TGG ATG GGA CTT TCA GAT
 asn phe leu gin leu gin ser ser arg ser asn arg phe thr trp met gly leu ser asp
 951/321 991/331
 CTA AAT CAG GAA GGC ACG TGG CAA TGG GTG GAC GGC TCA CCT CTG TTG CCC AGC TTC AAG
 leu asn gin glu gly thr trp gin trp val asp gly ser pro leu leu pro ser phe lys
 1021/341 1051/351
 CAG TAT TGG AAC AGA GGA GAG CCC AAC AAC GTT GGG GAG GAA GAC TGC GCG GAA TTT AGT
 gin tyr trp asn arg gly glu pro asn asn val gly glu glu asp cys ala glu phe ser
 1081/361 1111/371
 GGC AAT GGC TGG AAC GAC GAC AAA TGT AAT CTT GCC AAA TTC TGG ATC TGC AAA AAG TCC
 gly asn gly trp asn asp asp lys cys asn leu ala lys phe trp ile cys lys ser
 1141/381 1171/391
 GCA GCC TCC TGC TCC AGG GAT GAA GAA CAG TTT CTT TCT CCA GCC CCT GCC ACC CCA AAC
 ala ala ser cys ser arg asp glu gin gin phe leu ser pro ala pro ala thr pro asn
 1201/401
 CCC CCT CCT GCG TAG
 pro pro pro ala END

서 열 목록

- <110> KONINKLIJKE UNIVERSITEIT NIJMEGEN
 <120> COMPOSITION AND METHOD FOR MODULATING DENDRITIC CELL-T

CELL
 INTERACTION

<150> EP 99201204.7
 <151> 1999-04-19

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 1215
<212> DNA
<213> Human ; DC-SIGN

<400> 1
atgagtgact ccaaggaacc aagactgcag cagctggcc tcctggagga ggaacagctg
60

agaggcctg gattccgaca gactcgagga tacaagagct tagcagggtg tcttggccat
120

ggtccctgg tgctgcaact cctctccctc acgctcttgg ctgggctcct tgtccaagtg
180

tccaagggcc ccagctccat aagt cagga aatccaggc aagacgcgat ctaccagaac
240

ctgacccagc ttaaagctgc agtgggtgag ctctcagaga aatccaagct gcaggagatc
300

taccaggagc tgacccagct gaaggctgca gtgggtgagc ttccagagaa atctaagctg
360

caggagatct accaggagct gacccggctg aaggctgcag tgggtgagct tccagagaaa
420

tctaagctgc aggagatcta ccaggagctg acctggctga aggtgcagt gggtgagctt
480

ccagagaat ctaagatgca ggagatctac caggagctga ctggctgaa ggctgcagt
540

ggtgagttc cagagaaatc taagcagcag gagatctacc aggagctgac ccggctgaag
600

gctgcagtgg gtgagcttcc agagaaatct aagcagcagg agatctacca ggagctgacc
660

cggctgaagg ctgcagtgg tgagcttcca gagaatcta agcagcagga gatctaccag

720

gagctgaccc agctgaaggc tgcaagtggaa cgcctgtgcc acccctgtcc ctggaatgg
 780

acattttcc aaggaaactg ttacttcatg tctaactccc agcggaaactg gcacgactcc
 840

atcacccctt gcaaagaagt gggggccag ctctgtgtaa tcaaaagtgc tgaggagcag
 900

aacttcctac agctgcagtc ttccagaagt aaccgcttca cctggatggg actttcagat
 960

cttaatcagg aaggcacgtg gcaatgggtg gacggctcac ctctgttgcc cagttcaag
 1020

cagtatggaa acagaggaga gcccaacaac gttggggagg aagactgcgc ggaatttagt
 1080

ggcaatggct ggaacgacga caaatgtaat cttgccaat tctggatctg caaaaagtcc
 1140

gcagcctcct gctccaggga tgaagaacag tttcttctc cagccctgc cacccaaac
 1200

ccccctcctg cgtag

1215

<210> 2
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Human ; DC-SIGN

<400> 2
 Met Ser Asp Ser Lys Glu Pro Arg Leu Gln Gln Leu Gly Leu Leu Glu
 1 5 10 15

Glu Glu Gln Leu Arg Gly Leu Gly Phe Arg Gln Thr Arg Gly Tyr Lys

20

25

30

Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly His Gly Pro Leu Val Leu Gln Leu Leu
 35 40 45

Ser Phe Thr Leu Leu Ala Gly Leu Leu Val Gln Val Ser Lys Val Pro
 50 55 60

Ser Ser Ile Ser Gln Glu Gln Ser Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Gln Asn
 65 70 75 80

Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Ser Glu Lys Ser Lys
 85 90 95

Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly
 100 105 110

Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr
 115 120 125

Arg Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu Gln
 130 135 140

Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Trp Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu
 145 150 155 160

Pro Glu Lys Ser Lys Met Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu
 165 170 175

Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Gln Gln Glu Ile
 180 185 190

Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu
 195 200 205

Lys Ser Lys Gln Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala
 210 215 220

Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Gln Gln Glu Ile Tyr Gln
 225 230 235 240

Glu Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Glu Arg Leu Cys His Pro Cys
 245 250 255

Pro Trp Glu Trp Thr Phe Phe Gln Gly Asn Cys Tyr Phe Met Ser Asn
 260 265 270

Ser Gln Arg Asn Trp His Asp Ser Ile Thr Ala Cys Lys Glu Val Gly
 275 280 285

Ala Gln Leu Val Val Ile Lys Ser Ala Glu Glu Gln Asn Phe Leu Gln
 290 295 300

Leu Gln Ser Ser Arg Ser Asn Arg Phe Thr Trp Met Gly Leu Ser Asp
 305 310 315 320

Leu Asn Gln Glu Gly Thr Trp Gln Trp Val Asp Gly Ser Pro Leu Leu
 325 330 335

Pro Ser Phe Lys Gln Tyr Trp Asn Arg Gly Glu Pro Asn Asn Val Gly
 340 345 350

Glu Glu Asp Cys Ala Glu Phe Ser Gly Asn Gly Trp Asn Asp Asp Lys
 355 360 365

Cys Asn Leu Ala Lys Phe Trp Ile Cys Lys Ser Ala Ala Ser Cys
 370 375 380

Ser Arg Asp Glu Glu Gln Phe Leu Ser Pro Ala Pro Ala Thr Pro Asn
 385 390 395 400

Pro Pro Pro Ala