



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010152553/10, 22.05.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.05.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.05.2008 US 61/128,709

(43) Дата публикации заявки: 27.06.2012 Бюл. № 18

(45) Опубликовано: 10.12.2014 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20070167607 A1, 19.07.2007. ОНТА Y. et al., Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish, J. Immunol., 2004, vol.173 no.7, pp.4553-4560. ZINGER E. et al., Determination of the inhibitory activity and biological half-life of soluble CD83: Comparison of wild type and mutant isoforms, Immunobiology, 2006, vol.211, pp.449-453. RU 2232773 C2, 20.07.2004

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 23.12.2010

(86) Заявка РСТ:
US 2009/003174 (22.05.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/142759 (26.11.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

БРАНД Стефен (US),
ЧОУ Чих-Хсиун (СА),
МОО-ЙОУНГ Мюррей (СА)

(73) Патентообладатель(и):

Аргос Терапьютикс, Инк. (US)

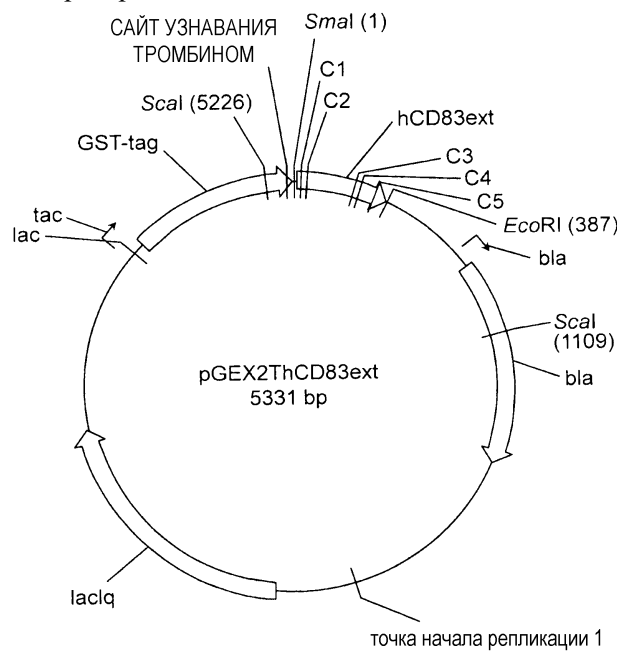
(54) НОВЫЕ РАСТВОРИМЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ CD83, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии и предназначено для лечения или профилактики нежелательного иммунного ответа. Заявлен новый растворимый полипептид CD83 (sCD83), содержащий SEQ ID NO:7, в которой аминокислотные остатки 12, 20, 92 и 114 представляют собой цистеин, аминокислота в положении 85 представляет собой серин и один

или несколько из аминокислотных остатков 1, 2, 3, 4 и 130 могут отсутствовать. Также заявлена нуклеиновая кислота, кодирующая указанный sCD83, и применение указанного полипептида в способах лечения или профилактики отторжения трансплантата или аутоиммунных заболеваний, таких как диабет I типа, рассеянный склероз, болезнь Крона и язвенный колит. Изобретение

позволяет увеличить стабильность и н. и 4 з.п. ф-лы, 39 ил., 9 табл., 10 пр. биологическую активность препаратов sCD83. 11



ФИГ.2

RU 2 5 3 5 3 4 0 C 2

RU 2 5 3 5 3 4 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 535 340** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010152553/10, 22.05.2009

(24) Effective date for property rights:
22.05.2009

Priority:

(30) Convention priority:
23.05.2008 US 61/128,709

(43) Application published: 27.06.2012 Bull. № 18

(45) Date of publication: 10.12.2014 Bull. № 34

(85) Commencement of national phase: 23.12.2010

(86) PCT application:
US 2009/003174 (22.05.2009)

(87) PCT publication:
WO 2009/142759 (26.11.2009)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

**BRAND Stefen (US),
ChOU Chikh-Khsiun (CA),
MOO-JOUNG Mjurrej (CA)**

(73) Proprietor(s):

Argos Terap'jutiks, Ink. (US)

(54) NOVEL SOLUBLE POLYPEPTIDES CD83, COMPOSITIONS AND METHODS OF THEIR APPLICATION

(57) Abstract:

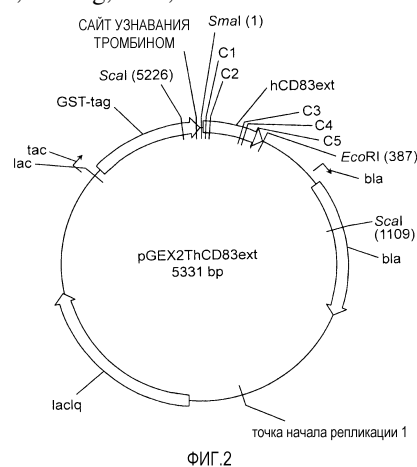
FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to field of biochemistry and is intended for treatment or prevention of undesirable immune response. Claimed is novel soluble polypeptide CD83 (sCD83), containing SEQ ID NO:7, in which amino acid residues 12, 20, 92 and 114 represent cysteine, amino acid in position 85 represents serine and one or several of amino acids 1, 2, 3, 4 and 130 can be absent. Also claimed is nucleic acid, coding said sCD83, and application of said polypeptide in methods of treatment or prevention of transplant rejection or autoimmune diseases, such as type I diabetes, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.

EFFECT: invention makes it possible to increase

stability and biological activity of sCD83 preparations.

15 cl, 39 dwg, 9 tbl, 10 ex



ФИГ.2

ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Область настоящего изобретения относится к новым растворимым полипептидам CD83 (sCD83) и нуклеиновым кислотам, кодирующим такие полипептиды, улучшенным композициям (sCD83) и применению таких белков и композиций для лечения или

профилактики аллергии, аутоиммунного заболевания и отторжения трансплантата.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

CD83 представляет собой молекулу из суперсемейства белков иммуноглобулинов ("Ig") (см., например, Zhou *et al.* (1999) J. Immunol. 149: 735-742; см. также патент США № 7169898; обзор см. у Fujimoto and Tedder ((2006) J. Med. Dent. Sci. 53: 86-91). CD83

служит в качестве маркера дифференцировки для зрелых дендритных клеток. Хотя точная функция CD83 остается определяемой, сообщалось, что растворимая форма CD83 связывается как с незрелыми, так и со зрелыми дендритными клетками (см.

Lechmann *et al.* (2001) (J. Exp. Med. 194: 1813-1821). Авторы также сообщали о том, что этот белок снижал экспрессию CD80 и CD83 дендритными клетками, созревшими *in*

vitro, и что он ингибировал способность дендритных клеток стимулировать Т-клетки *in vitro* (см. также Lechmann *et al.* (2002) Trends in Immunology 23: 273-275). Аналогично, Kruse *et al.* (2000) (J. Exp. Med. 191: 1581-1589) сообщали о том, что GC7 (N(1)-гуанил-1,7-диаминогептан) препятствовал нуклео-цитоплазматической транслокации мРНК CD83, предотвращая поверхностную экспрессию CD83 и значительно ингибируя

активацию Т-лимфоцитов этими DC. Другие сообщили о наличии растворимой формы CD83 *in vivo* (см., например, Hock *et al.* (2002) Int. Immunol. 13: 959-967). Исследования с HSV-1-инфицированными DC продемонстрировали, что вирусная инфекция приводит к деградации CD83 и ингибированию транспорта мРНК CD83; этот возможный механизм ускользания под действием HSV-1 дополнительно поддерживает важность CD83 для

биологии DC (см., например, Kruse *et al.* (2000) J. Virol. 74: 7127-7136). Зрелые CD83 включают три структурных домена: внеклеточный Ig-подобный домен; трансмембранный домен; и цитоплазматический домен. Внеклеточный домен CD83 человека (hCD83ext, форма sCD83) содержит одиночный Ig-подобный (V-тип) домен, который кодируется по меньшей мере двумя экзонами (см., например, Zhou *et al.* (1999) J. Immunol. 149: 735-742; GenBank ID #Z11697) и сильно экспрессируется на клеточной

поверхности зрелых дендритных клеток («mDC»). В патенте США № 7169898 описывается последовательность нуклеиновой кислоты кДНК CD83 человека (hCD83) (SEQ ID NO:1). Соответствующая аминокислотная последовательность полноразмерного hCD83 показана в SEQ ID NO:2. Аминокислотные

остатки 1-19 последовательности SEQ ID NO:2 соответствуют сигнальной последовательности, которая отщепляется от зрелого белка (аминокислотные остатки 20-205). Внеклеточный домен hCD83 (hCD83ext) кодируется SEQ ID NO:3. Соответствующая аминокислотная последовательность hCD83ext показана в SEQ ID NO:4, а также в аминокислотных остатках 20-144 SEQ ID NO:2). Трансмембранный

домен и цитоплазматический домен соответствуют аминокислотным остаткам 145-166 последовательности SEQ ID NO:2 и аминокислотным остаткам 167-205 последовательности SEQ ID NO:2 соответственно. hCD83ext дикого типа содержит три сайта гликозилирования (т.е. аминокислотные остатки 60, 77 и 98 последовательности SEQ ID NO:4) и пять остатков цистеина (т.е. аминокислотные остатки 27, 35, 100, 107, и 129 последовательности SEQ ID NO:2, которые соответствуют аминокислотным остаткам 8, 16, 81, 88 и 110 последовательности SEQ ID NO:4).

hCD83ext ингибирует DC-опосредованную Т-клеточную стимуляцию (Lechmann *et al.* J. Exp. Med. (2001) 194:1813-1821) и является эффективным при лечении рассеянного

склероза в модели на мышах (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE); Zinser *et al.* (2004) J. Exp. Med. 200: 345-351). В этих исследованиях использовали внеклеточный домен hCD83, который дополнительно содержал четыре аминокислотные части (Gly-Ser-Pro-Gly; SEQ ID NO:41) сайта расщепления тромбина на аминоконце
 5 этого белка, а также первую аминокислоту трансмембранного домена (Ile), и показан в SEQ ID NO:5.

В публикации PCT WO2004/046182 описывается растворимый мутантный CD83, в котором пятый цистеиновый остаток последовательности SEQ ID NO:5 мутирован из цистеина в серин для получения SEQ ID NO:6 (здесь и далее hCD83ext-m5) и предложено
 10 применение hCD83ext-m5 и hCD83ext дикого типа в лечении аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз и трансплантация. Zinser *et al.* (Immunobiology (2006) 211: 449-453) описывают, что hCD83ext дикого типа образует гомодимер, посредством чего первые четыре цистеина внеклеточного домена (т.е. аминокислотные остатки 27, 35, 100 и 107 последовательности SEQ ID NO:2, которые соответствуют аминокислотным
 15 остаткам 12, 20, 85 и 92 последовательностям SEQ ID NO:5 и 6) вовлечены в образование межмолекулярных дисульфидных связей, а пятый цистеин (т.е. аминокислотный остаток 129 последовательности SEQ ID NO:1 или аминокислотный остаток 114 последовательностей SEQ ID NO:5 и 6) отвечает за межмолекулярное образование мостика гомодимера. Zinser *et al.* дополнительно описывают, что две изоформы hCD83ext,
 20 т.е. димер дикого типа и мутантный мономер hCD83ext-m5, обладают сходной ингибирующей способностью при тестировании *in vitro*, и что биологический (*in vivo*) период полужизни двух изоформ hCD83ext является сопоставимым и составлял от 2 до 3 часов. Кроме того, используя модель EAE, Zinser *et al.* описывают, что мономерная мутантная изоформа растворимого CD83 (т.е. hCD83ext-m5) обладает сходной
 25 ингибирующей активностью *in vivo* при сравнении с димерной изоформой дикого типа hCD83ext.

Принимая во внимание важные терапевтические применения sCD83, Заявители признали необходимость в улучшенных полипептидах sCD83 и их композициях для
 30 лечения или профилактики нежелательного иммунологического ответа, например аутоиммунных заболеваний, аллергии и отторжения трансплантата. Настоящее изобретение направлено на эту необходимость, а также обеспечивает дополнительные преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 представляет кДНК, кодирующую полноразмерный белок CD83
 35 человека, включая сигнальную последовательность.

SEQ ID NO:2 представляет аминокислотную последовательность полноразмерного белка CD83 человека, включая сигнальную последовательность.

SEQ ID NO:3 представляет кДНК, кодирующую аминокислотную последовательность внеклеточного домена CD83 человека (hCD83ext).

40 SEQ ID NO:4 представляет аминокислотную последовательность внеклеточного домена CD83 человека (hCD83ext).

SEQ ID NO:5 представляет аминокислотную последовательность внеклеточного домена CD83 человека, дополнительно содержащую на аминоконце аминокислотные остатки (Gly-Ser-Pro-Gly; SEQ ID NO:41) и на карбоксиконце первую аминокислоту
 45 трансмембранного домена (Ile).

SEQ ID NO:6 представляет вариант SEQ ID NO:5, в которой пятый цистеиновый остаток в положении 114 был изменен на остаток серина.

SEQ ID NO:7 представляет вариант SEQ ID NO:5, в которой остаток Хаа представляет

любую аминокислоту.

SEQ ID NO:8 представляет слитый белок GST-hCD83ext. Домены GST и hCD83ext разделены сайтом расщепления тромбином.

SEQ ID NO:9 представляет внеклеточный домен hCD83 дикого типа, дополнительно содержащий первую аминокислоту (Ile) трансмембранного домена.

SEQ ID NO:10 представляет ДНК, кодирующую m5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:11 представляет m5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:12 представляет ДНК, кодирующую m2 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:13 представляет m2 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:14 представляет ДНК, кодирующую m3 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:15 представляет m3 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:16 представляет ДНК, кодирующую m4 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:17 представляет m4 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:18 представляет ДНК, кодирующую m2,3 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:19 представляет m2,3 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:20 представляет ДНК, кодирующую m3,4 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:21 представляет m3,4 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:22 представляет ДНК, кодирующую m2,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:23 представляет m2,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:24 представляет ДНК, кодирующую m3,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:25 представляет m3,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:26 представляет ДНК, кодирующую m4,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:27 представляет m4,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:28 представляет ДНК, кодирующую m2,3,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:29 представляет m2,3,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:30 представляет ДНК, кодирующую m3,4,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:31 представляет m3,4,5 C2S мутант последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:32 представляет праймер для мутагенеза C2S в положении второго цистеина последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:33 представляет праймер для мутагенеза C2S в положении третьего цистеина последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:34 представляет праймер для мутагенеза C2S в положении четвертого цистеина последовательности SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:35 представляет белок CD83 из Pan troglodytes (шимпанзе) и соответствует эталонной последовательности NCBI: XP_518248.2.

SEQ ID NO:36 представляет белок CD83 из Canis lupus familiaris (собака) и соответствует эталонной последовательности NCBI: XP_852647.1.

SEQ ID NO:37 представляет белок CD83 из *Bos taurus* (бык) и соответствует эталонной последовательности NCBI:NP_001040055.1.

SEQ ID NO:38 представляет белок CD83 из *Mus musculus* (мышь) и соответствует эталонной последовательности NCBI: NP_033986.1.

5 SEQ ID NO:39 представляет белок CD83 из *Rattus norvegicus* (серая крыса) и соответствует эталонной последовательности NCBI: XP_341510.2.

SEQ ID NO:40 представляет белок CD83 из *Gallus gallus* (красная дикая курица) и соответствует эталонной последовательности NCBI: XP_41829.1.

SEQ ID NO:41 соответствует Gly-Pro-Ser-Gly.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 представлено выравнивание последовательности белка, полученное при использовании MUSCLE версия 3.6, используемые параметры: - maxiters 2 (см. Edgar RC (2004) *Nucleic Acids Res* 32(5):1792-7). NP_00424.1 (SEQ ID NO:2) представляет собой CD83 белок человека (SEQ ID NO:2). XP_518248.2 представляет собой CD83 белок шимпанзе (SEQ ID NO:35). XP_852647.1 представляет собой CD83 белок собаки (SEQ ID NO:37). NP_001040055.1 представляет собой CD83 быка (SEQ ID NO:37). NP_033986.1 представляет собой CD83 мыши (SEQ ID NO:38). XP_341510.2 представляет собой CD83 крысы (SEQ ID NO:39). XP_41829.1 представляет собой CD83 красной дикой курицы (SEQ ID NO:40). Подчеркнутые аминокислотные остатки могут быть замещены любой аминокислотой. Подчеркнутые и выделенные жирным шрифтом аминокислоты предпочтительно могут быть замещены посредством консервативной аминокислотной замены. Аминокислотные остатки, которые не подчеркнуты, предпочтительно не замещены.

На Фигуре 2 представлена схематичная диаграмма плазмиды pGEX2ThCD83ext.

25 На Фигуре 3 представлено SDS-PAGE разделение фракций, элюированных после расщепления тромбином на колонке GST-hCD83ext с использованием 80 (дорожка 2), 40 (дорожка 3), 20 (дорожка 4), 10 (дорожки 5-8) или 5 (дорожки 9-13) Ед/мл тромбина. Дорожки 7 и 8 демонстрируют GST фракции, полученные после расщепления тромбином 10 Ед/мл и элюции глютаатином. Дорожки 11-13 показывают GST фракции, полученные после расщепления тромбином 5 Ед/мл и элюции глютаатином. Дорожка 1: маркеры молекулярной массы. Контаминирующие белки, находящиеся в тромбине (Sigma) показаны в заштрихованной рамке.

30 На Фигуре 4А показана характерная двухпиковая хроматограмма на стадии тонкой очистки hCD83ext с использованием анионообменной хроматографии, содержит два основных пика. На Фигуре 4В показан SDS-PAGE анализ каждой из фракций тонкой очистки. Дорожки 2-5 представляют первый пик и дорожки 6-9 представляют второй пик. Дорожка 1 представляет пост-GST образец, нагруженный на анионообменную хроматографическую колонку для тонкой очистки. Обратите внимание, что hCD83ext находится в первом пике, тогда как другие контаминирующие белки находятся во втором пике. Гель окрашивали нитратом серебра.

40 На Фигуре 5 показан анализ различных серий образцов hCD83ext с использованием редуцирующего SDS-PAGE и окрашивания Кумасси синим. Образцы белка хранили при -20°C и были получены в 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 50% глицерина, образец дорожки 3 не содержал глицерина. Эти серии были получены в нескольких различных датах, и, следовательно, их хранили в течении различного периода времени (т.е. 4, 3, 3, 2, 10,5, 9,5, 6,5, 6, 6 месяцев для дорожек 2~10 соответственно) до проведения анализа. Стрелка указывает положение мономера. Кроме того, образцы более высокой молекулярной массы, можно увидеть, возможно, соответствуют мультимерным формам. Формы более

низкой молекулярной массы соответствуют продуктам деградации или возможно модифицированным мономерам, опосредованным нестандартными внутримолекулярными дисульфидными связями.

На Фигуре 6 показан анализ различных серий образцов hCD83ext с использованием 5 нередуцирующего SDS-PAGE и окрашивания Кумасси синим и подчеркивает миграцию мономера и димера. Образцы белка хранили при -20°C и получали в 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 50% глицерине за исключением образца дорожки 3, который не содержал глицерина. Эти серии были получены в нескольких различных датах, и, следовательно, они были различного «возраста» (т.е. 4, 3, 3, 2, 10,5, 9,5, 6,5, 6, 6 месяцев для дорожек 10 2~10 соответственно) при проведении анализа. Стрелки на дорожках 3, 6, и 7 указывают на некоторые необычные виды hCD83ext, возможно опосредованные нестандартными внутримолекулярными дисульфидными связями.

На Фигуре 7 показан анализ образца hCD83ext с помощью (А) редуцирующего SDS-PAGE, (В) нередуцирующего SDS-PAGE и (С) Вестерн блоттинга. SDS гели окрашивали 15 нитратом серебра, чтобы сделать видимыми более высокие мультимерные виды (такие как тример и тетрамер). Все эти виды верифицировали на соответствие hCD83ext с помощью Вестерн блоттинга.

На Фигуре 8 представлена АЕС хроматограмма, демонстрирующая пики со стадии тонкой очистки для hCD83m-2,5.

На Фигуре 9 показан редуцирующий SDS-PAGE анализ очищенных фракций CD83m- 2,5.

На Фигуре 10 показан нередуцирующий SDS-PAGE анализ очищенных фракций CD83m-2,5.

На Фигуре 11 показан спектроскопический анализ CD83m-2,5 с использованием 25 кругового дихроизма (CD).

На Фигуре 12 показан спектрофлуометрический анализ CD83m-2,5.

На Фигуре 13 показан спектроскопический анализ CD83m-2 с использованием кругового дихроизма.

На Фигуре 14 представлена АЕС хроматограмма, показывающая пики со стадии 30 тонкой очистки для hCD83m-3.

На Фигуре 15 показан SDS-PAGE анализ очищенного CD83m-3, который был подвергнут структурной характеристике с использованием SDS-PAGE (Фигура 15), CD (Фигуры 16 и 17) и спектрофлуометрически (Фигура 18) с результатами, аналогичными hCD83ext дикого типа и CD83m-5.

На Фигуре 16 показан спектроскопический анализ CD83m-3 и CD83 дикого типа 35 (серия 004-04), полученные в 20 mM Tris, 50 mM NaCl при pH 7,5, используя CD.

На Фигуре 17 показан спектроскопический анализ CD83m-3 (получен либо при pH 7,0 или 7,5), используя CD.

На Фигуре 18 показан спектрофлуометрический анализ CD83m-3, полученного либо 40 при pH 7,0, либо 7,5.

На Фигуре 19 показан нередуцирующий SDS-PAGE анализ мономерных форм hCD83ext-m3, hCD83ext-m5 и мономерных и димерных форм hCD83ext дикого типа.

На Фигуре 20 показан нередуцирующий SDS-PAGE анализ мономерных форм hCD83ext-m3 (m3), hCD83ext-m5 (m5) и мономерных и димерных форм трех препаратов 45 hCD83ext дикого типа (004-4, 007 и 023), полученных в различные дни, с предварительной обработкой NEM или без обработки для предотвращения перестановки дисульфидных связей.

На Фигуре 21 показаны результаты эксклюзионной хроматографии hCD83ext-m3,

hCD83ext-m5 и трех различных препаратов hCD83ext дикого типа. Все препараты были обработаны NEM для предотвращения перестановки дисульфидных связей. Первый (левый) пик представляет димеры, тогда как второй (правый) пик представляет мономеры.

5 На Фигуре 22 показан редуцирующий SDS-PAGE анализ hCD83ext-m3 (m3), hCD83ext-m5 (m5) и трех различных препаратов hCD83ext дикого типа (wt 004-4, wt 007 и wt 023).

На Фигуре 23 показаны результаты эксклюзионной хроматографии мутантного мономера hCD83ext-m5 и двух различных препаратов hCD83ext дикого типа (004-4 и 023).

10 На Фигуре 24 показан нередуцирующий SDS-PAGE анализ двух различных препаратов hCD83ext-m5 (501 и 502) и шести различных препаратов hCD83ext дикого типа (007, 100, 021, 023, 80 и 90).

На Фигуре 25 показан нередуцирующий Вестерн блоттинг анализ различных препаратов hCD83ext-m5 и hCD83ext дикого типа.

15 На Фигуре 26 показана способность различных композиций hCD83ext дикого типа, hCD83ext-m3 и hCD83ext-m5 ингибировать продукцию TNF α стимулированными LPS/IFN γ PBMC приматов, измеренную либо посредством процентного содержания моноцитов, продуцирующих TNF α , либо посредством среднего количества продуцированного TNF α на клетку.

20 На Фигуре 27 показана способность hCD83ext дикого типа, hCD83ext-m3 и hCD83ext-m5, все получены при pH 7,6, ингибировать продукцию TNF α стимулированными LPS/IFN γ PBMC приматов, измеренную либо посредством процентного содержания моноцитов, продуцирующих TNF α , либо посредством среднего количества продуцированного TNF α на клетку (MFU).

25 На Фигуре 28 показана способность hCD83ext дикого типа (получен при pH 4,5 или 5,5) и hCD83ext-m5 (получен при pH 7,6) ингибировать продукцию TNF α стимулированными LPS/IFN γ PBMC приматов, измеренную либо посредством процентного содержания моноцитов, продуцирующих TNF α , либо посредством среднего количества продуцированного TNF α на клетку (MFU).

30 На Фигуре 29 показаны различия в способности hCD83ext дикого типа (полученного при pH 4,5 или 5,5), или мутантных форм hCD83ext-m3 (полученных при pH 5,5) и hCD83ext-m5, двух препаратов (полученных при pH 7,6) ингибировать продукцию TNF α стимулированными LPS/IFN γ PBMC приматов, измеренную либо посредством процентного содержания моноцитов, продуцирующих TNF α , либо посредством среднего количества продуцированного TNF α на клетку (MFU).

35 На Фигуре 30 показаны различия в способности hCD83ext дикого типа (серия ARG-021; полученного при pH 7,6) и четырех препаратов мономерного мутантного hCD83ext-m3 (полученного при pH 4,5 или 5,5) ингибировать продукцию TNF α стимулированными LPS/IFN γ PBMC человека, измеренную по процентному содержанию моноцитов, продуцирующих TNF α .

40 На Фигурах 31-35 показано действие pH и температуры на hCD83ext дикого типа (серия 021), как проанализировано с помощью нередуцирующего (левые дорожки) и редуцирующего (правые дорожки) SDS-PAGE.

На Фигуре 36 представлен график, показывающий патологическую классификацию почечных аллотрансплантатов крыс на POD140. Средние баллы: 0=нормальное; 1=минимальное изменение; 2=слабое изменение; 3=умеренное изменение; 4=заметное изменение.

На Фигуре 37 представлен график, показывающий иммуногистохимическую

классификацию почечных аллотрансплантатов крыс на POD140. Средние баллы: 0= нормальное; 1=минимальное изменение; 2=слабое изменение; 3=умеренное изменение; 4=заметное изменение.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Предложены новые растворимые полипептиды CD83 (sCD83) улучшенной стабильности. В одном аспекте, предложен выделенный полипептид sCD83, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности SEQ ID NO:7, в которой один или несколько аминокислотных остатков 1, 2, 3, 4 и 130
10 необязательно отсутствуют, а аминокислотные остатки 12, 20, 85, 92 и 114 представляют собой аминокислотные остатки, описанные в одной из строк Таблицы 1. Предпочтительно аминокислотный остаток 85 представляет собой аминокислоту, отличную от цистеина, и наиболее предпочтительно аминокислотный остаток 85 представляет собой серин.

15 В другом аспекте выделенный полипептид sCD83 содержит SEQ ID NO:7 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности SEQ ID NO:7; в которой один или несколько аминокислотных остатков 12, 20, 85 и 92 последовательности SEQ ID NO:7 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от цистеина; и, необязательно, один или несколько
20 аминокислотных остатков 1, 2, 3, 4 и 130 отсутствуют.

Предпочтительно, выделенный полипептид sCD83 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:31; где необязательно отсутствует аминокислотный
25 остаток 126.

Еще в одном аспекте предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие полинуклеотиды по изобретению, а также векторы и клетки, содержащие такие полинуклеотиды. В настоящем изобретении описаны векторы и клетки, применимые для получения композиций sCD83.

30 Полипептиды sCD83, описанные в настоящем изобретении, применимы для лечения или профилактики нежелательного иммунного ответа у пациента, например аутоиммунного заболевания, отторжения трансплантата и аллергии. Соответственно, предложены фармацевтические композиции, содержащие новые полипептиды sCD83, а также способы применения композиций новых полипептидов sCD83 для лечения
35 аутоиммунных заболеваний, отторжения трансплантата и аллергии.

Еще в одном аспекте предложен способ улучшения результата трансплантации у млекопитающего реципиента трансплантата, предусматривающий введение указанному реципиенту терапевтически эффективного количества указанного выше полипептида sCD83 и одного или нескольких иммуносуппрессантов, где иммуносуппрессант действует
40 синергетично с указанным полипептидом для улучшения результата трансплантации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что растворимый CD83 (sCD83), в частности полипептиды hCD83ext, соответствующие последовательности SEQ ID NO:5 и 6, теряет стабильность во время хранения. Неожиданно было обнаружено, что мутация
45 третьего остатка цистеина hCD83ext в результате приводит к улучшенной стабильности и сравнимой биологической активности. Этот результат был неожиданным, поскольку, как рассмотрено выше, Zinser *et al.* (Immunobiology (2006) 211:449-453) описывают, что hCD83ext образует гомодимер, посредством чего первые четыре цистеина hCD83ext

вовлечены в образование внутримолекулярных дисульфидных связей. Таким образом, принимая во внимание сведения Zinser, можно было бы предположить, что каждый из первых четырех цистеинов hCD83ext является крайне важным для поддержания должной конформации внеклеточного домена. Неожиданно, мутации этих остатков цистеина могут улучшить стабильность. Более того, было обнаружено, что дополнительно усиливается при забуферивании при низком pH, предпочтительно при pH 4,0-5,0, наиболее предпочтительно при pH примерно 4,5. По-видимому, белок sCD83 дикого типа является нестабильным и чувствительным к условиям, которые влияют на температуру, pH, дезамидирование и гидролиз.

Некоторые из новых полипептидов sCD83 по настоящему изобретению, имеющие аминокислотные замены одного или нескольких из пяти остатков цистеина в hCD83ext, показаны в Таблице 1. Термин «не Cys» относится к любой стандартной или нестандартной аминокислоте, отличной от цистеина. Предпочтительно, замена остатка цистеина представляет собой консервативную замену, таким образом, чтобы аминокислота, имеющая полярную незаряженную R группу (например, серин, треонин, метионин, аспарагин, глутамин и нестандартная аминокислота селеноцистеин) замещала цистеин. Альтернативно, остаток цистеина может быть удален без замещения. В Таблице 1 показано пять положений аминокислот в последовательности SEQ ID NO:7, которые представляют собой потенциальные сайты замещения или делеции остатков цистеина. SEQ ID NO:7 представляет собой вариант SEQ ID NO:5, где один или несколько из пяти остатков, которые представляют собой цистеин в последовательности SEQ ID NO:5 (т.е. остатки 12, 20, 85, 92 и 114), могут быть удалены или замещены альтернативной аминокислотой.

Таблица 1

Неограничивающие примеры вариантов CD83ext последовательности SEQ ID NO:7					
Обозначение мутантного hCD83ext	Аминокислотный остаток #12	Аминокислотный остаток #20	Аминокислотный остаток #85	Аминокислотный остаток #92	Аминокислотный остаток #114
m1	He Cys	Cys	Cys	Cys	Cys
m2	Cys	He Cys	Cys	Cys	Cys
m3	Cys	Cys	He Cys	Cys	Cys
m4	Cys	Cys	Cys	He Cys	Cys
m1,2	He Cys	He Cys	Cys	Cys	Cys
m1,3	He Cys	Cys	He Cys	Cys	Cys
m1,4	He Cys	Cys	Cys	He Cys	Cys
m1,5	He Cys	Cys	Cys	Cys	He Cys
m2,3	Cys	He Cys	He Cys	Cys	Cys
m2,4	Cys	He Cys	Cys	He Cys	Cys
m2,5	Cys	He Cys	Cys	Cys	He Cys
m3,4	Cys	Cys	He Cys	He Cys	Cys
m3,5	Cys	Cys	He Cys	Cys	He Cys
m4,5	Cys	Cys	Cys	He Cys	He Cys
m1,2,3	He Cys	He Cys	He Cys	Cys	Cys
m1,2,4	He Cys	He Cys	Cys	He Cys	Cys
m1,2,5	He Cys	He Cys	Cys	Cys	He Cys
m1,3,4	He Cys	Cys	He Cys	He Cys	Cys
m1,3,5	He Cys	Cys	He Cys	Cys	He Cys
m1,4,5	He Cys	Cys	Cys	He Cys	He Cys
m2,3,4	Cys	He Cys	He Cys	He Cys	Cys
m2,3,5	Cys	He Cys	He Cys	Cys	He Cys
m3,4,5	Cys	Cys	He Cys	He Cys	He Cys
m1,2,3,4	He Cys	He Cys	He Cys	He Cys	Cys
m1,2,3,5	He Cys	He Cys	He Cys	Cys	He Cys

m1,2,4,5	He Cys	He Cys	Cys	He Cys	He Cys
m1,3,4,5	He Cys	Cys	He Cys	He Cys	He Cys
m2,3,4,5	Cys	He Cys	He Cys	He Cys	He Cys
m1,2,3,4,5	He Cys	He Cys	He Cys	He Cys	He Cys

5 *He Cys=любая аминокислота, отличная от цистеина.
 ** Аминокислотные остатки 12, 20, 85, 92 и 114 соответствуют положениям первого, второго, третьего, четвертого и пятого остатка цистеина внеклеточного домена hCD83, как представлено последовательностью SEQ ID NO:7, где нумерация этих остатков сдвинута на +4 по сравнению с последовательностью SEQ ID NO:4 вследствие добавления остатков Gly-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO:41) на N-конце последовательности SEQ ID NO:7.

В Таблице 2 показана корреляция нумерации пяти остатков цистеина (или сайтов, где другой аминокислотный остаток может быть замещен остатком цистеина) в SEQ ID NO:2 и 4-8. Нумерация варьирует вследствие наличия или отсутствия различных N-концевых слитых фрагментов. Например, SEQ ID NO:2 представляет собой полноразмерную hCD83 последовательность и содержит N-концевую сигнальную последовательность из 19 аминокислот, а также трансмембранный и цитоплазматический домены, которые отсутствуют в последовательностях SEQ ID NO:4-8. Первый аминокислотный остаток внеклеточного домена hCD83 (Thr) находится в положении аминокислотного остатка 20 последовательности SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:4 представляет собой внеклеточный домен из 125 аминокислот белка hCD83 и соответствует аминокислотным остаткам 20-144 последовательности SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:5-7 содержат N-концевую последовательность из четырех аминокислот (Gly-Ser-Pro-Gly; SEQ ID NO:41), слитую с доменом hCD83ext (аминокислотные остатки 5-129), за которой следует первый аминокислотный остаток трансмембранного домена (Ile в положении аминокислотного остатка 130). SEQ ID NO:8 содержит N-концевой GST-tag и сайт расщепления тромбином (аминокислотные остатки 1-13), слитые с доменом hCD83ext (начиная с аминокислотного остатка 14-138), за которым следует первый аминокислотный остаток трансмембранного домена (Ile в положении аминокислотного остатка 139).

Таблица 2 Выравнивание цистеина или Хаа остатков различных последовательностей полноразмерного или растворимого CD83							
SEQ ID NO:	№ аминокислотных остатков в последовательности	Положение 1-го остатка треонина внеклеточного домена hCD83	Положение 1-го остатка цистеина или Хаа внеклеточного домена hCD83	Положение 2-го остатка цистеина или Хаа внеклеточного домена hCD83	Положение 3-го остатка цистеина или Хаа внеклеточного домена hCD83	Положение 4-го остатка цистеина или Хаа внеклеточного домена hCD83	Положение 1-го остатка цистеина или Хаа внеклеточного домена hCD83
2	205 (полноразмерный 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

На Фигуре 1 показано выравнивание полипептидов CD83 человека (NP_004224.1; SEQ ID NO:2), шимпанзе (XP_518248.2; SEQ ID NO:35), собаки (XP_852647.1; SEQ ID NO:36), быка (NP_001040055.1; SEQ ID NO:37), мыши (NP_033986.1; SEQ ID NO:38), крысы (XP_341510.2; SEQ ID NO:39) и красной дикой курицы (XP_418929.1; SEQ ID NO:40). В отношении последовательности CD83 человека, показанной на Фигуре 1, внеклеточный домен соответствует аминокислотным остаткам 20-144. Подчеркнутые остатки идентифицируют положения, где неконсервативные и консервативные аминокислотные замены или делеции встречаются во внеклеточном домене и первом аминокислотном остатке трансмембранного домена выровненных полипептидов CD83 млекопитающих. Подчеркнутые остатки, выделенные жирным шрифтом,

идентифицируют положения, где встречаются консервативные аминокислотные замены или делеции. Белки CD83 мыши и человека имеют 63%-ную идентичность последовательностей. Способность полипептидов CD83ext человека (например, дикого типа (wt) или m3) супрессировать отторжение трансплантата у мышей, крыс и нечеловекообразных приматов (см. примеры) указывает на сохранение структуры и функции CD83 между видами млекопитающих.

Соответственно, в одном аспекте предложен выделенный полипептид sCD83, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности SEQ ID NO:7, в которой аминокислотные остатки 12, 20, 85, 92 и 114 представляют собой аминокислоты, указанные в любой из строк Таблицы 1; и, необязательно, один или несколько аминокислотных остатков 1, 2, 3, 4 и 130 отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид sCD83 по существу состоит или состоит из указанной выше аминокислотной последовательности. Предпочтительно, аминокислота 85 представляет собой серин и аминокислоты 12, 20, 92 и 144 представляют собой цистеин.

В другом аспекте предложен полипептид sCD83, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную последовательности SEQ ID NO:7, где один или несколько аминокислотных остатков 12, 20, 85 и 92 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от цистеина; и, необязательно, один или несколько аминокислотных остатков 1, 2, 3, 4 и 130 отсутствуют. Предпочтительно, аминокислотный остаток 85 представляет собой аминокислоту, отличную от цистеина, и аминокислотные остатки 12, 20, 92 и 114 представляют собой цистеин. Более предпочтительно, аминокислотный остаток 85 представляет собой серин. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид sCD83 по существу состоит или состоит из указанной выше аминокислотной последовательности. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид sCD83 состоит из SEQ ID NO:7, аминокислотных остатков 1-129 последовательности SEQ ID NO:7, аминокислотных остатков 5-129 последовательности SEQ ID NO:7 или аминокислотных остатков 5-130 последовательности SEQ ID NO:7.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид sCD83 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:31; в которых, необязательно, аминокислотный остаток 126 отсутствует.

Идентичность последовательности новых полипептидов sCD83 по изобретению последовательности SEQ ID NO:7 может быть от 70% до 100%. Предпочтительно, идентичность последовательности составляет по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99%. Аминокислотные остатки в последовательности SEQ ID NO:7 могут быть консервативно или неконсервативно замещены. Предпочтительно, замены являются консервативными. В тех случаях, когда один или несколько аминокислотных остатков 12, 20, 85, 92 и 114 последовательности SEQ ID NO:7 не являются цистеином, их предпочтительно выбирают из группы небольших и/или полярных аминокислот, таких как аланин, глицин, валин, треонин, метионин, лизин, аргинин, глутамин, аспарагин, глутамат, аспартат, и, наиболее предпочтительно, серина.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерным

молекулам, содержащим любые полипептиды, описанные в настоящем изобретении, слитые с гетерологичным полипептидом или аминокислотной последовательностью. Неограничивающие примеры таких химерных молекул включают любые описанные в настоящем изобретении полипептиды, слитые либо на N-конце, либо на C-конце, с

5 аминокислотной последовательностью, которая придает дополнительные свойства функциональности, стабильности или хоуминга. В некоторых вариантах осуществления полипептиды sCD83 по настоящему изобретению содержат либо на N-конце, либо на C-конце, сигнальную последовательность и/или одну или несколько аминокислотных последовательностей, применимых для выделения белка (например, аффинную метку,

10 такую как глутатион-S-трансфераза, поли-His, FLAG, целлюлоза-связывающий домен, домен Fc, Ig и так далее), или часть такой последовательности, которая может сохраняться после процессинга белка. Пептидные фрагменты, добавленные для облегчения очистки, необязательно могут быть удалены до окончательного получения полипептида. В качестве неограничивающего примера полипептид sCD83 может

15 содержать начиная с N-конца GST-tag, сайт расщепления тромбином и последовательность hCD83ext (см., например, SEQ ID NO:8). Этот GST-меченый слитый полипептид может быть выделен путем связывания с иммобилизованным глутатионом, а затем расщеплен тромбином. Продукт расщепления тогда содержал бы карбоксильную часть сайта расщепления тромбином (например, Gly-Ser-Pro-Gly; SEQ ID NO:41), слитую

20 с N-концом hCD83ext. Различные аффинные метки и способы их применения в очистке белка известны специалистам в данной области. См., например, Terpe (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:523-533.

В некоторых вариантах получения химерных полипептидов sCD83 полипептид sCD83 слит на N- или C-конце с Ig или доменом Fc иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2,

25 IgG3, IgG4, IgA и IgGA2.), предпочтительно иммуноглобулином человека. Способы получения таких слитых белков известны специалистам в данной области (см., например, патент США 5428130 и ЕРА 0 464 533). Химерные слитые белки sCD83-Fc или sCD83-Ig могут иметь улучшенные фармакокинетические свойства (ЕРА 0 232 262).

Термины «растворимый CD83», «sCD83», и «CD83ext» в контексте настоящего

30 изобретения относятся к полипептиду, который содержит по меньшей мере часть внеклеточного домена представителя семейства белков CD83 и где растворимый полипептид CD83 не имеет трансмембранного домена CD83, который способен фиксировать указанную молекулу на мембране клетки, которая его экспрессирует. Однако растворимый полипептид CD83 может включать дополнительные остатки

35 полноразмерного нативного белка CD83, которые находятся за пределами внеклеточного домена, например часть трансмембранного домена, которая является недостаточной для фиксации растворимого белка CD83 на мембране клетки, в которой он экспрессируется. Кроме того, полипептиды sCD83 по настоящему изобретению обладают активностью sCD83.

40 Говорят, что полипептид sCD83 обладает «активностью sCD83», если он проявляет по меньшей мере одну активность полипептида sCD83 последовательности SEQ ID NO: 5, измеренную с помощью любого подходящего исследования. Говорят, что полипептид sCD83 обладает «активностью sCD83», если в таком исследовании он обладает по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более активности

45 полипептида sCD83 последовательности SEQ ID NO:5, измеренной в том же исследовании. Предпочтительно, полипептиды sCD83 по настоящему изобретению способны связываться со зрелыми иммуностимулирующими дендритными клетками и снижать способность этих дендритных клеток стимулировать Т-клеточную

пролиферацию. Активность sCD83 можно оценить прямо или опосредованно и ее можно измерить *in vivo* или *in vitro*; подходящие способы известны из уровня техники (см., например, Kruse *et al.* (2000) J. Virol. 74: 7127-7136; Lechmann *et al.* (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821, где описывается предпочтительное исследование для определения связывания дендритных клеток с Т-клетками и образование кластеров дендритных клеток с Т-клетками). В патентной публикации США 20040110673, содержание которой включено в качестве ссылки, описываются исследования активности sCD83, такие как 1) ингибирование созревания незрелых DC в зрелые DC в присутствии смеси для созревания; 2) утрата экспрессии CD80 и CD83 зрелыми DC при культивировании с sCD83; 3) ингибирование способности зрелых DC стимулировать пролиферацию Т-клеток в MLR исследованиях; 4) ингибирование характерного образования кластеров DC и пролиферации Т-клеток и 5) ингибирование экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЕАЕ) у мышей. В Примере 4 настоящей заявки описывается исследование активности sCD83, в котором измеряют способность sCD83 снижать продукцию TNF- α стимулированными LPS/IFN γ PBMC.

Таким образом, полипептиды sCD83 по изобретению могут снижать способность зрелых иммуностимулирующих дендритных клеток стимулировать Т-клеточную пролиферацию по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% или более по сравнению с соответствующим контролем, например взаимодействием между зрелыми иммуностимулирующими дендритными клетками и Т-клетками в отсутствие sCD83.

В некоторых вариантах осуществления белок sCD83 по настоящему изобретению может снижать экспрессию TNF- α , CD80 и/или CD83 иммуностимулирующими дендритными клетками, созревающими *in vitro* в присутствии растворимого CD83 во время по меньшей мере одной стадии процесса созревания по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% или более по сравнению с соответствующим контролем (см., например, Lechmann *et al.* (2001) J. Exp. Med. 194: 1813-1821; WO 2004/046182; Пример 4). Например, добавление sCD83 к незрелым дендритным клеткам изменяет поверхностную экспрессию, таким образом, что экспрессия CD80 и CD83 снижается. Добавление sCD83 к зрелым дендритным клеткам уменьшает экспрессию CD83, и DC, обработанные sCD83 утрачивают их способность стимулировать Т-клеточную пролиферацию. Таким образом, можно сказать, что sCD83 изменил иммунологический фенотип обработанных клеток. Специалистам в данной области понятно, что широко используемые способы анализа экспрессии маркеров клеточной поверхности (например, FACS анализ) могут иногда давать данные, которые представляют смешанные популяции клеток, и необходимо проявить осторожность, чтобы идентифицировать, какие популяции могут быть представлены в конкретном наборе данных.

В соответствии с настоящим изобретением производные полипептида sCD83 могут иметь одну или несколько аминокислот с измененной боковой цепью. Такие производные полипептиды включают, например, полипептиды, содержащие аминокислоты, в которых свободные аминогруппы образуют амингидрохлориды, р-толуолсульфонильные группы, карбобензоксигруппы; свободные карбоксильные группы образуют соли, сложные метиловые и этиловые эфиры; свободные гидроксильные группы, которые образуют О-ацильные или О-алкильные производные, а также природные аминокислотные производные, например 4-гидроксипролин для пролина, 5-гидроксилизин для лизина, гомосерин для серина, орнитин для лизина и так далее. Также включены аминокислотные производные, которые могут изменять ковалентное связывание, например дисульфидную

связь, которая образуется между двумя остатками цистеина, что дает циклический полипептид. Растворимый полипептид sCD83 или его производные могут иметь нативный профиль гликозилирования молекулы CD83 или измененный профиль гликозилирования или может быть негликозилированным.

5 Полипептиды sCD83 по настоящему изобретению могут представлять собой мономерный, димерный или мультимерный полипептид sCD83. Димеризация или мультимеризация может достигаться путем образования одной или нескольких дисульфидных связей между остатками цистеина, находящимися в мономерной форме белка sCD83 (которые находятся, например, в положениях 12, 20, 85, 92 и 114

10 последовательности SEQ ID NO:5), или посредством бифункциональной линкерной молекулы (например, диамина, соединения дикарбоновой кислоты или подобного), соединяющей одинаковые или различные функциональные фрагменты (например, карбоксильные группы, аминокислотные группы, гидроксигруппы, тио группы и так далее) в мономерной форме полипептида sCD83. Последнее также включает применение

15 полипептидных линкеров, например, из небольших полярных аминокислотных остатков, таких как $-(\text{Gly})_x\text{Ser}_y-$ (где x , например, равен 3 или 4, а y , например, равен 1-5)) с получением на выходе димерных структур, которые непосредственно могут быть получены с помощью рекомбинантных технологий. В предпочтительных вариантах осуществления sCD83 представляет собой мономер.

20 Полипептиды sCD83 могут представлять собой слитые белки по меньшей мере части внеклеточного домена CD83 и производные (см., например, WO 2004/046182), при условии что слитые белки сохраняют одну или более активностей sCD83, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления белки, содержащие дополнительные остатки CD83 за пределами внеклеточного домена, охватываются

25 термином «растворимый CD83». Таким образом, растворимые производные включают, но не только, белки, имеющие дополнительные последовательности, присоединенные к С- или N-концам, например те, которые несут часть трансмембранного домена на их С-конце или несущие на N-конце короткий пептид (например, Gly-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO:41)), которые могут являться результатом расщепления сайта тромбина тромбином,

30 например, как продукт сконструированного слитого белка, или короткий пептид, полученный из фрагмента GST после расщепления слитого белка), а также Ig и Fc слияния.

В другом варианте осуществления представлены выделенные полинуклеотиды, кодирующие полипептиды sCD83 по настоящему изобретению. Таким образом, один

35 вариант осуществления относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который может содержать, состоять из, или по существу состоять из SEQ ID NO:7 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную SEQ ID NO:7; в которой один или несколько аминокислотных остатков 12, 20, 85 и 92 отсутствует или представляет собой

40 аминокислоту, отличную от цистеина; и, необязательно, один или несколько аминокислотных остатков 1, 2, 3, 4 и 130 отсутствует. Предпочтительно, аминокислотный остаток 85 представляет собой аминокислоту, отличную от цистеина. Более предпочтительно, аминокислотный остаток 85 представляет собой серин. Предпочтительно, идентичность последовательностей составляет по меньшей мере

45 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере 99%. Используя генетический код, можно легко предусмотреть все нуклеиновые кислоты, соответствующие открытой рамке считывания, кодирующие заданный полипептид.

Еще в одном аспекте представлены векторы, содержащие полинуклеотиды по

настоящему изобретению, а также клетки, содержащие такие векторы. Векторы и клетки применимы для получения композиций CD83ext, описанных в настоящей заявке.

Белки CD83, последовательности нуклеиновых кислот и структуры известны из уровня техники. Последовательность нуклеиновой кислоты кДНК CD83 человека (GenBank регистрационный номер Z11697) представлена в SEQ ID NO:1. Эта последовательность включает кодирующую последовательность от положения 11 до 628 последовательности SEQ ID NO:1 (включая стоп-кодон). Сигнальная последовательность кодируется положениями 11-67 последовательности SEQ ID NO:1. Последовательность, кодирующая зрелый пептид CD83 продолжается от положения 68 до 625. Сайты узнавания рестриктазами находятся в начале и в конце последовательности SEQ ID NO:1 (в положениях 1-6 и 1755-1760). Аминокислотная последовательность CD83 человека (изложенная в GenBank регистрационный номер Q01151 и кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO:1) представлена в SEQ ID NO:2. Другие последовательности CD83 человека доступны в Genbank под регистрационными номерами: NP_001035370 [CD83 антиген изоформа b, *Homo sapiens*; SEQ ID NO:2]; NP_004224 [CD83 антиген изоформа a, *Homo sapiens*]; EAW55353 [CD83 антиген изоформа CRA_c *Homo sapiens*]; EAW55352 [CD83 антиген изоформа CRA_b *Homo sapiens*]; EAW55351 CD83 антиген изоформа CRA_a, *Homo sapiens*]. Такие последовательности могут быть выровнены для определения консервативных доменов.

Последовательности CD83 из других организмов доступны под следующими регистрационными номерами GenBank: ABC68619 [*Salmo salar*]; CAB63843 и NP_033986.1 (SEQ ID NO:38 [*Mus musculus*]; ABM67085 [*Sparus aurata*]; AAP93912 [*Oncorhynchus mykiss*]; AAO62993 [*Ginglymostoma cirratum*]; NP_001040055 [*Bos taurus*; SEQ ID NO:37]; XP_518248 [Pan troglodytes; SEQ ID NO:35]; XP_001093364 [*Macaca mulatta*]; XP_418929 [*Gallus gallus*; SEQ ID NO:40]; NP_001101880 и XP_341510.2 [*Rattus norvegicus*; SEQ ID NO:39]; AAZ06133 [*Mesocricetus auratus*]; ACC60995 [*Marmota monax*] и XP_852647 [*Canis familiaris*; SEQ ID NO:36].

Другие представители семейства белков CD83 могут быть получены путем гибридизации нуклеиновой кислоты, содержащей, например, всю или часть кодирующей области CD83 человека, которая кодирует внеклеточную часть с различными источниками нуклеиновых кислот (например, геномной ДНК, кДНК или РНК) от других животных, таких как млекопитающее, или из других тканей того же организма. Дополнительные полинуклеотиды, кодирующие полипептиды sCD83, могут быть получены посредством *in vitro* или *in vivo* мутации известных и/или выделенных полинуклеотидов sCD83, или такие полинуклеотидные последовательности могут быть синтезированы *in vitro*.

После секвенирования нуклеиновой кислоты, кодирующей природный белок CD83, внеклеточный домен может быть определен путем сравнения внеклеточного домена известных молекул CD83 с внеклеточным доменом клонированной последовательности CD83. Растворимая форма заданного природного белка CD83 затем может быть экспрессирована рекомбинантно с использованием методик, описанных в настоящей заявке. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая растворимый CD83 по настоящему изобретению, может быть получена, встроена в вектор и трансформирована в прокариотические или эукариотические клетки, используя хорошо известные методики, описанные в настоящей заявке, и дополнительно известные из уровня техники (Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989).

Нуклеиновая кислота, представляющая интерес, кодирующая растворимую форму

представителя семейства белков CD83, для применения в соответствии с настоящим изобретением, может быть встроена в вектор экспрессии для экспрессии *in vitro* (например, используя анализы транскрипции/трансляции *in vitro* или коммерчески доступные наборы), или может быть встроена в вектор экспрессии, который содержит промоторную последовательность, которая облегчает транскрипцию и/или трансляцию либо в прокариотах или эукариотах путем переноса вектора экспрессии в подходящую клетку. Термин «вектор» относится к плазмиде, вирусу или другому носителю, известному из уровня техники, с которым можно манипулировать путем вставки или включения полинуклеотида. Такие векторы могут быть использованы для генной манипуляции (т.е. «клонирование векторы») или могут быть использованы для транскрипции или трансляции встроеного полинуклеотида («векторы экспрессии»). Вектор в основном содержит по меньшей мере точку начала репликации для воспроизводства в клетке и промотор. Контрольные элементы, в том числе контрольные элементы экспрессии, как изложено в настоящей заявке, находящиеся в векторе экспрессии, включены для облегчения надлежащей транскрипции и трансляции (например, сигнал сплайсинга для интронов, сохранение правильной рамки считывания гена для возможности осуществления трансляции мРНК в рамке и стоп кодоны и так далее). Термин «контрольный элемент» включает, как минимум, один или более компонентов, присутствие которых может влиять на экспрессию, и также может включать дополнительные компоненты, например лидерные последовательности и последовательности партнеров слияния.

Клетка, в которой вектор может быть воспроизведен и его нуклеиновая кислота транскрибирована или экспрессирована кодируемый полипептид, называется в настоящей заявке «клеткой-хозяином». Этот термин также включает любое потомство рассматриваемой клетки-хозяина. Более того, нуклеиновая кислота, представляющая интерес, в соответствии с настоящим изобретением может быть встроена в вектор экспрессии для экспрессии *in vivo* для соматической генной терапии. С этими векторами, например ретровирусными векторами, аденовирусными векторами, аденоассоциированными вирусными векторами, плазмидными векторами экспрессии, нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению экспрессируются при заражении/введении этого вектора в DC.

Клетки-хозяева включают, но не только, микроорганизмы, такие организмы как бактерии, дрожжи, насекомые и млекопитающие. В предпочтительных вариантах осуществления клеткой-хозяином является *Escherichia coli*. Например, бактерии, трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислотой бактериофага, плазмидной нуклеиновой кислотой или космидной нуклеиновой кислотой, содержащими нуклеиновую кислоту, представляющую интерес; дрожжи, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими нуклеиновую кислоту, представляющую интерес; системы клеток растений, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, T1 плазида), содержащими нуклеиновую кислоту, представляющую интерес; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирус), содержащими нуклеиновую кислоту, представляющую интерес; или системы клеток животных, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, ретровирусными, аденовирусными, вирусом коровьей оспы), содержащими нуклеиновую кислоту,

представляющую интерес, или системы трансформированных клеток животных, сконструированных для стабильной экспрессии.

Для долговременной экспрессии растворимых форм представителей семейства белков CD83 в клетках-хозяевах, предпочтительной является стабильная экспрессия. Таким образом, используя векторы экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации, например, клетки могут быть трансформированы нуклеиновой кислотой, представляющей интерес, контролируемой соответствующими контрольными элементами (например, последовательности промотора/энхансера, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования, и так далее). Необязательно, вектор экспрессии также может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую селективируемый или идентифицируемый маркер, придающий резистентность селективному давлению, тем самым давая возможность идентифицировать клетки, содержащие этот вектор, выращивать и размножать. Альтернативно, селективируемый маркер может быть на втором векторе, то есть котрансфектирован в клетку-хозяина с первым вектором, содержащим полинуклеотид по изобретению.

Может быть использован целый ряд систем селекции, в том числе, но не только, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса, ген гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы, и гены аденин фосфорибозилтрансферазы могут быть использованы в клетках tk, hgp^rt или ap^rt, соответственно. Кроме того, может быть использована антиметаболическая резистентность в качестве основы селекции для dhfr, которая придает резистентность к метотрексату; ген gpt, который придает резистентность к микофеноловой кислоте; ген неомицина, который придает резистентность к аминогликозиду G-418; и ген гидромицина, который придает резистентность гидромицину. Были описаны дополнительные селективируемые гены, а именно trp^B, которые дают клеткам возможность использовать индол вместо триптофана; his^D, который дает клеткам возможность использовать гистидин вместо гистидина; и ODC (орнитиндекарбоксилаза), которая придает резистентность к ингибитору орнитиндекарбоксилазы, 2-(дифторметил)-DL-онитину, DFMO.

Способы трансформации прокариотических и эукариотических клеток нуклеиновыми кислотами, кодирующими полипептиды sCD83 по настоящему изобретению, известны специалистам в данной области. После трансформации, растворимая форма CD83 может быть выделена и очищена в соответствии с общепринятыми способами. Способы получения, очистки и обработки различных белков и их производных, а также нуклеиновых кислот, кодирующих их, также хорошо известны из уровня техники. См., например, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.); см. также патент США № 7169898; патентную заявку США № 10/382397; и патентную заявку США № 10/535522. Например, лизат, полученный из хозяина экспрессии (например, бактерии) может быть очищен с использованием HPLC, эксклюзионной хроматографии, гель электрофореза, аффинной хроматографии, или других способов очистки. По существу чистые белки также могут быть получены путем химического синтеза с использованием синтезатора пептидов (например, Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.; Model 430A или подобного).

Композиции sCD83

Композиции CD83ext могут быть обработаны вместе с подходящими фармацевтически приемлемыми адъювантами и/или носителями для получения лекарственных форм, подходящих для различных показаний и типов пути введения. Подходящая фармацевтическая композиция может включать носители, любой подходящий физиологический раствор или диспергирующее вещество или подобное, солюбилизаторы,

адъюванты, стабилизаторы, консерванты, составы замедленного высвобождения и так далее. Физиологические растворы содержат любой подходящий раствор или дисперсионную среду, такую как солевой раствор или забуференный солевой раствор. Носитель также может содержать антибактериальные и противогрибковые агенты, изотоничные средства и вещества, задерживающие адсорбцию, и подобное. За исключением случаев, когда любая обычно применяемая среда, носитель или агент несовместим с активным ингредиентом, предусматривается его применение. Носитель дополнительно может содержать одно или несколько дополнительных соединений, в том числе, но не только, цитокины, такие как, например, интерлейкин-10 (IL-10) и TGF- β . Примеры таких композиций и способы их получения известны в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1985) Mack Pub. Co., Easton, PA, U.S.).

В публикации PCT WO2004/046182 описываются очищенные полипептиды hCD83ext дикого типа и hCD83m-5 (имеющие последовательности SEQ ID NO:5 и 6 соответственно), полученные в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) при pH 7,6. Однако, как описано в настоящей заявке, CD83ext и его варианты обладают большей стабильностью при получении в виде композиции при более низком pH. Например, очищенный полипептид hCD83ext, такой как полипептид последовательности SEQ ID NO:5, в основном находится в мономерной форме, в тех случаях, когда первый очищен в соответствии со способом, описанным в Примере 1. При хранении в PBS при pH 7,3-7,6, белок постепенно димеризуется и теряет биологическую активность. Напротив, hCD83ext, который хранили при более низких pH, не подвергался той же утрате активности. Неожиданно CD83ext-m5 (SEQ ID NO:6) был более чувствительным к более высокому pH, чем эквивалент дикого типа (SEQ ID NO:5).

Соответственно, представлена фармацевтическая композиция, содержащая: полипептид CD83ext и физиологически приемлемый буфер с pH от 4,0 до 5,0. Предпочтительно, pH составляет от 4,3 до 4,7. Наиболее предпочтительно, pH составляет примерно 4,5. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид CD83ext представляет собой полипептид последовательности SEQ ID NO:4, 5, 6 или 7. Предпочтительно, буфер представляет собой ацетатный буфер, наиболее предпочтительно 20 mM ацетатный буфер, pH ~4,5.

Заявители также обнаружили, что стабильность и биологическая активность hCD83ext улучшается путем получения композиции, содержащей трегалозу. Соответственно, представлена композиция, которая содержит полипептид sCD83, составленный в композицию в 1-15% (масс/об) трегалозе. Предпочтительно трегалоза присутствует в концентрации примерно от 5 до 12% масс./об., наиболее предпочтительно примерно 10% масс./об..

В некоторых вариантах осуществления композиции sCD83 по настоящему изобретению дополнительно могут содержать один или несколько эксципиентов, таких как, но не только, буферы, соли, поверхностно-активные вещества, полиспирты, сахара поливалентных металлов, модификатор вязкости, антиоксидант и криопротекторы и их сочетания. Такие эксципиенты включают, но не только, глицин, гистидин, Fe(3+), Mg(2+), аскорбиновую кислоту, метионин, витамин E, EDTA и сочетания аргинина плюс глутаминовая кислота.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептиды CD83ext получают в концентрации от 1,5 до 2,5 (предпочтительно 2,0) мг/мл в 20 mM ацетатном буфере pH 4,5, 10% масс./об. трегалозы, 0,5% масс./об. аскорбиновой кислоты и необязательно, 50 mM аргинина плюс 50 mM глутаминовой кислоты и хранят замороженным

(предпочтительно, примерно при -20°C). Такие композиции являются стабильными после многократных циклов замораживания и оттаивания и подходят для введения пациенту. Все предпочтительные эксципиенты либо находятся в списке неактивных ингредиентов FDA, либо находятся в одобренных для внутривенного применения лекарственных продуктах.

Может быть использован любой путь введения, в том числе, но не только, чрескожный, внутрикожный (i.c.), внутрибрюшинный (i.p.), подкожный (s.c.), внутримышечный (i.m.), внутривенный (i.v.), межузловой (i.n.), и так далее, может быть выбран для доставки CD83ext и их производных. Предпочтительно, CD83ext вводят внутривенно. Специалисту в данной области будет понятно, что различные формы введения подойдут для различных соединений и/или показаний, и сможет выбрать наиболее подходящий способ введения. Например, псориаз можно лечить местно композицией, подходящей для нанесения на кожу, тогда как системную красную волчанку можно лечить путем введения пациенту композиции, подходящей для интраперитонеальной инъекции. Практикующим специалистам в данной области знакомы критерии и способы установления дозировок и введения соединений, такие как, например, оценка результатов общепринятых клинических и лабораторных тестов, включая биохимические и иммунологические исследования. Где целесообразно, компоненты лекарственного средства можно вводить по отдельности.

Для терапевтического или профилактического применения, соединения по настоящему изобретению отдельно или в сочетании с другими иммуномодулирующими соединениями (например, антигенами, индуцирующими толерантность, циклоспорином А, FK506 плюс MMF, рапамицином плюс CD45RB, кортикостероидами и так далее), вводят пациенту, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно пациенту человеку для лечения или профилактики способом, подходящим для этого медицинского показания.

В некоторых вариантах осуществления sCD83 вводят пациенту путем предоставления пациенту нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок sCD83. Например, sCD83 мог быть введен пациенту в виде ДНК или мРНК, кодирующей полипептид sCD83 последовательности SEQ ID NO:7. Аналогично в некоторых вариантах осуществления sCD83 доставляют в клетки *in vitro* или *in vivo* путем трансформации клетки-хозяина (т.е. клетки) нуклеиновой кислотой, которая кодирует белок sCD83; трансформированная клетка-хозяин затем может экспрессировать белок sCD83, тем самым доставляя белок sCD83 в другие клетки, а также в нее саму (т.е. трансформированную клетку-хозяин). В таких вариантах осуществления подходящие клетки-хозяева включают дендритные клетки. В вариантах осуществления, в которых sCD83 представлен в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей белок CD83, термин «sCD83» также может относиться к нуклеиновой кислоте, кодирующей белок sCD83. Может быть использована любая нуклеиновая кислота, в том числе ДНК, РНК или синтетическая нуклеиновая кислота, при условии, что она кодирует белок CD83. Нуклеиновая кислота может быть представлена в подходящем векторе для экспрессии кодируемого белка или фрагмента белка. Подходящие векторы и способы их получения известны из уровня техники.

Терапевтические применения sCD83

Композиции sCD83, описанные в настоящей заявке, применяются для профилактики, лечения, уменьшения и/или облегчения по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения, вызванного дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа. Например, полипептид hCD83ext последовательности SEQ ID NO:5 оценивали в различных моделях животных. Используя мышиную модель экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЕАЕ) (модель для рассеянного склероза человека), паралич

мог быть ингибирован под действием sCD83 как в предварительном лечении, так и активном лечении. Последние данные также демонстрируют, что sCD83 способен пролонгировать выживание сердечного и кожного трансплантата у мышей, и при использовании в сочетании с субтерапевтическими дозами хорошо изученных

5 иммуносуппрессирующих средств, sCD83 способен осуществлять долговременное выживание трансплантата в мышинной модели сердечного трансплантата. Экспериментальные данные также указывают на то, что sCD83 может ингибировать проявление диабета I типа в модели на мышах. Более того, также имеются результаты, которые дают возможность предположить, что обработка sCD83 в результате не

10 приводит к глобальной иммуносуппрессии. Примеры, приведенные в настоящей заявке, демонстрируют, что полипептид CD83ext последовательности SEQ ID NO:7 (в которой присутствуют аминокислотные последовательности 1, 2, 3, 4 и 130, аминокислотный остаток 85 представляет собой Ser, и аминокислотные остатки 12, 20, 92 и 114 представляют собой Cys) является эффективным в профилактике отторжения

15 трансплантата в моделях у млекопитающих трансплантации сердца и почек.

Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к способу лечения или профилактики по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения, вызванного дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа у пациента, предусматривающему введение полипептида sCD83 по изобретению указанному

20 пациенту. Дисфункции или нежелательные функции иммунного ответа включают аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата, болезнь трансплантат против хозяина и аллергию. Аутоиммунное заболевание можно лечить, используя новые полипептиды sCD83 по настоящему изобретению, в том числе, но не только, системную красную волчанку, аутоиммунный (I типа) диабет, пузырчатку, диффузный токсический

25 зоб, тиреоидит Хашимото, миастению гравис, аутомиокардит, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, псориаз, аутоиммунный увеоретинит, васкулит, хроническое воспалительное заболевание кишечника, такое как болезнь Крона или язвенный колит, HLA B27-ассоциированные аутоиммуннопатии, такие как болезнь Бехтерева, обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), анкилозирующий спондилит и СПИД.

30 Соответственно, растворимые полипептиды CD83 по настоящему изобретению и/или нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды sCD83, могут быть использованы для получения лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или клинического состояния, вызванного дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа. Например, такие лекарственные средства могут быть

35 использованы для профилактики или лечения аутоиммунных заболеваний, аллергий, астмы, отторжения тканевого или органного трансплантата, или нежелательного иммунного ответа на терапевтическую композицию, таким образом, что нежелательный иммунный ответ подавляется.

В некоторых вариантах осуществления нежелательный иммунный ответ направлен на терапевтическую композицию и задачей изобретения является вызвать толерантность

40 пациента к такой терапевтической композиции. Пациент считается толерантным и/или иммуносуппрессированным (т.е. иммунологическая толерантность считается индуцированной или приобретенной), если достигается по меньшей мере одна из этих целей.

45 Индукция «иммуносуппрессии» или «толерантности» у пациента в контексте настоящего изобретения означает, что по меньшей мере один симптом заболевания или нарушения, вызванного дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа, вовлекающего дендритные клетки, В-клетки или Т-клетки предотвращается,

лечится, уменьшается или облегчается по сравнению с необработанным контролем или другим соответствующим контролем (например, по сравнению с симптомом до лечения или ожидаемой тяжестью этого симптома в отсутствие лечения, если лечение предназначено для предотвращения развития или для снижения тяжести иммунного ответа). Специалистам в данной области знакомы выбор и применение способов измерения и оценки симптомов, а также выбор соответствующих контролей.

Таким образом, считается, что у пациента вызвана толерантность и/или считается, что произошла иммуносуппрессия, в тех случаях, когда по меньшей мере один симптом заболевания или нарушения, вызванного дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа, уменьшается или облегчается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с соответствующим контролем. В вариантах осуществления, в которых лечение предназначено для снижения риска развития у пациента аутоиммунного заболевания, этот риск уменьшается или ослабляется по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с соответствующим контролем; эту оценку можно провести статистически на популяции пациентов. В тех вариантах осуществления, в которых лечение предназначено для того, чтобы вызвать толерантность у пациента к терапевтической композиции, нежелательная функция иммунного ответа снижена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с соответствующим контролем. В других вариантах осуществления задачи изобретения включают получение толерогенных дендритных клеток; в этих вариантах осуществления «симптом» относится к параметру поведения клеток либо *in vivo*, либо *in vitro*.

Способы по настоящему изобретению применимы для терапевтических целей и, следовательно, предназначены для профилактики, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения, вызванного дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа. Симптом заболевания или нарушения считается уменьшенным или облегченным, если этот симптом снижен, повышен или облегчен, соответствующим образом по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% или более по сравнению с соответствующим контролем, например, по сравнению с симптомом до лечения или по сравнению с ожидаемой тяжестью этого симптома, в тех случаях, когда лечение предполагается профилактическим. Специалисту в данной области знакомы методики и критерии оценки изменения симптомов. Симптомы заболеваний или нарушений, вызванные дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа, известны специалистам в данной области и включают следующие: аномальную гистологическую картину трансплантированной ткани; аномальную функцию трансплантированной ткани; короткую продолжительность времени выживания после такого случая, как, например, диагноза или трансплантации; аномально или нежелательно высокого или низкого уровня или числа индикаторного белка (белков) или другого соединения(й) в крови, например нежелательных антител или нежелательных клеток (например, антиген-специфичных дендритных клеток или Т-клеток); аномально или нежелательно высокого или низкого уровня или числа индикаторных клеток в крови или в других местах в организме, например, нежелательно низкий уровень или число регуляторных Т-клеток, так что инициируется или поддерживается нежелательный иммунный ответ.

При необходимости, *in vivo* приобретение толерантности или толерантность и/или иммуносуппрессия могут быть измерены с помощью анализов *in vitro*, например, в реакции смешанной культуры лимфоцитов с использованием клеток, выделенных от

пациента. Аналогично, приобретение толерантности или толерантность и/или иммуносуппрессию, достигнутую в клетках *ex vivo*, также можно измерить в анализах *ex vivo* с использованием различных типов клеток, таких как, например, дендритные клетки, Т-клетки или В-клетки. Если приобретение толерантности или толерантность и/или иммуносуппрессию измеряют с использованием способа *ex vivo*, считается, что происходит приобретение толерантности или толерантность, если ответ клеток на иммунные стимулы снижен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% или более по сравнению с соответствующим контролем. Подходящие исследования прямо или опосредованно измеряют иммунный ответ и известны из уровня техники, они включают, но не только: реакции смешанной культуры лимфоцитов; анализы цитотоксичности; анализы титра антител; исследования продукции IL-10; исследования продукции TGF- β ; оценку маркеров клеточной поверхности; и исследования экспрессии Foxp3.

Белки sCD83 по настоящему изобретению можно вводить совместно с другими иммуносуппрессирующими соединениями. Термин «иммуносуппрессирующее соединение» относится к соединению, которое способно истощать размер популяции Т и/или В клонов лимфоцитов или которое способно супрессировать их реакционную способность, рост или дифференцировку. Иммуносуппрессирующие соединения для применения в способах по изобретению включают, но не только: ингибитор кальциневрина, включая циклоспорин (также известный как “CsA,” продаваемый на рынке как Neoral® или Sandimmune®) и такролимус (также известный как “FK506,” продаваемый на рынке как Prograf®); ингибиторы метаболизма пуринов, такие как микофенолят мофетил (также известный как “MMF,” продаваемый на рынке как Cellcept®) и азатиоприн (продаваемый на рынке как Azasan® или Imuran®); ингибиторы пролиферации, такие как эверолимус (продаваемый на рынке как Certican®) и сиролимус (также известный как «рапамицин» или «Rapa», продаваемый на рынке как Rapamune®); моноклональные антитела («mAb»), такие как анти-CD45 и анти-CD45RB (см., например, патент США № 7160987); моноклональные антитела, направленные против Т-клеток, такие как ОКТ3; моноклональные антитела, направленные против рецептора IL-2, в том числе гуманизированные анти-TaT антитела, такие как базиликсамаб и даклизумаб; вещества, которые блокируют пути костимуляции Т-клеток, такие как слитый белок CTLA-4-Ig1; вещества, которые способны индуцировать химеризм (т.е. совместное существование иммунных клеток донора и реципиента, в которых ткань трансплантата распознается как своя); и немиелобластные претрансплантационные обработки, такие как циклофосфамид (продаваемый на рынке как Cytoxan®). Для обсуждения иммуносуппрессантов и их мишеней, см., например, Stepkowski (2000) *Expert Rev. Mol. Med.* June 21, 2000: 1-23.)

Под «эффективным количеством» вещества подразумевается, что количество является по меньшей мере достаточным для достижения по меньшей мере одной цели изобретения при введении пациенту в соответствии со способами по настоящему изобретению. Таким образом, например, «эффективное количество» терапевтической композиции sCD83 является по меньшей мере достаточным для того, чтобы вызвать толерантность у пациента к терапевтической композиции при совместном введении пациенту с CD83, или для получения измеряемого эффекта по меньшей мере на один симптом заболевания или нарушения, вызванного дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа. Эффективное количество иммуносуппрессирующего соединения sCD83 можно определить в отношении симптомов, проявляющихся у отдельного пациента или его можно определить по клиническим исследованиям или экстраполировать из

соответствующих исследований в модельных системах. Таким образом, например, эффективное количество иммуносуппрессирующего соединения sCD83 включает количество, которое, как ожидалось бы, продуцирует измеримый эффект по меньшей мере на один симптом заболевания или нарушения исходя из интервала доз, определенного в клиническом исследовании с использованием способа по настоящему изобретению.

Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений, применений или доз. Подходящие введения, применения и дозы будут варьировать в зависимости от целого ряда факторов, в том числе, но не только: специфической активности композиций; рецептуры композиций; массы тела, возраста, состояния здоровья, заболевания и состояния пациента, подвергаемого лечению; и пути введения композиций пациенту. В некоторых случаях минимальное количество sCD83, необходимое для эффективного количества, может быть снижено вследствие наличия у пациента уже существующего растворимого CD83 (см., например, Hock *et al.* (2006) (Tissue Antigens 67: 57-60)); специалисту в данной области будет легко установить дозу и введение, и так далее, для достижения наилучших результатов. Например, sCD83 можно вводить пациенту в интервале, имеющем: нижнюю границу 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 70, 100, 200, 500 или 700 мг/кг или 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50 или 100 г/кг; и верхнюю границу 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 70, 100, 200, 500 или 700 мг/кг или 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 100 или 200 г/кг.

Поскольку у пациента может быть вызвана толерантность к экзогенным соединениям под действием CD83, для терапевтических целей является важным, чтобы пациент не подвергался, по меньшей мере во время лечения или по меньшей мере во время интервала эффективности CD83, воздействию соединений, толерантность к которым не желательна. Таким образом, например, пациента не следует подвергать воздействию опухолевых специфических антигенов и болезнетворных микроорганизмов, включая вирусы, бактерии, плесневые грибы и так далее. В основном, в контексте настоящего изобретения под «пациентом» подразумевается любое животное, нуждающееся в лечении. Таким образом, например, «пациентом» может быть человек или млекопитающее, не являющееся человеком, или может быть другой пациент, которым является животное. В тех случаях, когда требуется профилактика заболевания или клинического состояния, пациента можно лечить с равными промежутками времени (например, приблизительно: каждые два года, каждый год, каждые шесть месяцев, каждые два-четыре месяца или каждый месяц). Однако во всех вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции по настоящему изобретению применяются у пациента, у которого уже идентифицировано конкретное заболевание или нарушение, вызванное дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа, или у пациента, у которого уже была идентифицирована вероятность развития конкретного заболевания или нарушения. Например, может быть установлено, что у пациента, вероятно, развивается такое конкретное заболевание или нарушение как результат проверки семейного анамнеза пациента, медицинского тестирования, такого как генетическое тестирование или тестирование для определения уровней ферментов или метаболитов у пациента, или у которого было диагностировано другое заболевание или нарушение. Таким образом, например, способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения аутоиммунного заболевания, для предотвращения развития аутоиммунного заболевания или для уменьшения риска развития у пациента аутоиммунного заболевания. В основном, курс лечения заканчивается, когда пациент больше не подвергается лечению для облегчения или профилактики конкретного заболевания или клинического состояния,

вызванного дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания или медицинского состояния, вызванного дисфункцией, нежелательной функцией иммунного ответа, где эффективное количество sCD83 вводят пациенту таким образом, чтобы достигалась иммуносупрессия. В одном варианте осуществления нежелательный иммунный ответ выбран из группы, состоящей из аутоиммунных заболеваний, отторжения трансплантата и аллергии. Такие способы дополнительно могут предусматривать введение одного или более из циклоспорина А (CsA); рапамицина плюс анти-CD45RB моноклонального антитела; и такролимуса (FK506) плюс микрофенолят мофетила (MMF).

В предпочтительных вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки, диабета I типа, пузырчатки, болезни Грейвса, тиреоидита Хашимото, миастении гравис, аутомиокардита, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, псориаза, аутоиммунного увеоретинита, васкулита, хронического воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона или язвенного колита, болезни Бехтерева, анкилозирующего спондилита и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

В некоторых вариантах осуществления применение новых полипептидов sCD83 по настоящему изобретению представлено для производства лекарственного средства для лечения или профилактики нежелательного иммунного ответа у пациента млекопитающего.

В другом аспекте представлен способ улучшения исхода трансплантации у млекопитающего реципиента трансплантата, предусматривающий введение указанному реципиенту терапевтически эффективного количества полипептида по любому из пунктов 1-10, и одного или нескольких иммуносуппрессирующих средств, где указанное иммуносуппрессирующее средство действует синергично с указанным полипептидом для улучшения исхода трансплантации. В одном варианте осуществления указанное иммуносуппрессирующее средство представляет собой циклоспорин А. В других вариантах осуществления указанные иммуносуппрессирующие средства представляют собой рапамицин плюс анти-CD45RB моноклональное антитело; или такролимус (FK506) плюс микрофенолят мофетил (MMF).

Способы по изобретению могут быть использованы для лечения пациентов, пораженных или которые могут стать пораженными заболеванием или нарушением, вызванным дисфункцией или нежелательной функцией иммунного ответа, например, таким как: аллергия; астма; отторжение тканевого трансплантата; иммунный ответ на длительно вводимое вещество; аутоиммунное заболевание, такое как миастения гравис, рассеянный склероз, васкулит, хроническое воспалительное заболевание кишечника, такое как болезнь Крона или язвенный колит, анкилозирующий спондилит, системная красная волчанка, заболевания кожи, такие как псориаз, ревматоидный артрит и инсулин-зависимый сахарный диабет; и СПИД. Способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения пациентов, пораженных заболеванием или нарушением, в которое вовлечены В-клетки или В-клеточные функции, такими как, например, В-клеточные гиперплазии, такие как лейкоз (в том числе множественная миелома и острый лимфобластный лейкоз); В-клеточная гиперактивность, связанная со СПИДом; синдром токсического шока; сывороточная болезнь; и парадонтоз (см., например, Mahanonda *et al.* (2002) J. Periodontal Res. 37: 177-183). Сывороточная болезнь представляет собой группу симптомов, вызванных нежелательным иммунным ответом на некоторые лекарственные средства или антисыворотку. То есть сывороточная

болезнь может наступить, когда антисыворотку от другого животного или человека вводят пациенту в попытке индуцировать пассивную иммунизацию. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению относятся к лечению заболевания или нарушения, в которое вовлечены В-клетки или В-клеточные функции, где указанное лечение в результате не приводит к истощению В-клеток, т.е. уменьшению количества и/или подтипов В-клеток у пациента.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению применяют для профилактики, лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома отторжения тканевого трансплантата у реципиента ткани. В таких вариантах осуществления реципиент трансплантата («реципиент» или пациент) может получить лечение с использованием sCD83 и необязательно антиген, ассоциированный с трансплантированной тканью, например, такой как антиген, полученный из или экстрагированный из трансплантированной ткани, например, путем лизиса или гомогенизации образца трансплантированной ткани. В основном, лечение реципиентов трансплантата в соответствии со способами по настоящему изобретению может включать обработку до, совместно с (т.е. в то же время) и/или после трансплантации ткани. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению предотвращают, лечат или облегчают все неблагоприятные симптомы тканевого трансплантата таким образом, чтобы длительное лечение пациента с трансплантатом для предотвращения отторжения стало необязательным; в таких вариантах осуществления, говорится, что у пациента была индуцирована толерантность к трансплантату.

В некоторых вариантах осуществления донор трансплантируемой ткани («донор трансплантата») может быть обработан sCD83 до удаления ткани для трансплантации у заданного реципиента, где целью обработки является индукция толерантности и/или иммуносуппрессии у реципиента с трансплантатом. В некоторых вариантах осуществления как донор трансплантата, так и реципиент трансплантата могут быть обработаны в соответствии со способами по настоящему изобретению.

«Ткань» в контексте настоящего изобретения охватывает отдельные органы и/или специализированные ткани (например, печень, почки, сердце, легкие, кожа, панкреатические островки и так далее), а также «жидкие» ткани (например, кровь, компоненты крови, такие как плазма, клетки, такие как дендритные клетки, и так далее); термин «ткань» также охватывает участки и субчасти отдельных органов и «жидких» тканей.

Специалистам в данной области знакомы способы оценки и лечения реципиентов и доноров трансплантата для достижения наилучшего возможного исхода как для реципиента, так и для донора. Таким образом, специалисты в данной области без труда будут способны оценить и установить дозы и введение CD83, по меньшей мере одного другого иммуносуппрессирующего соединения, и, необязательно, терапевтической композиции, соответствующим образом для конкретного пациента. Из представленного выше обсуждения без труда можно понять, что способы по настоящему изобретению охватывают многочисленные стадии; эти стадии могут быть выполнены в любом порядке, при условии, что выполняется по меньшей мере одна задача настоящего изобретения. Поскольку эти способы могут включать многочисленные введения многочисленных соединений, также может происходить некоторое перекрытие стадий.

Способы по настоящему изобретению, представленные настоящим изобретением, включают применение CD83 и по меньшей мере одного другого иммуносуппрессирующего соединения и для индукции толерантности и/или

иммуносуппрессии у пациента *in vivo*. Способы введения этих веществ пациенту включают, но не только, общепринятые и физиологически приемлемые пути, например, такие как, пероральный, легочный, парентеральный (например, внутримышечную, внутрисуставную, внутривенную (IV) или подкожную инъекцию), ингаляцию (через состав мелкого порошка или мелкодисперсный спрей (аэрозоль)), чрескожный, внутрикожный, назальный, вагинальный, ректальный или подъязычный пути введения.

В тех случаях, когда фармацевтическая композиция содержит нуклеиновую кислоту для введения некоторым видам животных, нуклеиновая кислота для применения в настоящем изобретении может происходить из этих видов. Например, когда фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту (например, ДНК или РНК), кодирующую sCD83 вводят людям, эта нуклеиновая кислота может кодировать полипептид, содержащий sCD83, последовательности SEQ ID NO:7 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 65% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7. Нуклеиновая кислота для применения в настоящем изобретении может быть введена совместно с антигенами, которые повышают проницаемость клеточной мембраны и/или клеточный захват нуклеиновых кислот. Примеры таких средств представляют собой полиамины, как описано, например, Antony *et al.* (1999) Biochemistry 38: 10775-10784; разветвленные полиамины, как описано, например, Escriou *et al.* (1998) Biochem. Biophys. Acta 1368: 276-288; полиаминолипиды, как описано, например, Guy-Caffey *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270: 31391-31396; DOTMA, как описано Feigner *et al.* (1987) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417 и катионные порфирины, как описано, например, Benimetskaya *et al.* (1998) Nucl. Acids Res. 26(23): 5310-5317.

Определения

Используемые в описании и формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явным образом не определяет иное. Например, термин «клетка» включает множество клеток, в том числе их смеси.

В контексте настоящего изобретения термин «содержащий» означает, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключая другие. «Состоящий по существу из» при использовании для определения композиций и способов, будет означать исключение других элементов любого существенного значения для сочетания. Таким образом, композиция, состоящая по существу из элементов, как определено в настоящей заявке, не исключали бы микропримесей в результате способа выделения и очистки и фармацевтически приемлемые носители, такие как фосфатно-буферный солевой раствор, консерванты и подобные. Полипептиды или белок, который «по существу состоит из» заданной аминокислотной последовательности в контексте настоящей заявки содержат от 0-10 дополнительных аминокислот либо на N-конце, либо на C-конце заданной аминокислотной последовательности. Предпочтительно, они содержат не более пяти, предпочтительно не более двух и наиболее предпочтительно не более одной дополнительной аминокислоты на amino и/или карбоксильном конце белка или полипептида. Нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, которые «по существу состоят из» заданной последовательности нуклеиновой кислоты в контексте настоящего изобретения содержат не более тридцати, предпочтительно не более шести, более предпочтительно не более трех и, наиболее предпочтительно, не более одного дополнительного нуклеотида на 5' или 3' конце последовательности нуклеиновой кислоты. «Состоящий из» будет обозначать исключение более чем следовых элементов других ингредиентов и важные стадии способа для введения композиций по настоящему

изобретению. Варианты осуществления, определенные каждым из этих переходных терминов (...)

Термин «дендритные клетки (DC)» относится к многообразной популяции морфологически сходных клеточных типов, обнаруженных в различных лимфоидных и нелимфоидных тканях, Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271-296. Дендритные клетки составляют наиболее эффективные и предпочтительные APC в организме. Хотя дендритные клетки могут быть дифференцированы из моноцитов, они обладают различными фенотипами. Например, конкретный маркер дифференцировки, CD14 антиген, не обнаружен в дендритных клетках, но им обладают моноциты. Также, зрелые дендритные клетки не являются фагоцитирующими, тогда как моноциты являются сильно фагоцитирующими клетками. Было показано, что зрелые DC могут обеспечить все сигналы, необходимые для активации и пролиферации Т-клеток.

«Иммунный ответ» в широком смысле относится к антиген-специфичным ответам лимфоцитов на чужеродные вещества. Говорят, что любое вещество, которое может индуцировать иммунный ответ, является «иммуногенным» и называется «иммуногеном». Все иммуногены являются антигенами; однако не все антигены являются иммуногенными. Иммунный ответ по настоящему изобретению может быть гуморальным (через активность антител) или клеточно-опосредованным (через Т-клеточную активацию).

В контексте настоящего изобретения «консервативная аминокислотная замена» относится к замене аминокислоты на другую аминокислоту в той же группе аминокислот. Аминокислоты могут быть классифицированы в соответствии с их R группами следующими образом: 1) неполярные, алифатические R группы; 2) полярные, незаряженные R группы; 3) ароматические R группы; 4) положительно заряженные R группы; и 5) отрицательно заряженные R группы. Аминокислоты с неполярными, алифатическими R группами включают глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин и пролин. Аминокислоты с полярными незаряженными R группами включают серин, треонин, цистеин, метионин, аспарагин и глутамин. Аминокислоты с ароматическими R группами включают фенилаланин и тирозин. Аминокислоты с положительно заряженными R группами включают лизин, аргинин и гистидин. Аминокислоты с отрицательно заряженными R группами включают аспартат и глутамат.

Термины «полинуклеотид», «нуклеиновая кислота» и «молекула нуклеиновой кислоты» используются взаимозаменяемо для обозначения полимерных форм нуклеотидов любой длины. Полинуклеотиды могут содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и/или их аналоги. Нуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Термин «полинуклеотид» включает, например, одноцепочечные, двухцепочечные и трехспиральные молекулы, ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, зонды нуклеиновой кислоты и праймеры. Помимо нативной молекулы нуклеиновой кислоты, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также может содержать модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты. В контексте настоящего изобретения мРНК относится к РНК, которая может быть транслирована в клетке.

Термин «пептид» используется в самом широком смысле для обозначения соединения из двух или более субъединичных аминокислот, аналогов аминокислот или пептидомиметиков. Субъединицы могут быть соединены пептидными связями. В другом

варианте осуществления субъединица может быть соединена другими связями, например, сложноэфирной, эфирной и так далее. В контексте настоящего изобретения термин «аминокислота» относится либо к природным и/или неприродным, либо синтетическим аминокислотам, включая глицин и как D, так и L оптические изомеры, аналоги

5 аминокислот и пептидомиметики. Пептид из трех или более аминокислот обычно называют олигопептидом, если пептидная цепь является короткой. Если пептидная цепь является длинной, пептид обычно называют полипептидом или белком.

«Средство доставки генов» определяется как любая молекула, которая может нести встроенные полинуклеотиды в клетку-хозяин. Примерами средств доставки генов

10 являются липосомы, биосовместимые полимеры, включая природные полимеры и синтетические полимеры; липопротеины; полипептиды; полисахариды; липополисахариды; искусственные оболочки вирусов; металлические частицы; и бактерии, или вирусы, такие как бакуловирусы, аденовирусы и ретровирусы, бактериофаги, космиды, плазмиды, грибковые векторы и другие рекомбинантные

15 средства, обычно используемые в данной области, которые были описаны для экспрессии в различных эукариотических и прокариотических хозяевах и могут быть использованы для генной терапии, а также для экспрессии простого белка.

«Доставка генов», «перенос генов», «трансфекция» и подобное в контексте настоящего изобретения являются терминами, относящимися к введению экзогенного

20 полинуклеотида в клетку-хозяина, независимо от способа, используемого для введения. Трансфекция относится к доставке любой нуклеиновой кислоты во внутреннее пространство клетки. Доставка гена относится к доставке нуклеиновой кислоты, которая может быть интегрирована в геном клетки-хозяина или которая может реплицироваться независимо от генома клетки-хозяина. Доставка генов или перенос генов не относится

25 к введению мРНК в клетку. Способы трансфекции включают различные методики, такие как электропорация, комплексы доставки нуклеиновой кислоты на основе белка, на основе липидов и катионных ионов, вирусные векторы, доставка «генной пушкой» и различные другие методики, известные специалистам в данной области. Введенный полинуклеотид может стабильно поддерживаться в клетке-хозяине или может быть

30 транзиторно экспрессирован. В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующую полипептиды sCD83, вводится в клетку и транзиторно экспрессируется. Стабильное поддержание обычно требует, чтобы введенный полинуклеотид либо содержал точку начала репликации, совместимую с клеткой-хозяином, либо интегрировался в репликон клетки-хозяина, например экстрахромосомный репликон

35 (например, плазмиду) или ядерную или митохондриальную хромосому. Многочисленные векторы способны опосредовать перенос генов в клетки млекопитающих, как известно из уровня техники и описано в настоящем изобретении.

«Вирусный вектор» определяется как рекомбинантно полученный вирус или вирусная частица, которая содержит полинуклеотид, доставляемый в клетку-хозяина, либо *in*

40 *vivo*, *ex vivo*, либо *in vitro*. Примеры вирусных векторов включают ретровирусные векторы, аденовирусные векторы, адено-ассоциированные вирусные векторы, альфавирусные векторы и подобные. Альфа-вирусные векторы, такие как векторы на основе вируса леса Семлики и векторы на основе вируса Синдбис, также были разработаны для применения в генной терапии и иммунотерапии. См., Schlesinger and

45 Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439 и Zaks *et al.* (1999) Nat. Med. 7:823-827. В аспектах, в которых перенос гена опосредован ретровирусным вектором, векторная конструкция относится к полинуклеотиду, содержащему ретровирусный геном или его часть, и терапевтический ген. В контексте настоящего изобретения «перенос гена,

опосредованный ретровирусом» или «ретровирусная трансдукция» несет тот же смысл и относится к процессу, посредством которого ген или последовательности нуклеиновых кислот стабильно переносятся в клетку-хозяина посредством вируса, входящего в клетку и интегрирующего свой геном в геном клетки-хозяина. Этот вирус может входить в клетку-хозяина посредством своего обычного механизма инфицирования или может быть модифицирован таким образом, чтобы он связывался с другим рецептором поверхности клетки-хозяина или лигандом для входа в клетку. В контексте настоящего изобретения, «ретровирусный вектор» относится к вирусной частице, способной вводить экзогенную нуклеиновую кислоту в клетку посредством вирусного или вирусоподобного механизма вхождения.

Ретровирусы несут свою генетическую информацию в форме РНК; однако, после инфицирования вирусом клетки, РНК обратно транскрибируется в форму ДНК, которая интегрируется в геномную ДНК инфицированной клетки. Интегрированная форма ДНК называется провирусом. В тех аспектах, в которых перенос гена опосредуется ДНК вирусным вектором, таким как аденовирус (Ad), псевдоаденовирус или аденоассоциированный вирус (MV), векторная конструкция относится к полинуклеотиду, содержащему вирусный геном или его часть, и трансген. Аденовирусы (Ad) представляют собой относительно хорошо изученную гомогенную группу вирусов, включающую свыше 50 серотипов. (См., например, WO 95/27071). Ad легко выращивать и для них не требуется интеграция в геном клетки-хозяина. Также были сконструированы рекомбинантные Ad-производные векторы, в частности те, которые снижают способность к рекомбинации и генерации вируса дикого типа (См., WO 95/00655 и WO 95/11984). MV дикого типа обладает высокой инфицирующей способностью и специфической интеграцией в геном клетки-хозяина (См., Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 и Lebkowski *et al.* (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996).

Векторы, которые содержат как промотор, так и сайт клонирования, с которым полинуклеотид может быть оперативно связан, известны из уровня техники. Такие векторы способны транскрибировать РНК *in vitro* или *in vivo* и являются коммерчески доступными из таких источников, как Stratagene (La Jolla, CA) и Promega Biotech (Madison, WI). Для оптимизации экспрессии и/или *in vitro* транскрипции, может быть необходимо удалить, добавить или изменить 5' и/или 3' нетранслируемые области клонов для устранения лишних, потенциально нецелесообразных кодонов, иницирующих альтернативную трансляцию или других последовательностей, которые могут мешать экспрессии или снижать ее, либо на уровне транскрипции, либо трансляции. Альтернативно, консенсусные сайты связывания с рибосомой могут быть встроены сразу же у 5' стартового кодона для усиления экспрессии.

Средства доставки генов также включают некоторые невирусные векторы, в том числе комплексы ДНК/липосома, и комплексы вирусного белка и ДНК направленной доставки. Липосомы, которые также содержат анти тело для направленной доставки или его фрагмент, могут быть использованы в способах по настоящему изобретению. Для усиления доставки в клетку, нуклеиновые кислоты или белки по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с антителами или их связывающими фрагментами, которые связываются с антигенами клеточной поверхности, например TCR, CD3 или CD4.

«Гибридизация» относится к реакции, в которой один или несколько полинуклеотидов взаимодействуют с образованием комплекса, который стабилизируется через водородную связь между основаниями нуклеотидных остатков. Водородная связь

может образовываться посредством спаривания оснований Уотсона-Крика, связывания по Хугстину, или любым другим последовательность-специфичным образом. Этот комплекс может содержать две спирали, образующие дуплексную структуру, три или более спиралей, образующих мультиспиральный комплекс, одиночную

5 самогибридирующуюся спираль и любые их сочетания. Реакция гибридизации может представлять собой стадию в более широком процессе, таком как инициация ПЦР реакции или ферментативное расщепление полинуклеотида под действием рибозима.

Жесткие условия гибридизации представляют собой следующее: предварительная гибридизация фильтров, содержащих нуклеиновую кислоту, представляющую интерес,

10 проводится в течение 8 часов - в течение ночи при 65°C в буфере, состоящем из 6xSSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA и 500 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося. Фильтры гибридизуются в течение 48 часов при 65°C, предпочтительная температура гибридизации, в прегибридизационной смеси, содержащей 100 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося и 5-20x10⁶ имп./мин

15 32P-меченого зонда. После этого, промывания фильтра проводят при 37°C в течение 1 ч в растворе, содержащем 2xSSC, 0,01% Ficoll и 0,01% BSA с последующим промыванием в 0,1xSSC при 50°C в течение 45 мин. После стадий промывки гибридизированные зонды обнаруживаются с помощью автордиографии. Такие способы хорошо известны из уровня техники и представлены у Sambrook *et al.*, 1989; и

20 Ausubel *et al.*, 1989.

Полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) имеет определенный процент (например, 80%, 85%, 90% или 95%) «идентичности последовательностей» в отношении другой последовательности, означает, что при

25 выравнивании, процент оснований (или аминокислот) является таким же при сравнении двух последовательностей. Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, разрывы могут быть введены в одну или обе первую и вторую аминокислотную последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты для оптимального

30 выравнивания и негомологичные последовательности могут не приниматься во внимание для целей сравнения). В предпочтительном варианте осуществления длина эталонной последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, 60% и, еще более предпочтительно, по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 100% длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или

35 нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или положениях нуклеотидов. В тех случаях, когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, как соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы являются идентичными в этом положении

40 (в контексте настоящего изобретения «идентичность» аминокислоты или нуклеиновой кислоты является эквивалентом «гомологии» аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для этих последовательностей, принимая во внимание число разрывов, и длину каждого разрыва, которое необходимо ввести для оптимального

45 выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. В предпочтительном варианте осуществления, процент идентичности между

двумя аминокислотными последовательностями определяется с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453), который был включен в программу GAP в пакет программ GCG (доступно на gcg.com), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250 и значением разрыва 16, 14, 12, 10, 8, 6, или 4 и значением длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Еще в одном предпочтительном варианте осуществления процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с использованием программы GAP в пакете программ GCG (доступно на gcg.com), используя матрицу NWSgapdna. CMP и значение разрыва 40, 50, 60, 70 или 80 и значение длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Особенно предпочтительным набором параметров (и параметром, который должен был использоваться, если не указано иное) являются матрица замен Blossum 62 и штраф за разрыв 12, и штраф за продолжение разрыва 4, и штраф за разрыв в рамке считывания 5.

Процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу массы остатков PAM120, штраф за длину разрыва 12 и штраф за разрыв 4.

Последовательности нуклеиновой кислоты и последовательности белка, описанные в настоящей заявке, могут быть использованы в качестве «поисковой последовательности» для проведения поиска по общедоступным базам данных, например, для идентификации других представителей семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Нуклеотидные поиски BLAST могут быть выполнены с помощью программы NBLAST, шкала=100, размер слова=12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных mMafA молекулам нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Поиски белков по BLAST могут быть выполнены с помощью программы XBLAST, шкала=50, размер слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белка mMafA по настоящему изобретению. Для получения выравниваний с разрывами для целей сравнения, может быть использован Gapped BLAST, как описано у Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. ncbi.nlm.nih.gov.

Термин «выделенный» означает отделенный от компонентов, клеточных и иных, с которыми полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или его фрагмент обычно связаны в природе. Например, в отношении полинуклеотида выделенный полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, который отделен от 5' и 3' последовательностей, с которыми он обычно связан в хромосоме. Как очевидно для специалиста в данной области, неприродный полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагмент(ы) не требуют «выделения» для отличия его от природного аналога. Кроме того, «концентрированный», «отделенный» или «разбавленный» полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагмент(ы), отличимы от их природного аналога тем, что концентрация или количество молекул на единицу объема более «концентрированная» или менее «отделенная», чем его природного аналога. Полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагмент(ы), которые отличаются от природного аналога первичной последовательностью или, например, профилем гликозилирования, не должны присутствовать в его выделенной

форме, поскольку является отличным от его природного аналога по его первичной последовательности, или, альтернативно, по другой характеристике, такой как профиль гликозилирования. Хотя для каждого из описанных в настоящей заявке изобретений четко не обозначено, понятно, что все из указанных выше вариантов осуществления для каждой из композиций, описанных ниже и в соответствующих условиях, 5 представлены настоящим изобретением. Таким образом, неприродный полинуклеотид представлен как отдельный вариант осуществления из выделенного природного полинуклеотида. Белок, полученный в бактериальной клетке, представлен как отдельный вариант осуществления из природного белка, выделенного из эукариотической клетки, 10 в которой он продуцируется в природе. Клетка млекопитающего, например дендритная клетка, является выделенной, если она удалена из анатомической области, в которой она находится в организме.

«Клетка-хозяин», «клетка-мишень» или «клетка-реципиент» включают любую индивидуальную клетку или клеточную культуру, которая может быть или была 15 реципиентом для векторов или включения молекул экзогенной нуклеиновой кислоты, полинуклеотидов и/или белков. Это также включает потомство отдельной клетки и это потомство может быть не обязательно идентичным (по морфологии или по комплементарности геномной или суммарной ДНК) исходной родительской клетке вследствие природной, случайной или намеренной мутации. Эти клетки могут быть 20 прокариотическими или эукариотическими и включают, но не только, бактериальные клетки, клетки дрожжей, клетки животных и клетки млекопитающих, например мышей, крыс, обезьян или человека.

«Пациент» представляет собой позвоночное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человек. Млекопитающее включает, но не только, мышей, 25 обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и домашних питомцев.

«Композиция» означает сочетание активного вещества и другого соединения или композиции, инертного (например, детектируемый агент или метка) или активного, такого как адъювант.

30 «Фармацевтическая композиция» включает сочетание активного вещества с носителем, инертным или активным, который делает композицию пригодной для диагностического или терапевтического применения *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

В контексте настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый носитель» охватывает любой из стандартных фармацевтических носителей, таких как 35 фосфатно-буферный солевой раствор, вода и эмульсии, такие как эмульсия масло/вода или вода/масло, различные типы увлажнителей и другие составы, описанные в настоящей заявке. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см. Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 18th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1990)).

40 «Эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для получения благоприятных или желаемых результатов, таких как суппрессируемый иммунный ответ, лечение, профилактика или облегчение патологического состояния (заболевания, инфекции и так далее). Эффективное количество можно вводить за одно или несколько применений, нанесений или доз. Подходящие дозы будут варьировать 45 в зависимости от массы тела, возраста, состояния здоровья, заболевания или патологического состояния, подвергаемого лечению, или пути введения.

В соответствии с представленным выше описанием следующие примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения различных аспектов настоящего

изобретения. Должно быть понятно, хотя не всегда четко обозначено, что реактивы, описанные в настоящей заявке, приводятся просто в качестве примера и что их эквиваленты известны из уровня техники.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

5 Общие способы:

Общие способы см. Current Protocols in Immunology, eds. Coico *et al.* (Wiley, Hoboken, NJ). Способы очистки sCD83 смотри у Lechmann *et al.* (2002) Protein Expr. Purif. 24:445-452.

Пример 1

10 Биологический процесс получения рекомбинантного hCD83ext в E. coli и последующая очистка

Плазмиду pGEX2ThCD83ext (описанную в патентной публикации США 2007/0167607 и диаграмма которой представлена на Фигуре 2) использовали для экспрессии hCD83ext. В этой плазмиде экспрессия слитых белков GST-hCD83ext находится под контролем
15 IPTG-индуцибельного tac промотора. Последовательность слитого белка показана в последовательности SEQ ID NO:8. В этой последовательности аминокислотные остатки 1-5 соответствуют GST tag, аминокислотные остатки 6-13 соответствуют сайту расщепления тромбином, аминокислотные остатки 14-138 соответствуют внеклеточному домену CD83 человека и аминокислотный остаток 139 (изолейцин) соответствует первой
20 смежной аминокислоте внеклеточного домена CD83 человека. GST tag дает возможность осуществить захват слитого белка с использованием GST аффинной хроматографии. Захваченный белок затем может быть расщеплен (либо на, либо вне колонки) тромбином в сайте расщепления тромбином (между аминокислотными остатками 9 и 10 или SEQ ID NO:8) в месте соединения GST и hCD83ext слияния для высвобождения фрагмента
25 hCD83ext. Вследствие создания сайта расщепления тромбином в месте соединения между GST и hCD83ext, конечный продукт hCD83ext имеет четыре дополнительных аминокислоты (т.е. Gly-Ser-Pro-Gly; SEQ ID NO:41) на амино-конце.

pGEX2ThCD83ext трансформировали в несколько общепринятые штаммы Escherichia coli DH5 α , JM109, HB101 и BL21 для выбора оптимального хозяина для экспрессии
30 hCD83ext. E. coli BL21 превосходил других хозяев для экспрессии (данные не показаны). BL21 (F- ompT- gal- dcm- lon- hsdS (rb- mb-); ATCC регистрационный № BAA-1025) особенно подходит для продукции рекомбинантного белка вследствие инактивации двух протеазных генов (lon и ompT), приводя в результате к снижению протеолиза чужеродных генных продуктов. Снижение протеолиза особенно важно для
35 рекомбинантных белков эукариотического происхождения, таких как hCD83ext, когда E. coli используют в качестве хозяина для экспрессии.

Некоторые культуральные параметры, в том числе состав среды, условия индукции (т.е. временной профиль индукции и концентрация IPTG), скорость перемешивания и температура, были оптимизированы для повышения выхода рекомбинантного hCD83ext.
40 В оптимизированном процессе выделенную колонию BL21/pGEX2ThCD83ext инокулировали в 100 мл среды LB плюс 50 мкг/мл ампициллина (Ap) и инкубировали при 37°C на роторном встряхивателе при 200 об/мин приблизительно в течение 12 часов для получения инокулирующей культуры. Инокулирующую культуру (80 мл) использовали для инокуляции настольного биореактора (Omni-Culture, VirTis, Gardiner,
45 NY, USA), содержащего 1 л рабочего объема культуральной среды (5 г/л NaCl, 20 г/л экстракта дрожжей Bacto, 20 г/л триптона Bacto, 5 г/л глюкозы и 10 мкл/л противопенного вещества Antifoam 289 (Sigma, St. Louis, MO, USA)). Когда плотность клеток достигала OD600 ~2, для индукции добавляли изопропил β -D-

тиогалактопиранозид (IPTG) в концентрации 0,5 мМ. Биореактор затем продували воздухом, стерилизованным фильтрованием со скоростью 2 л/мин для аэрации. pH культуры регулировали при $7,0 \pm 0,1$ путем добавления 3 н. NH_4OH или 3 н. HCl , используя комбинацию pH электрода (Mettler-Toledo, Switzerland), pH-метра (PC310, Suntex, Taipei, Taiwan) и двух перистальтических насосов (101U/R, Watson Marlow, Falmouth, UK). Биореактор работал при 28°C и 650 об/мин приблизительно в течение 6 часов после индукции.

После культивирования клетки собирали центрифугированием при $6000 \times g$ и 2°C в течение 10 мин, взвешивали и осадок хранили при -80°C для последующей обработки. Обычно, клеточный осадок приблизительно 20 г сырой клеточной массы (wsw) мог быть получен из 1 л культуры. Клеточный осадок ресуспендировали при 0,05 г-wsw/мл в фосфатно-буферном солевом растворе (pH 7,3). Порцию (20-мл) клеточной суспензии приблизительно 20 OD600 периодически подвергали воздействию ультразвука (т.е 0,5 секунд вкл./0,5 секунд выкл.) в течение 4 минут, используя ультразвуковую установку с обычным наконечником (Misonix). Обработанный ультразвуком клеточный лизат затем центрифугировали при $15000 \times g$ и 2°C в течение 15 минут для удаления клеточного дебриса. Супернатант, содержащий суммарные растворимые белки, фильтровали с использованием 0,45 мкм фильтра перед последующей хроматографической обработкой для очистки белка, а также анализировали с помощью GST анализа, SDS-PAGE и Вестерн блоттинга.

После получения клеточного экстракта, как описано выше, рекомбинантный слитый белок GST-hCD83ext обрабатывали и очищали с использованием трех основных стадий: 1) захват с помощью GST-аффинной колонки, 2) расщепление на колонке тромбином для высвобождения фрагмента hCD83 в жидкую фазу и 3) тонкая очистка с помощью анион-обменной хроматографии для удаления тромбина и других контаминирующих белков (например, эндотоксина) (См., например, Bhikhabhai *et al.* (2005) J. Chromatogr. 1080:83-92; и Dian *et al.* (2002) J. Chromatogr. 769:133-144). Более конкретно, на стадии захвата полученный выше лизат (т.е. профильтрованный супернатант из обработанных ультразвуком клеток, который содержит суммарные растворимые белки, включая слияние GST-hCD83ext в PBS) нагружали на GST аффинную хроматографическую колонку (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Было подсчитано, что GST-аффинная колонка насыщалась бы загруженным GST-hCD83ext приблизительно при 200 Ед GST/мл-колонка-среда. Поскольку уровень специфической экспрессии GST-hCD83ext для обычного образца культуры составлял 2,5 Ед GST/OD600-единиц, лизат, полученный из 80 OD600-единиц клеток на мл-колонка-среда, нагружали на колонку GSTrap.

Определяли оптимальное значение концентрации тромбина и времени расщепления для in-situ, расщепления связанного GST-hCD83ext. В две 20 мл GST-аффинных колонки, насыщенные GST-hCD83ext, сначала вручную вводили тромбин (Sigma) в концентрации 80 Ед тромбина/мл-колонка-смола, концентрация предложенная производителем, инкубировали при комнатной температуре в течение 2-4 часов, а затем жидкость из резервуара в GST аффинной хроматографической колонке, содержащая hCD83ext и тромбин, извлекали, используя связывающий буфер в объеме одной колонки. Фрагмент GST наряду с нерасщепленным GST-hCD83ext затем элюировали с колонки буфером для элюции (50 мМ Tris, 10 мМ глутатиона, pH 8,0). Наблюдалось, что 2-часовая инкубация была достаточно длительной для расщепления. Используя время инкубирования 2 часа, тромбин в различных концентрациях (т.е. 80, 40, 20, 10 и 5 Ед тромбина/мл колонка-среда) вводили в пять насыщенных GST-аффинных колонок для тестирования эффективности расщепления и результаты суммированы на Фигуре 3.

Более 95% GST-hCD83ext расщеплялось при концентрации тромбина выше 10 Ед тромбина/мл-среды колонки, которая была определена как оптимальная концентрация тромбина для проведения расщепления на колонке. С такой относительно низкой концентрацией тромбина время инкубирования было продлено до 2,5 часов для обеспечения полного расщепления. Хотя чистота hCD83ext в этой фракции была высокой в соответствии с анализом SDS-PAGE (дорожки 2-5 на Фигуре 3), белок в этой пост-GST фракции был нестабильным и имел тенденцию к деградации (данные не показаны).

Стадия тонкой очистки была предназначена для удаления эндотоксина, тромбина и других контаминирующих белков из hCD83ext. Хроматографическую систему низкого давления (BioLogic LP, BioRad, Hercules, CA, USA), оборудованную сильной анионообменной колонкой (Q, GE Healthcare), использовали для тонкой очистки. Tris буфер (20 mM, pH 7,5) с 50 mM NaCl и Tris буфер с 1 M NaCl использовали в качестве буферов для нагрузки и элюции, соответственно. Фракции, содержащие чистый hCD83ext, собирали и концентрировали ультрафильтрацией, используя кювету с перемешиванием под высоким давлением (Amicon, Model 8010 с диском YM10, Millipore Canada, Cambridge, Ontario, Canada). Конечный продукт hCD83ext стерилизовали фильтрованием перед хранением. Используя эту конечную фракцию продукта, измеряли коэффициент экстинкции hCD83ext, который приблизительно составляет 1,16 OD280-мл/мг/см. Белок может быть дополнительно концентрирован и/или буфер заменен на буфер с низким pH, используя тангенциальную поточную фильтрацию (или аналогичные методики). Результаты, содержащие характерную хроматограмму и SDS/PAGE анализ содержания белка каждой фракции, суммированы на Фигурах 4А и 4В соответственно. Как показано, пул фильтрата содержал очищенный hCD83ext с низким содержанием эндотоксина.

Пример 2

Структурная характеристика hCD83ext дикого типа

Очищенный hCD83ext дикого типа при получении, как описано в Примере 1, и составлении в композицию либо в присутствии, либо в отсутствии 50% глицерина, разрушался при хранении при 4°C, вероятно вследствие собственной неустойчивости этой биомолекулы. По этой причине этот белок хранили при -20°C, что полностью предотвращало разрушение. Тем не менее димеризация все же могла встречаться в этих условиях замораживания во время длительного хранения. Аналитические результаты с использованием SDS-PAGE в редуцирующих и нередуцирующих условиях для нескольких образцов hCD83ext из различных серий экспериментов, и следовательно, различного возраста, суммированы на Фигурах 5 и 6. Несмотря на то что эти образцы показали идентичный профиль при анализе с использованием SDS-PAGE в редуцирующих условиях (Фигура 5), они были совсем другими с точки зрения состава димеров при анализе с использованием SDS-PAGE в нередуцирующих условиях (Фигура 6). В большинстве случаев состав димеров увеличивался монотонно с возрастом образца, указывая на постепенное превращение мономера в димер в этих условиях хранения. Следует отметить, что было по меньшей мере две различные мономерные формы (дорожка 6, Фигура 6) и три различные формы димеров (дорожки 3 и 7, Фигура 6), полученные из различных образцов.

Lechmann *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) 329:132-139) идентифицировал пятый цистеин hCD83ext как ключевой аминокислотный остаток, опосредующий межмолекулярную дисульфидную связь для образования димеров hCD83ext. Однако при хранении в относительно окислительных условиях хранения, представленных выше, анализ SDS-PAGE в нередуцирующих условиях выявил тенденцию очищенных препаратов hCD83ext к образованию димеров, тримеров, тетрамеров и даже более

крупных мультимеров (Фигура 7B). Идентичность этих полос более высокой молекулярной массы была исследована с помощью Вестерн блоттинга с использованием анти-CD83 антител. Вкратце, белки, разделенные с помощью SDS-PAGE в нередактируемых условиях (Фигура 7B), переносили методом электроблоттинга на PVDF мембрану после SDS-PAGE, используя Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) в соответствии со стандартным протоколом (Towbin *et al.* (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76:4350-4354). Электрофоретический перенос проводили при постоянном напряжении 100 В в течение 1 ч. Гибридизацию белок-антитело проводили как описано у Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA, 1989. Моноклональное антитело мыши против CD83 (CD83-1G11, Cedarlane laboratories limited, Hornby, Ontario, Canada) использовали в качестве первичного антитела. Вторичным антителом было антитело козы против Ig мыши, конъюгированное с пероксидазой хрена (Sigma). hCD83-родственные полипептиды (например GST-hCD83ext и hCD83ext) были обнаружены с помощью колориметрического метода с использованием 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида (DAB) в качестве субстрата. Как показано на Фигуре 7C, полосы, соответствующие димерам, тримерам, тетрамерам и даже более высоким мультимерам, были действительно родственными hCD83ext. Эти данные означают, что один или несколько первых четырех остатков цистеина hCD83ext вовлечены в образование внутримолекулярных и/или межмолекулярных дисульфидных связей. Многочисленные формы мономеров и димеров на Фигурах 6 и 7, возможно, могли быть результатом различного спаривания среди этих пяти остатков цистеина, связанных с внутримолекулярными дисульфидными связями. Таким образом, хотя Cys129 является ключевым остатком, направляющим образование межмолекулярной дисульфидной связи для димеризации, другие остатки цистеина также могли быть вовлечены в распространенное образование межмолекулярных дисульфидных связей для мультимеризации.

Пример 3

Конструирование, очистка и характеристика новых мутантных hCD83ext цистеин-серин

Существует пять остатков цистеина (т.е. аминокислотные остатки 27(8), 35(16), 100(81), 107(88), и 129(110) последовательности SEQ ID NO:A (SEQ ID NO:1), обозначенные в настоящей заявке как Cys1, Cys2, Cys3, Cys4 и Cys5 соответственно) в hCD83ext дикого типа, показанного в последовательности SEQ ID NO:A (который соответствует аминокислотным остаткам 20-144 hCD83, показанного в последовательности SEQ ID NO:2). Хотя ранее было продемонстрировано, что Cys 5 является важным в образовании димеров hCD83ext (Lechmann *et al.* (2005)), присутствие мультимеров более высокого порядка, как показано на Фигуре 6, дает возможность предположить, что помимо Cys5, другие остатки цистеина могут быть ответственны за образование межмолекулярных и внутримолекулярных дисульфидных связей. Для исследования этой возможности две плазмиды, pGEX2ThCD83ext (описана выше) и pGEX2ThCD83extmutC129S (описана в патентной публикации США 2007/0167607 и любезно предоставленная г-ном Dr. Alexander Steinkasserer), использовали для сайт-направленного мутагенеза для изучения функции других остатков цистеина hCD83ext. pGEX2ThCD83ext и pGEX2ThCD83extmutC129S являются идентичными за исключением кодона для аминокислотного остатка 129. В pGEX2ThCD83ext этот кодон определяет остаток цистеина дикого типа, тогда как в pGEX2ThCD83extmutC129S этот кодон был мутирован для кодирования остатка серина.

Десять новых плазмид конструировали из pGEX2ThCD83ext или

pGEX2ThCD83extmutC129S, используя сайт-направленный мутагенез для мутации одного или более из трех других кодонов цистеина (т.е. Cys2, Cys3 и Cys4) к кодомам серина (Примечание: эти мутации цистеина в серин называются мутациями «C2S»). Мутантные варианты CD83 C2S были названы CD83m-X,Y,Z, где X, Y и Z обозначают номер(а) цистеинов с мутацией C2S. Термин «CD83m-X,Y,Z» (например, CD83m-3) используется взаимозаменяемо с термином «CD83ext-mX,Y,Z» (например, CD83ext-m3). Например, CD83m-3,4 представляет собой мутантный CD83 с мутацией C2S как в Cys100 (т.е. Cys3), так и Cys107 (т.е. Cys4), тогда как исходный мутантный hCD83extmutC129S может быть обозначен как CD83m-5. Плазмиды, представленные в Таблице 3, названы путем добавления «р» перед соответствующими мутантными вариантами CD83. Последовательности sCD83, на которые имеется ссылка в Таблице 3 посредством SEQ ID NO, соответствуют последовательности внеклеточной области CD83 плюс первая аминокислота трансмембранного домена (Ile). Следует отметить, что эти последовательности не содержат фрагмента GST и сайта расщепления тромбином, которые являются слитыми с N-концом внеклеточного домена, они не включают векторные последовательности.

Таблица 3			
Плазмиды и олигонуклеотиды			
Плазмиды	Генотип	Нуклеотидная последовательность области hCD83, не содержащая аминоконцевой остаток сайта расщепления тромбином	Аминокислотная последовательность области hCD83, не содержащая аминоконцевой остаток сайта расщепления тромбином
pGEX2ThCD83	P _{tac} ::GST-CD83, Ap ^R	Нуклеотидные остатки 68-445 последовательности SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:9
pGEX2ThCD83 _{mutC129S}	P _{tac} ::GST-CD83, C5S Ap ^R	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11
pCD83m-2	P _{tac} ::GST-CD83, C2S Ap ^R	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:13
pCD83m-3	P _{tac} ::GST-CD83, C3S Ap ^R	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
pCD83m-4	P _{tac} ::GST-CD83, C4S Ap ^R	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17
pCD83m-2,3	P _{tac} ::GST-CD83, C2S, C3S, Ap ^R	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19
pCD83m-3,4	P _{tac} ::GST-CD83, C3S, C4S, Ap ^R	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21
pCD83m-2,5	P _{tac} ::GST-CD83, C2S, C5S, Ap ^R	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23
pCD83m-2,5	P _{tac} ::GST-CD83, C3S, C5S, Ap ^R	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25
pCD83m-4,5	P _{tac} ::GST-CD83, C4S, C5S, Ap ^R	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27
pCD83m-2,3,5	P _{tac} ::GST-CD83, C2S, C3S, C5S, Ap ^R	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:29
pCD83m-3,4,5	P _{tac} ::GST-CD83, C3S, C4S, C5S, Ap ^R	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31
Праймер	Последовательность праймера	SEQ ID NO праймера:	
CYS2	5' GTG GAC TTG CCC AGT ACT GCC CCC TGG GAT 3'	SEQ ID NO:32	
CYS3	5' ATC CGA AAC ACT ACG AGC TCC AAC TCG GGG 3'	SEQ ID NO:33	
CYS4	5' GGG ACA TAC AGG AGT ACT CTG CAG GAC CCG 3'	SEQ ID NO:34	

Три праймера (т.е. CYS2, CYS3 и CYS4 в Таблице 1) использовали для сайт-направленного мутагенеза путем направленного воздействия на кодоны Cys2, Cys3 и Cys4. Молчащие мутации также были введены для получения новых сайтов рестрикции (т.е. ScaI для Cys2 и Cys4 и SacI для Cys3) для целей скрининга. Рестрикционное расщепление различных мутантных плазмид под действием ScaI и SacI использовали для скрининга наличия желаемого сочетания мутаций C2S (данные не показаны). Область, кодирующая каждый вариант слитого белка hCD83ext, подтверждалась секвенированием ДНК, и SEQ ID NO, соответствующие кодирующей области (но не содержащие GST-tag и сайт расщепления тромбином), перечислены в Таблице 2. Следует отметить, что кодон аргинина «AGG» (в аминоконцевом остатке номер 50 в hCD83ext) во всех плазидах, полученных авторами изобретения (и возможно в pGEX2ThCD83ext и также pGEX2ThCD83extmutC129S), отличается от соответствующего кодона аргинина «AGA» последовательностью кДНК CD83, депонированной в GenBank, хотя это несоответствие не влияет на последовательность белка CD83.

Получение и очистку каждого мутантного CD83 проводили с использованием протоколов ферментации и очистки, описанных в Примере 1. Обычно два основных пика элюции белка появляются в профиле хроматограммы на стадии тонкой очистки с использованием анион-обменной хроматографии (АЕС) и фракции, соответствующие первому пику собирают и концентрируют с получением конечного продукта hCD83ext. Однако первый пик стадии тонкой очистки для очистки CD83m-2,5, по-видимому, был значительно уменьшен в условиях нормальной работы и большинство из CD83m-2,5 было элюировано во втором пике, когда применяли солевой градиент (Фигура 8). Такой низкий выход не был улучшен, когда pH буфера был снижен до 6,5 (данные не показаны). Тем не менее CD83m-2,5 все еще мог быть очищен путем сбора фракций, соответствующих небольшому первому пику. Структурная характеристика показала, что хотя профиль полосы CD83m-2,5, по-видимому, является сходным с hCD83ext дикого типа в редуцирующем и нередуцирующем SDS-PAGE анализе (Фигуры 9 и 10, соответственно), белок демонстрировал совершенно другой профиль при спектроскопическом анализе с использованием кругового дихроизма (CD) (Фигура 11) и спектрофлуометрии (Фигура 12). Аналогичные результаты наблюдались при очистке двух других мутантных CD83m-2 (Фигура 13) и CD83m-2,3,5 (данные не показаны). Поскольку CD83m-2, CD83m-2,5 и CD83m-2,3,5 имеют общую мутацию C2S на Cys2, эти данные дают возможность предположить, что эта мутации могла привести в результате к значительному изменению структуры белка или биохимических свойств, что усиливает его связывание со смолой АЕС и впоследствии влияет на профиль элюции во время стадии тонкой очистки. На основе предварительной структуры белка внутримолекулярная дисульфидная связь могла образоваться между Cys2 и Cys4. Наличие этой внутримолекулярной дисульфидной связи может быть важным в стабилизации структуры белка или даже улучшения биологической активности.

Используя точно такие же протоколы ферментации и последующей обработки, как для hCD83ext дикого типа и CD83m-5, был получен и очищен CD83m-3. Два основных пика элюции белка появились на стадии тонкой очистки с использованием АЕС (Фигура 14) и указанная выше проблема получения, связанная с CD83m-2 не наблюдалась при получении CD83m-3, означая, что мутация C2S на Cys3 и Cys5 в результате не приводила к значительному структурному изменению. Очищенный CD83m-3 подвергли структурной характеристике с использованием SDS-PAGE (Фигура 15), CD (Фигуры 16 и 17) и спектрофотометрии (Фигура 18) с результатами, сходными с hCD83ext дикого типа и CD83m-5. Следует отметить, что отчетливый и воспроизводимый дуплет

наблюдался на SDS-PAGE в нередуцирующих условиях (Фигура 15). Также следует отметить, что ни одна из этих двух полос, соответствующих дуплету CD83m-3, по-видимому, не имеет идентичной подвижности относительно мономерных видов CD83m-5, но более высокая полоса CD83m-3, по-видимому, имеет идентичную подвижность относительно мономерных видов hCD83ext дикого типа (Фигура 19). Во избежание возможной перестановки дисульфидных связей во время получения образца для SDS-PAGE в нередуцирующих условиях протокол был модифицирован путем предварительной обработки образца N-этилмалеимидом (NEM). NEM алкилирует свободные тиольные группы на остатках цистеина, которые не образовывали дисульфидные связи, и тем самым предотвращают последующее дисульфидное связывание этим остатком цистеина. Выяснено, что модифицированный протокол с использованием NEM обеспечивает более надежный и соответствующий способ для количественного анализа димеров CD83 путем предотвращения любой возможной перестановки дисульфидных связей и мономер CD83 наблюдается в виде одной полосы, а не в виде дуплета (Фигура 20).

Ранее Zinser *et al.* (Immunobiology (2006) 211:449-453) сообщали о том, что Cys5 является основным цистеином, ответственным за димеризацию CD83, и что hCD83ext-m5 образовывал мономеры, а не димеры. Однако авторы настоящего изобретения наблюдали значительную димеризацию hCD83ext-m5 при анализе с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC; Фигура 21) и этот результат согласовывался с результатом SDS-PAGE в нередуцирующих условиях с использованием модифицированного протокола с предварительной обработкой NEM (Фигура 20). Неожиданно димеризация hCD83ext-m3 отсутствовала или была минимальной на основании результатов SEC (Фигура 21) и SDS-PAGE в нередуцирующих условиях по модифицированному NEM протоколу (Фигура 20). Эти результаты дают возможность предположить, что Cys3 или даже другие остатки цистеина (т.е. Cys1, Cys2 и Cys4) также мог играть роль в димеризации CD83. Следует отметить, что молекула hCD83ext-m3, по-видимому, имеет идентичную подвижность относительно мономерных видов hCD83ext дикого типа, но несколько более высокую подвижность, чем CD83m-5 (Фигура 20). Таким образом, мономерные формы hCD83ext-m3 и hCD83ext-m5 могут иметь различную структуру, тогда как мономер hCD83ext-m3 мог иметь аналогичную или даже идентичную структуру белка относительно мономера hCD83ext дикого типа. Все эти варианты CD83, по-видимому, имеют идентичный профиль полос при анализе с помощью SDS-PAGE в редуцирующих условиях (Фигура 22) и SEC в редуцирующих условиях (Фигура 23), в котором наблюдались только мономерные виды.

В заключение, используя SDS-PAGE в нередуцирующих условиях (Фигура 24), авторы изобретения показали, что в отличие от существовавшего ранее утверждения, что hCD83ext-m5 находится только в виде мономера (отметьте, чтобы самостоятельно рассмотреть эту публикацию), другие остатки цистеина в этих мутантных видах могут быть вовлечены в мультимеризацию с образованием димеров, тримеров и даже тетрамеров. Было показано, что эти мультимерные виды связаны с CD83 с помощью Вестерн блоттинга (Фигура 25).

Пример 4

Сравнение биологической активности hCD83ext дикого типа, hCD83m3 и hCD83m5 и действие pH на стабильность белка

Способность hCD38ext дикого типа и мутантного hCD38ext ингибировать продукцию TNF α стимулированными LPS/IFN- γ мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) определяли в анализе *in vitro*, используя PBMC от яванских макаков. В частности,

РВМС яванских макак выделяли и предварительно обрабатывали в течение 12 часов различными концентрациями (0,5, 5, 25 и 100 мкг/мл) hCD83ext дикого типа (полученными с pH 4,5 или 5,5), hCD83ext-m3 или hCD83ext-m5 (501-1). hCD83ext-m3 и hCD83ext-m5 получали при pH 5,5 или 7,6 соответственно. Эти клетки затем активировали в течение 6 часов с помощью LPS (1 мкг/мл) плюс IFN- γ (100 Ед/мл) в присутствии брефелдина А (4 мкг/мл), а затем внутриклеточно окрашивали на наличие TNF α , используя коммерчески доступный набор Fix/Perm. Исследование с помощью проточной цитометрии и анализ величины продукции TNF α оценивали, используя либо миелоидные дендритные клетки, либо моноциты. Результаты выражены в виде % от mDC или моноцитов, продуцирующих TNF α и в средних единицах флуоресценции (MFU), которые представляют уровни TNF α на клетку. Как показано на Фигуре 26, hCD83m-3 является более активным, чем мутант m5, который является более активным, чем hCD93ext дикого типа в ингибировании продукции TNF α стимулированными РВМС. Помимо hCD83ext дикого типа сохраняет более высокую активность при получении при pH 4,5 чем при получении при pH 5,5. Композиции hCD83ext дикого типа либо при pH 4,5, либо pH 5,5 являются более активными, чем композиции при pH 7,6 (данные не показаны).

Активность hCD83ext-m5 и hCD83ext дикого типа сравнивали в аналогичном исследовании ингибирования TNF α , как описано выше, за исключением того, что оба белка дикого типа и мутантный m3 были получены при pH 7,6. Как показано на Фигуре 27, hCD83ext-m5 превосходил два препарата hCD83ext дикого типа по способности ингибировать продукцию TNF α под действием стимулированных LPS/IFN- γ РВМС яванского макака.

Белок hCD83ext дикого типа, первоначально полученный при pH 7,6 (данные показаны на Фигурах 26 и 27), был перенесен буферным обменом в буфер с pH 4,5 или 5,5 и снова протестирован, как описано выше, на способность ингибировать продукцию TNF α стимулированными LPS/IFN- γ РВМС яванского макака *in vitro*. Данные, показанные на Фигуре 28, демонстрируют, что биологическая активность белка дикого типа (WT) может быть усилена путем получения вещества в кислом буфере (pH 4,5 или pH 5,5). Соответственно, pH примерно 4,5-5,5 может стабилизировать hCD83ext, потенциально минимизируя воздействие стресса под влиянием условий среды (например, окисления, дезаминирования, температуры и т.д.). Однако, когда hCD83ext-m3 получали при pH 5,5, он был более активным, чем белок дикого типа, полученный либо при pH 4,5 либо 5,5 (Фигура 29). hCD83ext-m3 также является более активным, чем hCD83ext-m5, однако, hCD83m-5 при pH 5,5 не был протестирован в этом исследовании.

Интересным является тот факт, что, когда способность hCD38ext дикого типа, hCD83ext-m3 и hCD83ext-m5 ингибировать отторжение трансплантата тестировали *in vivo* в модели сердечного трансплантата у мышей (100 мкг на мышь в день в течение 8 дней), казалось было небольшое отличие в их способности продлевать выживание трансплантата. При применении в качестве монотерапии каждая форма была способна продлевать выживание трансплантата по сравнению со средним временем выживания с 8 дней приблизительно до 14 дней. При объединении с продаваемыми иммуносуппрессантами (в том числе циклоспорином), все формы демонстрировали сходные синергетические профили длительного выживания. Следовательно, одно значение hCD83ext-m3 и доведение pH (до низкого pH), по-видимому, улучшало общую стабильность белка.

Улучшенная стабильность/активность hCD83ext-m3 по сравнению с hCD83ext дикого типа была подтверждена в аналогичном исследовании с использованием РВМС человека. Как показано на Фигуре 30, каждый из четырех различных препаратов hCD83ext-m3 (-002-2-3 получен в PBS, pH 5,5; -002-1 получен в Tris, pH 7,6; -003-2-2 получен в PBS pH

5,5 и -003-3-2 получен в PBS, pH 4,5, превосходил hCD83ext дикого типа (обозначен как ARG-021, полученный в PBS pH 7,6) в их способности ингибировать продукцию TNF α стимулированными LPS/IFN- γ PBMC человека.

Пример 5

5 Глицерин стабилизирует композиции hCD83ext

В тех случаях, когда hCD83ext получают для хранения с конечной концентрацией 50% глицерина (также может быть использована более низкая концентрация глицерина) и в последствии тестируют *in vivo* при конечной концентрации глицерина 8% в сочетании с циклоспорином в модели сердечного трансплантата у мышей C57BL/6-to-BALB/c, регистрировали длительное выживание трансплантата (>100 дней), тогда как в экспериментах, в которых глицерин не был включен в исследование этого сочетания, среднее выживание было ограничено приблизительно до 14 дней.

Пример 6

Форсированная деградация hCD83ext дикого типа

15 Исследование форсированной деградации с использованием 021 серии исходного раствора hCD83ext (замороженные аликвоты в PBS pH 7,6, ~6 мг CD83/мл) проводили следующим образом. Несколько аликвот размораживали и объединяли. Растворы получали, как описано в приведенной ниже таблице:

20	Таблица 4	
	Стрессогенные условия для исследования форсированной деградации	
	Стрессогенное условие	Описание
	КТ контроль	Исходный раствор разбавляли водой до конечной концентрации CD83 ~1 мг/мл и держали при окружающих условиях в течение 24 часов.
25	Кислое	Исходный раствор разбавляли HCl до конечной концентрации CD83 ~1 мг/мл и концентрации HCl 50
		мМ, и держали при окружающих условиях в течение 3 или 24 часов.
	Основное	Исходный раствор разбавляли NaOH до конечной концентрации CD83 ~1 мг/мл и концентрации NaOH 50 мМ, и держали при окружающих условиях в течение 3 или 24 часов.
	Окисление	Исходный раствор разбавляли перекисью водорода до конечной концентрации CD83 ~1 мг/мл и концентрации пероксида 1,2% или 0,12%, и держали при окружающих условиях в течение 3 часов.
30	Свет	Исходный раствор разбавляли водой до конечной концентрации CD83 ~1 мг/мл и подвергали воздействию источника света D65/ID65 в течение 1 или 5 дней. Другую аликвоту заворачивали в фольгу и помещали в световую камеру для того, чтобы вызвать деградирующие условия в камере, которые не являются непосредственным результатом воздействия света. Этот темновой контроль оставался в камере в течение 5 дней.
	Нагревание	Исходный раствор разбавляли водой до конечной концентрации CD83 ~1 мг/мл и держали при 70°C в течение 3 или 24 часов.

35 В конце установленного времени воздействия кислые и основные образцы нейтрализовали. Все образцы хранили при -20°C до анализа с помощью SE-HPLC и гелей для изоэлектрического фокусирования (IEF). Результаты SEC-HPLC представлены в Таблице 5.

40	Таблица 5				
	SEC-HPLC: обобщение исследования форсированной деградации				
	УСЛОВИЕ	ПОВТОР	% МОНОМЕРОВ	% АГРЕГАТОВ	% ФРАГМЕНТОВ
	Контроль КТ	1	58,82	4,90	36,28
	Контроль КТ	2	58,78	5,86	35,36
	Контроль КТ	3	58,29	6,53	22,31
	Контроль КТ	4	58,74	6,41	34,85
45	Контроль КТ	5	58,33	7,08	34,60
	Контроль КТ	6	57,02	9,54	33,44
	Контроль КТ	7	53,76	12,46	33,78
	Кислота 3 час	1	65,48	4,06	30,45
	Кислота 3 час	2	64,21	4,85	30,94
	Кислота 24 час	1	77,55	4,06	18,40

5	Кислота 24 час	2	77,33	4,03	18,65
	Основание 3 час	1	40,77	0,66	58,57
	Основание 3 час	2	41,20	1,00	57,80
	Основание 24 час	1	53,54	24,06	23,97
	Основание 24 час	2	54,44	23,41	22,15
10	Нагревание 3 час	1	65,96	0,00	32,43
	Нагревание 3 час	2	66,07	0,00	32,44
	Нагревание 24 час	1	31,93	0,00	68,07
	Нагревание 24 час	2	35,45	0,00	64,55
	Окисление 0,12%	1	51,25	11,48	37,26
15	Окисление 0,12%	2	50,51	12,53	36,96
	Окисление 1,2%	1	37,38	9,62	52,99
	Окисление 1,2%	2	37,46	9,51	53,03
	Свет 1 день	1	45,88	15,70	27,65
	Свет 1 день	2	45,71	15,96	38,33
15	Свет 5 дней	1	27,35	35,58	37,07
	Свет 5 дней	2	27,35	35,45	37,20
	Темновой контроль	1	31,38	36,38	32,25
	Темновой контроль	2	31,35	35,76	32,89
	Темновой контроль	2	31,35	35,76	32,89

Данные, полученные с помощью SE-HPLC и изоэлектрического фокусирования (не показаны), указывают на то, что продукты разрушения hCD83ext являются более электроотрицательными, чем исходное вещество. Это может объясняться в первую очередь многочисленными дезамидированиями или гидролизом и будет оцениваться в осуществляемых в настоящее время исследованиях предварительного формилирования. Эти данные также дают возможность предположить, что кислый pH является стабилизирующим как для степени агрегированности, так и для заряженного состояния hCD83ext. Что касается заряженного состояния, pI составляет 6,9. Другая основная полоса появляется в контроле при комнатной температуре (КТ), с pI ~6,8.

Из аспекта размера молекулы кислые условия (pH~2) поддерживали мономеры (~4% агрегация, такая же, как в КТ контроле). Все другие условия (основание, пероксид, нагревание, свет, КТ) показали повышенную агрегацию. hCD83ext, по-видимому, является устойчивым к свету. Деградация, наблюдаемая для этого образца, наиболее вероятно является следствием воздействия окружающих условий, а не света. Очевидно, что как нагревание (70°C), так и основное условие (pH~12) вызывали быструю деградацию; после 4 часов основные полосы отсутствовали и наблюдалось множество электроотрицательных полос. Кислые условия (pH~2), по-видимому, стабилизируют этот белок как в отношении степени агрегированности, так и заряженного состояния hCD83ext. IEF профиль выглядит интактным, даже по сравнению с КТ контролем.

Для дальнейшего исследования роли pH и его влияния на стабильность белка, hCD83ext дикого типа (серия 021 в PBS при pH 7,6) был свежеразморожен и проанализирован (первая строка Таблицы 6) или хранился при комнатной температуре и 2-8°C, при значениях pH 4, 5, 6, 7, 8 и 9. Образцы держали при -70°C до анализа после 1, 2, 4 и 10 дней хранения. Эти образцы затем анализировали с помощью SEC HPLC (Таблица 6) или с помощью биоанализатора SDS-PAGE Bioanalyzer (в редуцирующих и нередуцирующих условиях; Фигуры 31-35).

Таблица 6					
Обобщение результатов SE-HPLC для pH исследования скорости дегградации					
РН	ТЕМП.	ДНИ	% МОНОМЕРОВ	% АГРЕГАТОВ	% ФРАГМЕНТОВ
Свежеполученный в день анализа		0	54,35	1,98	43,67
		0	59,47	2,20	38,33
		0	57,18	2,13	40,69

		0,35	59,60	6,31	34,09
		0,35	59,83	6,32	33,85
		0,35	59,86	6,76	33,38
5	4	2-8°C	1	52,63	4,32
		2-8°C	10	51,46	4,20
		КТ	1	52,99	0,00
		КТ	10	45,99	2,45
10	5	2-8°C	1	52,36	4,92
		2-8°C	10	51,48	6,97
		КТ	1	53,58	0,00
		КТ	10	41,16	4,61
15	6	2-8°C	1	48,54	6,39
		2-8°C	10	44,16	9,90
		КТ	1	53,81	0,00
		КТ	10	31,17	11,78
20	7	2-8°C	1	56,35	6,02
		2-8°C	10	43,01	12,60
		КТ	1	52,11	0,00
		КТ	10	28,61	17,27
25	8	2-8°C	1	58,75	5,76
		2-8°C	10	12,26	9,75
		КТ	1	53,32	4,66
		КТ	10	31,12	22,25
30	9	2-8°C	1	59,06	9,03
		2-8°C	10	46,87	16,05
		КТ	1	58,07	4,79
		КТ	10	35,57	20,16

Эти данные дают возможность предположить, что условие является более благоприятным для поддержания стабильности sCD83, когда sCD83 забуферен при низком pH (pH 4-5), в этих условиях изменения степени агрегированности и заряженного состояния, по-видимому, являются минимальными. Более того, воздействие основания, пероксида, тепла, света или условий комнатной температуры, по-видимому, увеличивают агрегацию или фрагментацию и/или деградацию.

Все следующие эксперименты на животных были выполнены в соответствии с руководством Канадского комитета по уходу за животными. В экспериментах, описанных ниже, использовали рекомбинантный sCD83 человека, очищенный из *E. coli*, либо форму дикого типа (hCD83ext-wt; SEQ ID NO:5), либо мутантную форму m3 (hCD83ext-m3; SEQ ID NO:7, где аминокислоты 12, 20, 92 и 114 представляют собой цистеин (Cys), а аминокислота 85 представляет собой серин (Ser)).

Пример 7

hCD83ext-m3 индуцирует длительную толерантность к аллотрансплантату в модели почечного трансплантата у мышей

Мышиную модель ортотопического почечного трансплантата (смотри Zhang et al. (2005) *Microsurgery* 16(2):103-109) использовали для оценки способности hCD83ext-m3 индуцировать толерантность к аллотрансплантату. Мыши BALB/c получали почечные аллотрансплантаты от мышей-доноров C57BL/6. Мышей реципиентов либо не обрабатывали (две мыши), либо им вводили hCD83ext-m3 (3 мыши; 100 мкг/мышь/день, внутривенно) за один день до трансплантации (день -1), в день трансплантации (0 день) и в течение семи дней после операции (POD). Две мыши, не получившие обработки, выживали в течение 28 и 35 дней, давая среднее значение времени выживания (MST) $31 \pm 4,9$ дня. Три мыши, обработанные hCD83ext-m3, каждая, выживали в течение более 100 POD. Соответственно, монотерапия с использованием hCD83ext-m3 приводит к

длительному приживлению аллотрансплантата в модели ортотопического почечного трансплантата у мышей. В отдельном эксперименте аналогичные результаты были получены путем обработки с использованием hCD83ext-wt.

Пример 8

CD83ext-wt или CD83-m3 отдельно или в сочетании с циклоспорином А суппрессирует отторжение трансплантата в модели гетеротопического сердечного аллотрансплантата у мышей

Животная модель: модель сердечного трансплантата у мышей от C57BL/6-к-BALB/c

Мышиную модель гетеротопического сердечного аллотрансплантата использовали для определения действия hCD83ext-m3 либо отдельно, либо в сочетании с циклоспорином А (CsA) на предотвращение отторжения эктопических сердечных трансплантатов. Взрослых самцов мышей C57BL/6 (H-2b) использовали в качестве доноров и мышей BALB/c (H-2d) использовали в качестве реципиентов (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA). Внутривенную гетеротопическую трансплантацию сердца проводили как описано ранее (Corry *et al.* (1973) Transplantation 16(4):343-350 и Wang *et al.* (2007) J Immunol 179(7):4451-4463). В этом исследовании трансплантационная хирургия включала перенос полностью МНС-несовместимого сердца от C57BL/6 доноров реципиентам BALB/c таким образом, что у реципиента находилось аутологичное сердце, а также аллогенное сердце.

Реципиенты сердечного трансплантата были обработаны следующим образом: Группа 1 (пять реципиентов) не получали обработки. Группа 2 (3 реципиента) получали монотерапию hCD83ext-m3 путем внутривенного введения в концентрации 100 мкг/мышь/день, с -1 по +7 POD. Группа 3 (4 реципиента) получали монотерапию hCD83ext-m3 путем внутривенного введения в концентрации 100 мкг/мышь/день, с -1 до +7 POD плюс CsA 15 мг/кг/день, ежедневно до окончания эксперимента, подкожно. Сердцебиение трансплантатов контролировали и оценивали ежедневно путем прямой абдоминальной пальпации двойным слепым методом для установления состояния здоровья сердца/отторжения. Выживание сердечного трансплантата измеряли в несколько послеоперационных дней (POD), в которые аллогенное сердце продолжало сокращаться. Результаты представлены в Таблице 7.

Таблица 7

Группа	Выживание сердечного трансплантата (POD)	MST±SD (дни)
1: Необработанный контроль	7, 7, 8, 8, 8	7,6±0,6
2: hCD83ext-m3	13, 14, 14	13,7±0,6
3: hCD83ext-m3+CsA	>100×4	>100

В отдельном эксперименте способность отдельно hCD83ext-wt, отдельно CsA или hCD83ext-wt плюс CsA суппрессировать отторжение сердечного трансплантата оценивали, как описано выше. Реципиенты сердечного трансплантата получали обработку следующим образом: Группа 4 (4 реципиента) получала монотерапию hCD83ext-wt (SEQ ID NO:5) путем внутривенного введения в концентрации 100 мкг/мышь/день со дня до трансплантации до отторжения трансплантата. Группа 5 (6 реципиентов) получала монотерапию CsA (15 мг/кг/день, ежедневно подкожно). Группа 6 (4 реципиента) получала hCD83ext-wt путем внутривенного введения в концентрации 100 мкг/мышь/день плюс CsA 15 мг/кг/день, ежедневно, подкожно со дня до трансплантации на протяжении 7 дней после трансплантации. Результаты представлены в Таблице 8.

Таблица 8

Группа	Выживание сердечного трансплантата (POD)	MST±SD (дни)
4) hCD83ext-wt монотерапия	15, 15, 16, 17	15,8±1,0
5) CsA монотерапия	14, 15, 15, 16, 16, 17	15,5±1,1
6) CD83ext-wt+CsA	29 [†] , >100, >100, >100	>100
[†] Животное умерло с сильным сокращением сердечного трансплантата (предположительно не связано с обработкой)		

Приведенные выше эксперименты демонстрируют, что монотерапия с использованием hCD83ext-m3 и hCD83ext-wt продлевает выживание трансплантата приблизительно в 2 раза по сравнению с необработанными контролями. Более того, hCD83ext-m3 и CD83ext-wt оказывают синергетическое действие с CsA, что дает возможность для длительного выживания аллотрансплантата в отличие от монотерапии с использованием CsA.

В дополнительных экспериментах обработка реципиентов сердечного трансплантата мыши с использованием CsA до POD 50 плюс hCD83ext-m3 (100 мкг, внутривенно в дни -1-+7) приводит к полной толерантности к аллотрансплантату, продемонстрированной отсутствием отторжения после прекращения ежедневной терапии CsA на 50 день (данные не показаны). В отличие от этого монотерапия CsA или монотерапия hCD83ext-m3 приводит к отторжению примерно через 13-17 дней, указывая на то, что hCD83ext-m3 оказывает синергетическое действие с CsA (см. Таблицы 7 и 8). Неожиданно, комбинированная терапия не приводит к постоянной толерантности к аллотрансплантату, когда CsA отменяют на 28 день, указывая на то, что непредвиденно длительное время выживания без отторжения требуется для достижения полной независимой от лекарственных средств толерантности (данные не показаны). Меньшие дозы hCD83ext-m3 (т.е. 3 дозы в дни с -1 по +1) приводят к полному синергизму с CsA, но неполная функциональная толерантность демонстрировалась быстрым отторжением, когда CsA отменяют на 50 день (данные не показаны). Следовательно, продемонстрирован эффект доза-ответ для индукции толерантности к аллотрансплантату.

Пример 9

hCD83ext-m3 препятствует хроническому отторжению аллотрансплантатов почек у крыс

У людей хроническое отторжение происходит месяцы-годы после трансплантации и является наиболее частой причиной отторжения трансплантата. Хроническое отторжение трансплантата приводит в результате к медленному ухудшению функции трансплантата, характеризующемуся патологически в почках атрофией канальцев, интерстициальным фиброзом и фиброзным утолщением интимы артерий.

Общепринятую модель почечного трансплантата у крыс (в основном, как описано у Bédard et al. (2006) Transplantation 81(6):908-14) и в патенте США 7514405, содержание которого включено в качестве ссылки) использовали для оценки, может ли hCD83ext-m3 в сочетании с CsA суппрессировать хроническое отторжение. В этой модели реципиенты почечного трансплантата получали кратковременную обработку (11 дней) дозой циклоспорина (CsA) для предотвращения начала острого отторжения. Такие реципиенты трансплантата достоверно демонстрируют эти патологические изменения, характерные для хронического отторжения трансплантата к 140 дню после операции (POD).

Крысы F344 служили в качестве доноров почек для крыс Lewis. Три контрольных реципиента трансплантата обрабатывали субтерапевтическими дозами одного CsA (0,75 мг/кг/день; POD 0-10). Вторую группу трех реципиентов трансплантатов обрабатывали как CsA (0,75 мг/кг/день; POD 0-10), так и hCD83ext-m3 (100 мкг/день, внутривенно, POD 1-7). Реципиентов трансплантатов скарифицировали на 140 день

после операции (POD) и трансплантированные почки оценивали на признаки хронического отторжения трансплантата с помощью гистологии и иммуногистохимии. Гистологию почек оценивали в баллах посредством независимой оценки патологом атрофии канальцев, атрофии клубочков, интерстициального фиброза, утолщения интимы, клеточных инфильтратов и сморщивания кортикального слоя почек по шкале 0-4, где 0=норма, 1=минимальное изменение, 2=слабовыраженное изменение, 3=умеренное изменение и 4=заметное изменение. Как показано на Фигуре 36, обработка CsA плюс hCD83ext-m3 значительно улучшала ($p<0,05$) оценку в баллах в каждой категории по сравнению с обработкой только CsA. Данные, представленные на Фигуре 37, демонстрируют, что hCD83ext-m3 значительно улучшает ($p<0,05$) иммуногистохимическую классификацию почечных аллотрансплантатов в отношении отложений антител IgG и IgM в клубочках (G) и околоканальцевых капиллярах (PTC) и уменьшает клеточную инфильтрацию клетками CD2, CD4 и ED-1. В заключение, hCD83ext-m3 в сочетании с CsA препятствует хроническому отторжению аллотрансплантата в модели трансплантации почек у крыс. Предотвращение хронического отторжения под действием обработки hCD83ext-m3 плюс CsA связано с уменьшением отложения антител внутри трансплантата и предотвращением атрофии канальцев/интерстициального фиброза, которые являются гистологическими особенностями хронического отторжения у реципиентов с почечным трансплантатом. Эти данные подчеркивают многофункциональность hCD83ext-m3. Помимо этой способности блокировать острое клеточное отторжение, как показано в исследованиях сердечного трансплантата и почечного трансплантата у мышей, приведенных выше, эта модель иллюстрирует его способность супрессировать хроническое воспаление и гуморальные иммунные ответы (т.е. патология хронического отторжения не зависит от острого клеточного отторжения).

Пример 10

Обработка с использованием hCD83ext-m3 плюс циклоспорин А продлевает выживание почечного трансплантата у нечеловекообразных приматов

Одну почку каждого яванского макака реципиента заменяли почкой, которая была удалена у другого яванского макака. Кроме того, нетрансплантированную почку реципиента хирургически удаляли таким образом, чтобы трансплантированная почка поддерживала жизненные функции. Трех реципиентов трансплантата обрабатывали с использованием hCD83ext-m3 (3 мг/кг) внутривенно с -1 по +7 POD (9 доз) вместе с ежедневной субтерапевтической дозой CsA (10 мг/кг внутримышечно) до 50 дня. Три реципиента в контрольной группе получали монотерапию CsA (10 мг/кг внутримышечно). Всех животных подвергали мониторингу на отторжение трансплантата способами, включающими оценку диуреза, уровней сывороточного креатинина и потребление пищи и воды. Одно животное из каждой группы подвергли эвтаназии преждевременно (не на основе острого отторжения), оставляя двух животных в каждой группе для исследования ожидаемого результата анализа. Результаты представлены в Таблице 9.

Таблица 9

	CD83m-3	CsA	Время выживания трансплантата	Среднее значение времени выживания
1	-	10 мг/кг в.м.	33	37
2	-	10 мг/кг в.м.	41	
3	9 доз	10 мг/кг в.м.	52	56
4	9 доз	10 мг/кг в.м.	59	

Ни одно из контрольных животных (которое получало монотерапию CsA) не выжило до даты истечения срока CsA (день 50), тогда как и оба животных, обработанных hCD83ext-m3 плюс CsA, не показали клинических симптомов отторжения на 50 день (т.е. нормальный аппетит, креатинин и диурез). Однако после прекращения CsA у обоих животных, обработанных hCD83ext-m3, было быстрое отторжение, указывающее на недостаточную индукцию толерантности для контроля острого отторжения.

В следующем эксперименте, реципиенты почечного трансплантата будут получать hCD83ext-m3 (10 г/кг/2хдня внутривенно с -1 до +13 POD) плюс CsA (10 мг/кг внутримышечно) ежедневно на протяжении 90 дней с последующим 50%-ным сокращением CsA каждые две недели с этого времени для того, чтобы (1) продемонстрировать клинически релевантный синергизм с CsA и (2) оценить уровень индуцированной функциональной толерантности.

Формула изобретения

1. Выделенный полипептид sCD83, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15.

2. Выделенный полипептид sCD83, состоящий из полипептида, выбранного из группы, состоящей из:

а. аминокислотных остатков 1-125 последовательности SEQ ID NO:15;

б. аминокислотных остатков 1-129 последовательности SEQ ID NO:7, где аминокислотные остатки 12, 20, 92 и 114 последовательности SEQ ID NO:7 представляют собой цистеин и где аминокислота 85 последовательности SEQ ID NO:7 представляет собой серин;

с. аминокислотные последовательности 1-130 последовательности SEQ ID NO:7, где аминокислотные последовательности 12, 20, 92 и 114 последовательности SEQ ID NO:7 представляют собой цистеин и где аминокислота 85 последовательности SEQ ID NO:7 представляет собой серин.

3. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по п.1 или 2, где полинуклеотид содержит старт-кодон, функционально связанный с последовательностью, кодирующей мутант m3 sCD83.

4. Полипептид sCD83, кодируемый полинуклеотидом по п.3.

5. Способ лечения или профилактики хронического воспалительного заболевания кишечника у пациента млекопитающего, включающий введение указанному пациенту полипептида по пп.1, 2 или 4.

6. Способ по п.5, в котором хроническое воспалительное заболевание кишечника выбрано из группы, состоящей из болезни Крона и язвенного колита.

7. Способ лечения или профилактики аутоиммунного заболевания у млекопитающего, включающий введение указанному пациенту полипептида по пп.1, 2 или 4, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из диабета I типа и рассеянного склероза.

8. Способ лечения или профилактики отторжения трансплантата у млекопитающего, включающий введение указанному пациенту полипептида по пп.1, 2 или 4.

9. Способ по любому из пп.5-8, дополнительно включающий введение одного или более циклоспорина А (CsA), рапамицина плюс моноклональное антитело против CD45RB и такролимуса (FK506) плюс микофенолятмофетил (MMF).

10. Применение полипептида по пп.1, 2 или 4 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики хронического воспалительного заболевания кишечника у млекопитающего.

11. Применение полипептида по пп.1, 2 или 4 для лечения или профилактики отторжения трансплантата у млекопитающего.

12. Применение полипептида по пп.1, 2 или 4 для лечения или профилактики аутоиммунного заболевания у млекопитающего, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из диабета I типа, рассеянного склероза, болезни Крона и язвенного колита.

13. Способ улучшения исхода трансплантации у млекопитающего реципиента трансплантата, включающий введение указанному реципиенту терапевтически эффективного количества полипептида по пп.1, 2 или 4 и одного или нескольких иммуносуппрессантов, где иммуносуппрессант действует синергетически с указанным полипептидом для улучшения исхода трансплантации.

14. Способ по п.13, в котором указанный иммуносуппрессант представляет собой циклоспорин А.

15. Способ по п.13, в котором указанные иммуносуппрессанты представляют собой рапамицин плюс моноклональное антитело против CD45RB или такролимус (FK506) плюс микофенолятмофетил (MMF).

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Argos Therapeutics, Inc.
 Brand, Stephen
 Chou, Chih-Hsiung
 Moo-Young, Murray

<120> НОВЫЕ РАСТВОРИМЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ CD83, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ
 ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> ARG047WO

<150> US 61/128,709
 <151> 2008-05-23

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1761
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1761)
 <223> Последовательность нуклеиновой кислоты также представлена в
 GENBANK под регистрационным номером 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 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 Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu 95 100 105	337
cag gac ccg gat ggg cag aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg 110 115 120 125	385
gtg aca gga tgc cct gca cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr 130 135 140	433
aga gcg gag att gtc ctg ctg ctg gct ctg gtt att ttc tac tta aca Arg Ala Glu Ile Val Leu Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr 145 150 155	481
ctc atc att ttc act tgt aag ttt gca cgg cta cag agt atc ttc cca Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro 160 165 170	529
gat ttt tct aaa gct ggc atg gaa cga gct ttt ctc cca gtt acc tcc Asp Phe Ser Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser 175 180 185	577
cca aat aag cat tta ggg cta gtg act cct cac aag aca gaa ctg gta Pro Asn Lys His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val 190 195 200 205	625
tga gcaggatttc tgcaggttct tcttcttgaa gctgaggctc aggggtgtgc	678
ctgtctgtta cactggagga gagaagaatg agcctacgct gaagatggca tcctgtgaag	738
tccttcacct cactgaaaac atctggaagg ggatcccacc ccattttctg tgggcaggcc	798
tcgaaaacca tcacatgacc acatagcatg aggccactgc tgcttctcca tggccacctt	858
ttcagcgatg tatgcagcta tctggtcaac ctcttgaca ttttttcagt catataaaaag	918
ctatggtgag atgcagctgg aaaagggctt tgggaaatat gaatgcccc agctggcccc	978
tgacagactc ctgaggacag ctgtctctct ctgcatcttg gggacatctc tttgaatttt	1038
ctgtgttttg ctgtaccagc ccagatgttt tacgtctggg agaaattgac agatcaagct	1098
gtgagacagt gggaaatatt tagcaaataa tttcttggtg tgaaggctct gctattacta	1158
aggagtaatc tgtgtacaaa gaaataacaa gtcgatgaac tattccccag cagggtcttt	1218
tcatctggga aagacatcca taaagaagca ataaagaaga gtgccacatt,tatttttata	1278
tctatatgta cttgtcaaag aagggttggtg tttttctgct tttgaaatct gtatctgtag	1338
tgagatagca ttgtgaactg acaggcagcc tggacataga gagggagaag aagtcagaga	1398
gggtgacaag atagagagct atttaatggc cggctggaaa tgctgggctg acggtgcagt	1458
ctgggtgctc gtccacttgt ccactatct gggtgcatga tcttgagcaa gttccttctg	1518
gtgtctgctt tctccattgt aaaccacaag gctgttgcat gggctaataga agatcatata	1578
cgtgaaaatt ctttgaaaac atataaagca ctatacagat tcgaaaactcc attgagtcac	1638
tatccttgct atgatgatgg tgttttgggg atgagagggt gctatccatt tctcatgttt	1698

tccattgttt gaaacaaaga aggttaccaa gaagcctttc ctgtagcctt ctgtaggaat 1758
tcc 1761

<210> 2
<211> 205
<212> БЕЛОР
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu 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 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 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 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> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(375)
 <223> Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внеклеточный домен CD83 человека

<400> 3
 acgccgaggg tgaaggtggc ttgctccgaa gatgtggact tgccctgcac cgtcccctgg 60
 gatccgcagg ttccctacac ggtctcctgg gtcaagttat tggaggggtgg tgaagagagg 120
 atggagacac cccaggaaga ccacctcagg ggacagcact atcatcagaa ggggcaaaat 180
 ggttcttttcg acgtcccccac tgaaggccc tattccctga agatccgaaa cactaccagc 240
 tgcaactcgg ggacatacag gtgactctg caggaccgg atgggcagag aaacctaaagt 300
 ggcaaggtga tcttgagagt gacaggatgc cctgcacagc gtaaagaaga gacttttaag 360
 aaatacagag cggag 375

<210> 4
 <211> 125
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(125)
 <223> Внеклеточный домен CD83 человека

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический внеклеточный домен CD83 человека дополнительно содержащий Gly-Ser-Pro-Gly на N-конце и Ile на C-конце

<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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический внеклеточный домен CD83 человека, дополнительно содержащий Gly-Ser-Pro-Gly на N-конце и Ile на C-конце, с

мутацией Cys на Ser (C2S) в положении 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 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 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический внеклеточный домен CD83 человека, дополнительно содержащий Gly-Ser-Pro-Gly на N-конце и Ile на C-конце

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Хаа может быть любым аминокислотным остатком

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Хаа может быть любым аминокислотным остатком

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (85)..(85)

<223> Хаа может быть любым аминокислотным остатком

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (92)..(92)
 <223> Xaa может быть любым аминокислотным остатком

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (114)..(114)
 <223> Xaa может быть любым аминокислотным остатком

<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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический слитый белок GST-hCD83ext

<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 Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
130 135

<210> 9
<211> 126
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(126)
<223> Внеклеточный домен CD83 человека плюс 1-й Ile из
трансмембранного домена

<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 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> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<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 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 Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
115 120 125

<210> 12

<211> 381

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<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 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 Ile
 115 120 125

<210> 14

<211> 381
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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 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> 15
 <211> 126
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<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 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> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий hCD83ext-m4

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

<400> 16

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 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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<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 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 Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
115 120 125

<210> 18
 <211> 381
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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	Lys	Tyr	Arg	Ala	Glu	Ile				
		115					120					125					
.																	
<210> 19																	
<211> 126																	
<212> БЕЛОК																	
<213> Искусственная последовательность																	
<220>																	
<223> Синтетическая конструкция																	
<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	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> 20
<211> 381
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<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 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 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> 22

<211> 381

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<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 Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
115 120 125

<210> 24
<211> 381
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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			

tta	ttg	gag	ggg	ggg	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	ggg	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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<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
		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> 26
<211> 381
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<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 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 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> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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 agt
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> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<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> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический полинуклеотид, кодирующий 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> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<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	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	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>	32														
<211>	30														
<212>	ДНК														
<213>	Искусственная последовательность														
<220>															
<223>	Синтетический праймер														
<400>	32														
gtggacttgc	ccagtactgc	cccctgggat													
															30
<210>	33														
<211>	30														
<212>	ДНК														
<213>	Искусственная последовательность														
<220>															
<223>	Синтетический праймер														
<400>	33														
atccgaaaca	ctacgagctc	caactcgggg													
															30
<210>	34														
<211>	30														
<212>	ДНК														
<213>	Искусственная последовательность														
<220>															
<223>	Синтетический праймер														

<400> 34
gggacataca ggagtactct gcaggacccg

30

<210> 35
<211> 205
<212> БЕЖОК
<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 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 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 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> БЕЛОК
 <213> Canis lupus familiaris

<400> 36

Met Ser Arg Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ala Cys Ser Leu
 1 5 10 15

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 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 80

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 Leu Ala Leu Val Val
 130 135 140

Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Gln Gln Gln
 145 150 155 160

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> БЕЛОК
 <213> Bos taurus

<400> 37

RU 2 535 340 C2

Met Ser Arg Glu Leu Gln Leu 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 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> БЕЛОК
<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

RU 2 535 340 C2

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> BEJOK
<213> Rattus norvegicus

<400> 39

Met Ser Gln Gly Leu Gln Leu 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 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> БЕЛОК
<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

RU 2 535 340 C2

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 Lys Tyr Lys Thr
130 135 140

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

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 41

Gly Ser Pro Gly
1

NP_004224.1 1 -MSRGLQLLLLSCAY-SL--AP--A/TPEVKVACSEDVDLPCTAPWDPQVP 44
 XP_518248.2 1 -MSRGLQLLLLSCAY-SL--AP--A/TPEVKVACSEDVDLPCTAPWDPQVP 44
 XP_852647.1 1 -MSRGLRLLLLSCAC-SL--AP--A/AREVKVACSEAVDLPCTVRRERPRGP 44
 NP_001040055.1 1 -MSRELQLLLLSCAC-SL--AP--A/TQEVKVACSEDVDLPCTAPWDPPLVT 44
 NP_033986.1 1 -MSQGLQLLLFLGCAC-SL--APAMA/MREVTVACSETADLPCTAPWDPQLS 46
 XP_341510.2 1 -MSQGLQLLLLGCAC-SL--APALA/MREVTVACSETADLPCTAPWDPQLS 46
 XP_418929.1 1 MASAAYTLTLFTLCNVWSLINGAAVA/VPDVAVTCFEEALLSCKVLQDSSIA 50

NP_004224.1 45 Y-TVSWVKLLEGGEE---RMETPOEDHLRGQHYHQKGQNGSFDAPNERPY 90
 XP_518248.2 45 Y-TVSWVKLLEGGEE---RMETPOEDHLRGQHYHQKGQNGSFDAPNERPY 90
 XP_852647.1 45 Y-DVSWAKLTEGGEE---KIEELRDG-----LHS-QKEGSLAAPEERLH 83
 NP_001040055.1 45 Y-TVSWAKLTDGGAE---RVEVTQED-----LQSPQQRNSSEAPRERLY 84
 NP_033986.1 47 Y-AVSWAKVSESGTE---SVELPESK-----QNSSFEAPRRRAY 81
 XP_341510.2 47 Y-TVSWAKVSESGNE---RLELPESK-----QNSSVEAPKKRPY 81
 XP_418929.1 51 YQAVSWHKMAGVGDRIAWKVLDVESR-----HPKGLGGSLELSNT-TF 92

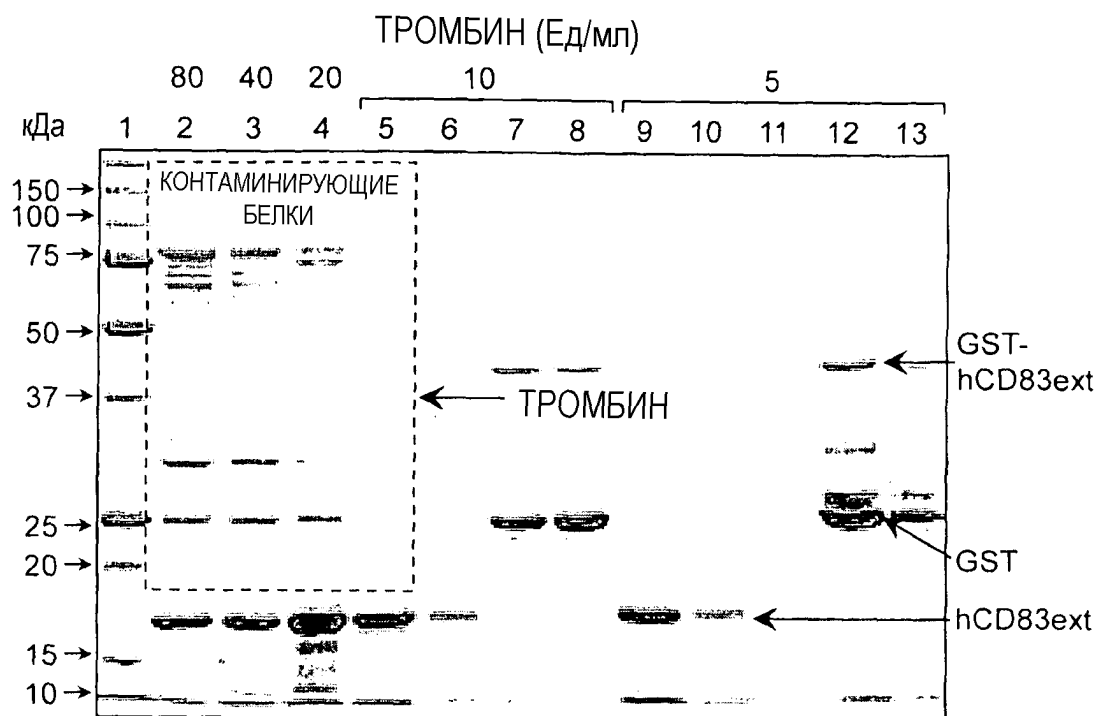
NP_004224.1 91 SLKIRNTTSCNSGTYRCTLQDPDGQRNLSGKVILRVGTGCPAQRKEETFKK 140
 XP_518248.2 91 SLKIRNTTSCNSGTYRCTLQDPDGQRNLSGKVILRVGTGCPAQRKEETFKK 140
 XP_852647.1 84 -LKIRNTTSDSGTYRCTVEELDGQRNQS GTVTLKVTGCPKERK-ETFQK 131
 NP_001040055.1 85 SLRIQNTTSCNSGTYRCTLVVGQEGQRNL TGTVILKVTGCFKGRGETFKN 134
 NP_033986.1 82 SLTIQNTTICSSGTYRCALQELGGQRNLSGTVVLKVTGCPKEATESTFRK 131
 XP_341510.2 82 SLTIQNTTICSAGTYRCALQELGGQRNFSGTVVLKVTGCPKEATESTFRK 131
 XP_418929.1 93 QLRI RNATSQDSGTYKCALGEQRGDHNLSGIITLKVTGCPR-IEDEKLKK 141

ФИГ.1А

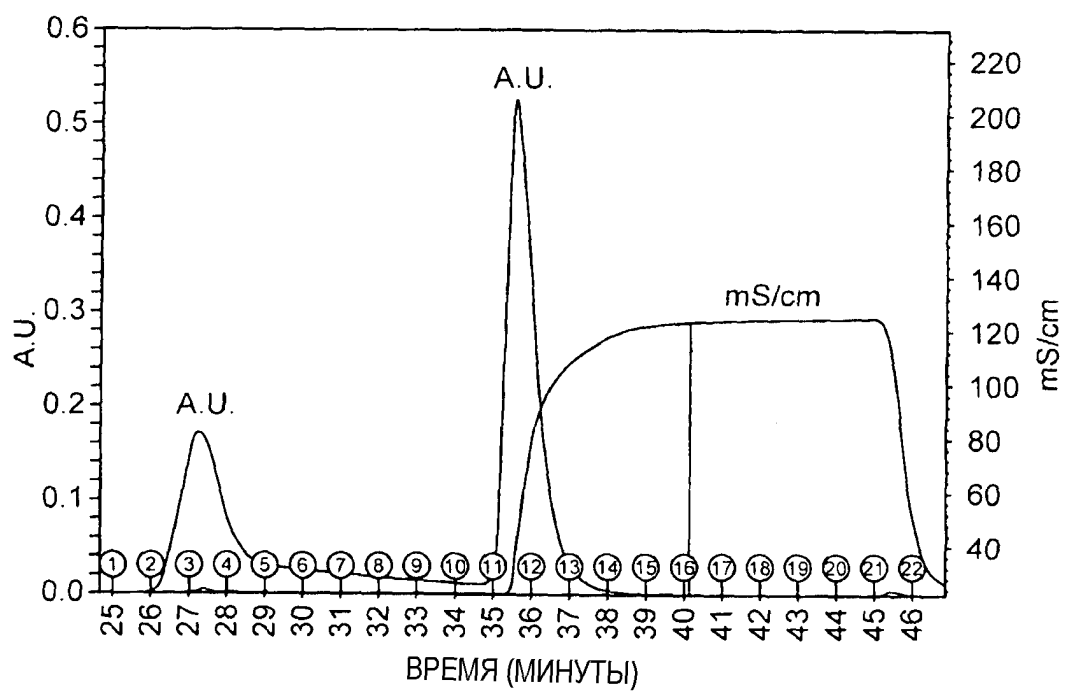
NP_004224.1 141 YRAE/IVLLLALVIFYLTLIIFTCKFARLQSIFP-DFSKAGMERAFLPVTS 189
 XP_518248.2 141 YRAE/IVLLLALVIFYLTLIIFTCKFARLQSIFP-DFSKAGMERAFLPVTS 189
 XP_852647.1 132 YRAE/IVLLLALVVIFYLTLIIFTCKFAQQQSIFP-DFSKPRMERAFLPVTS 180
 NP_001040055.1 135 YRAE/IVLLLALVIFYVTLIIFTCKFARQQSIFP-DFSKPVLEHAFLPVTS 183
 NP_033986.1 132 YRAE/AVLLFSLVVIFYLTLIIFTCKFARLQSIFP-DISKPGTEQAFLPVTS 180
 XP_341510.2 132 YRAE/AVLLFSLVVIFYLTLIIFTCKFARLQSIFP-DISKPGTEQAFLPVTS 180
 XP_418929.1 142 YKTE/LFMLTCLGIFYLLLIFFTCTCLRKESMSPSDKSRDSKRTLTLINA 191

NP_004224.1 190 PN----KHLGLVTPHKTELV---- 205 (SEQ ID NO:2)
 XP_518248.2 190 PN----KHLGPVTPHKTELV---- 205 (SEQ ID NO:35)
 XP_852647.1 181 PH----KHLESVTFHKTEVV---- 196 (SEQ ID NO:36)
 NP_001040055.1 184 PN----KHLEPVTLHKTELV---- 199 (SEQ ID MO:37)
 NP_033986.1 181 PS----KHLGPVTLPKTETV---- 196 (SEQ ID NO:38)
 XP_341510.2 181 PS----KHLGPVTLPKTETV---- 196 (SEQ ID NO:39)
 XP_418929.1 192 HEMTTLRVLNSGSTCKSGLTSSSI 215 (SEQ ID NO:40)

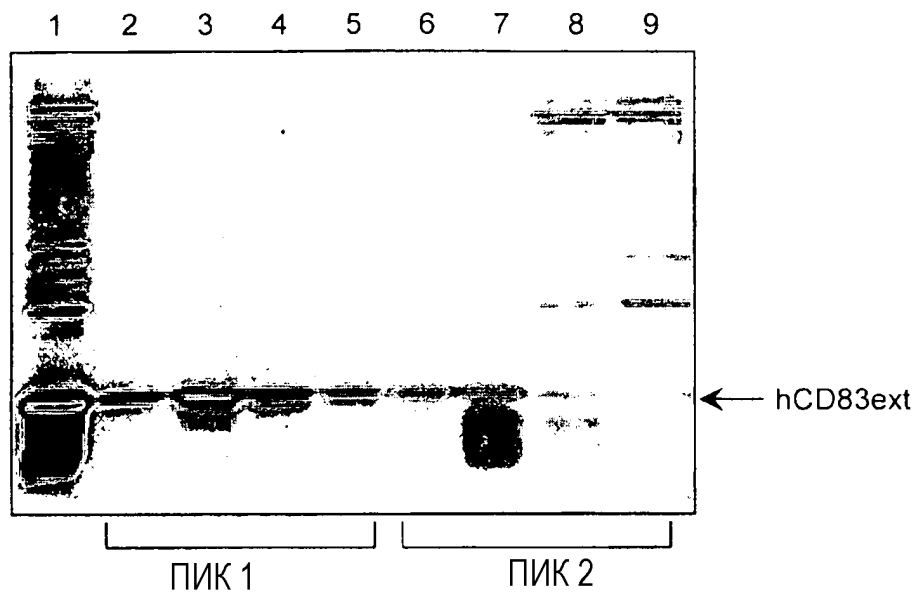
ФИГ.1В



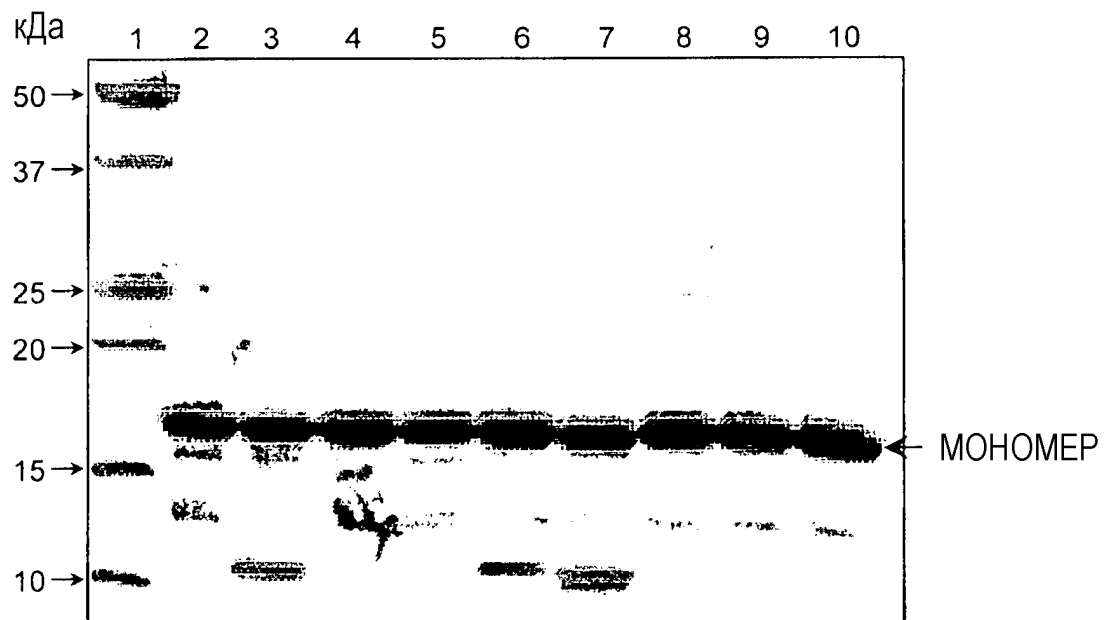
ФИГ.3



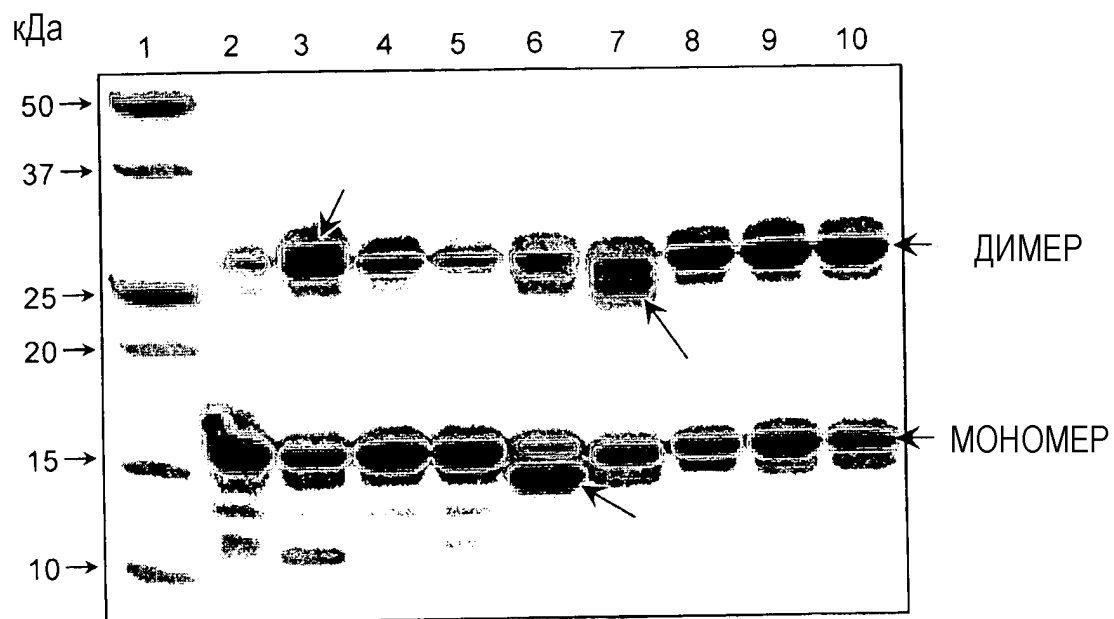
ФИГ.4А



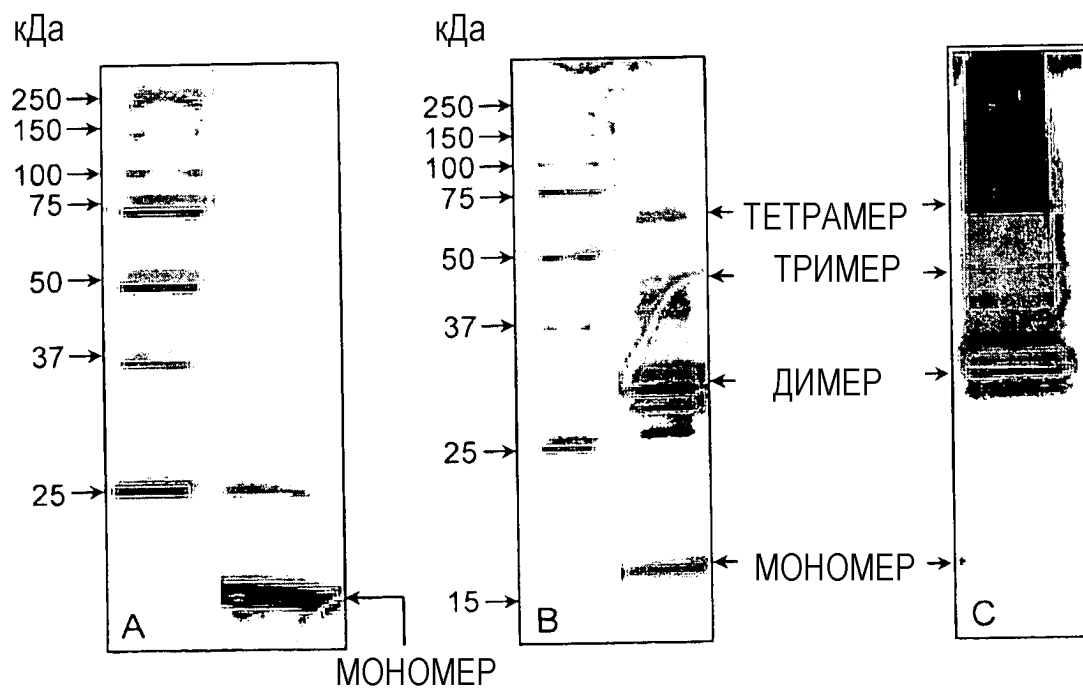
ФИГ.4В



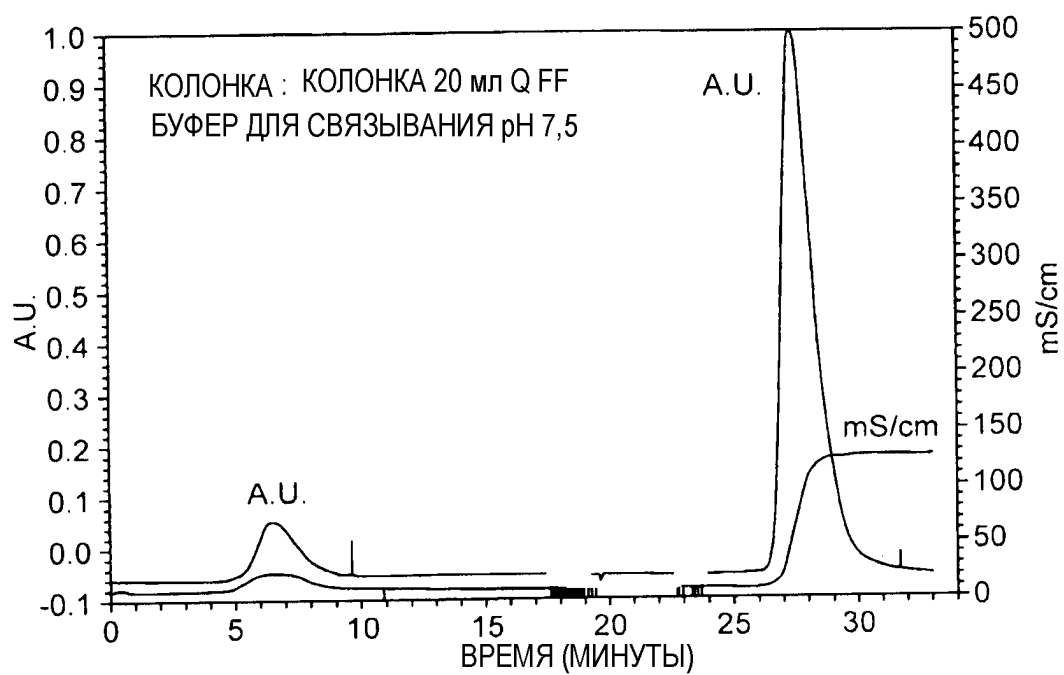
ФИГ.5



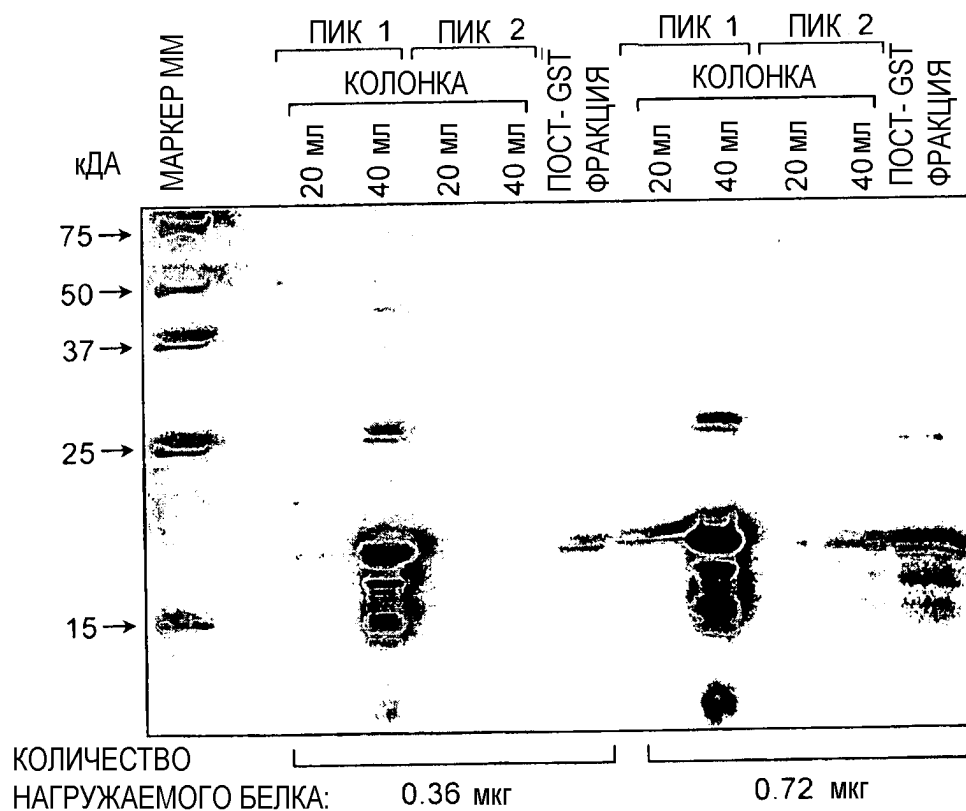
ФИГ.6



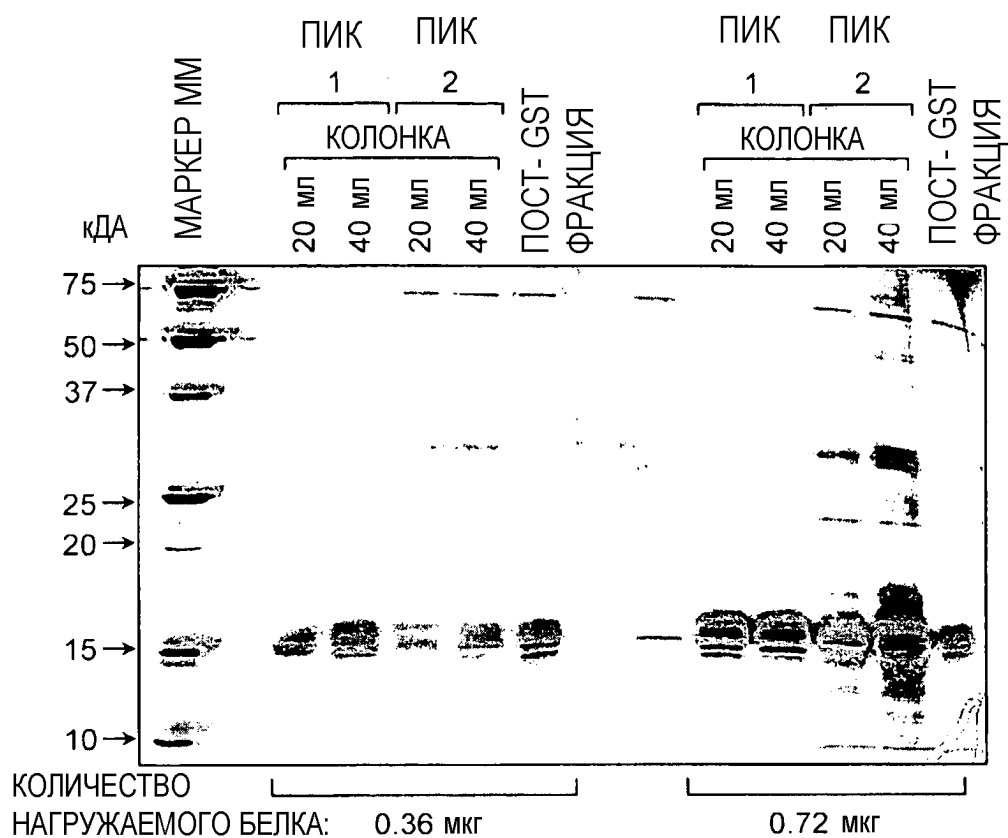
ФИГ.7



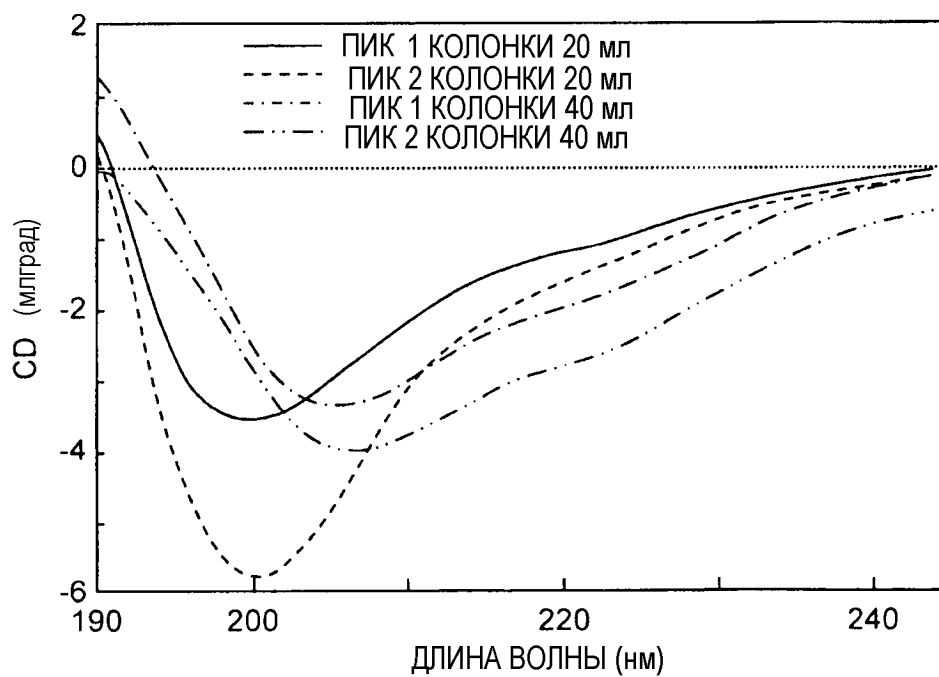
ФИГ.8



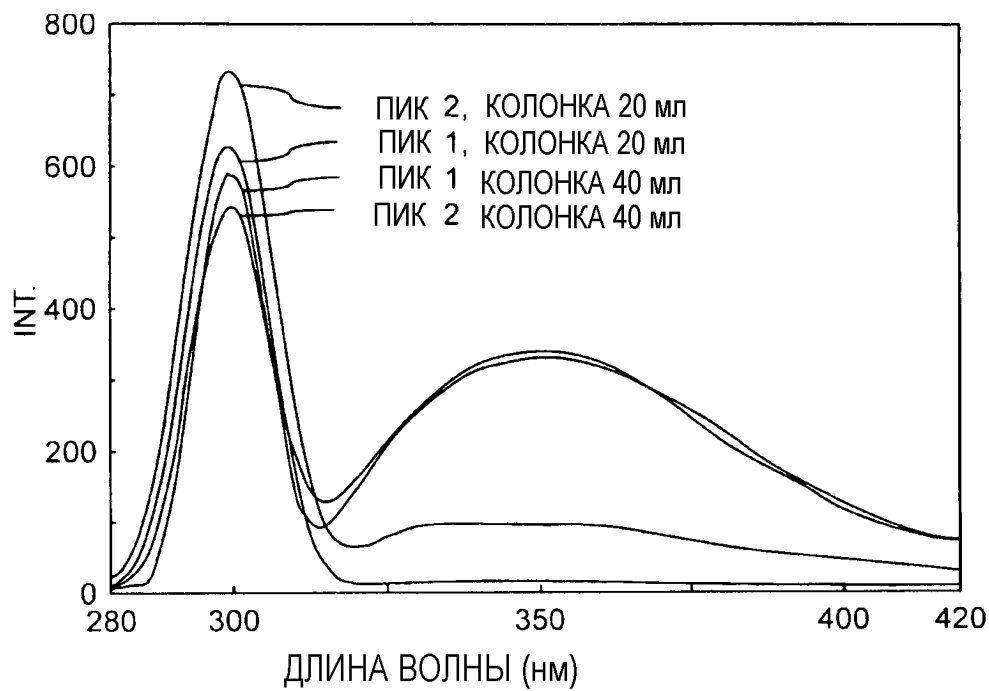
ФИГ.9



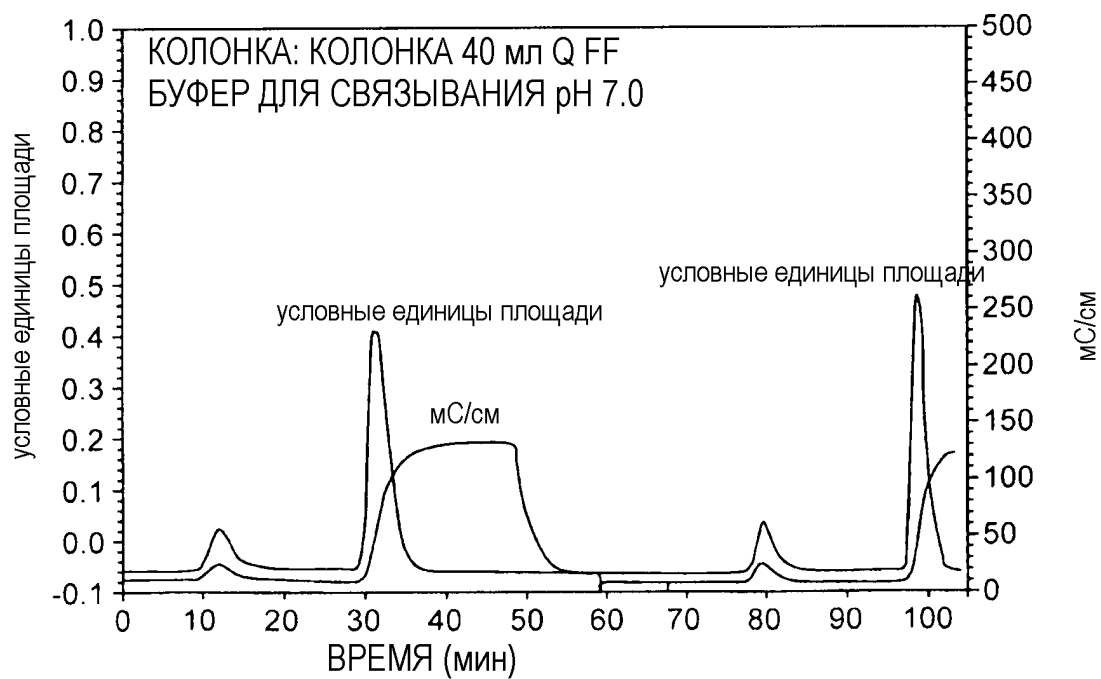
ФИГ.10



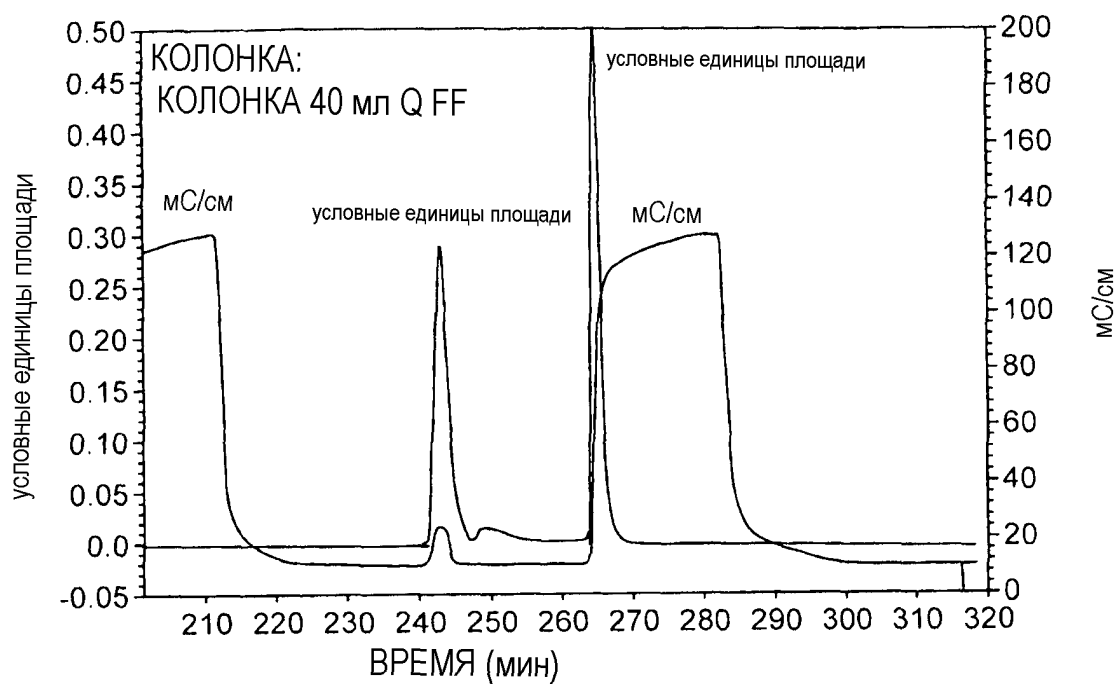
ФИГ.11



ФИГ.12



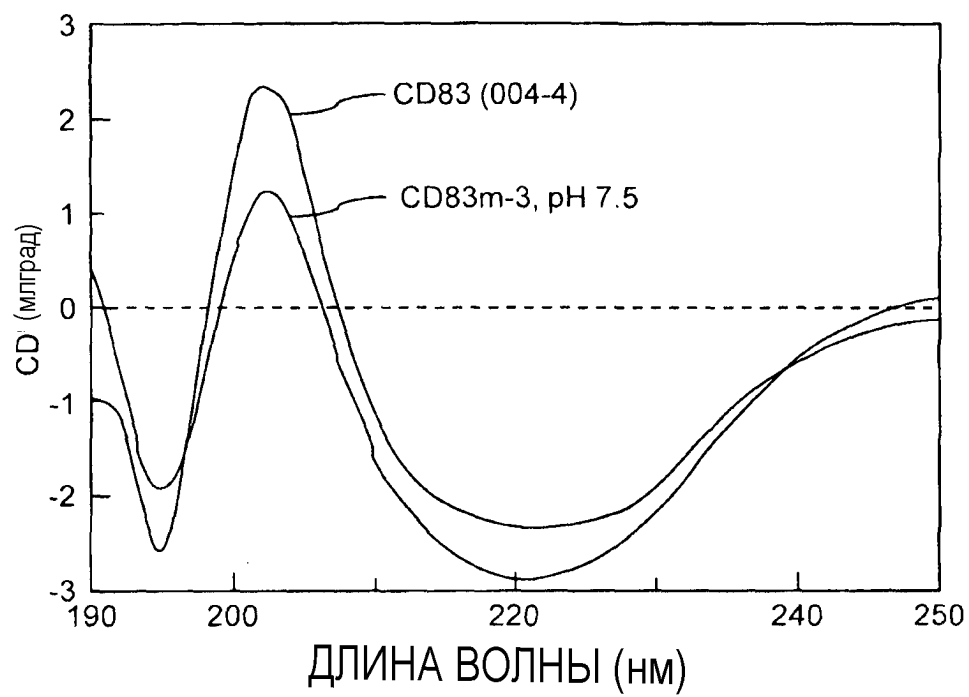
ФИГ.13



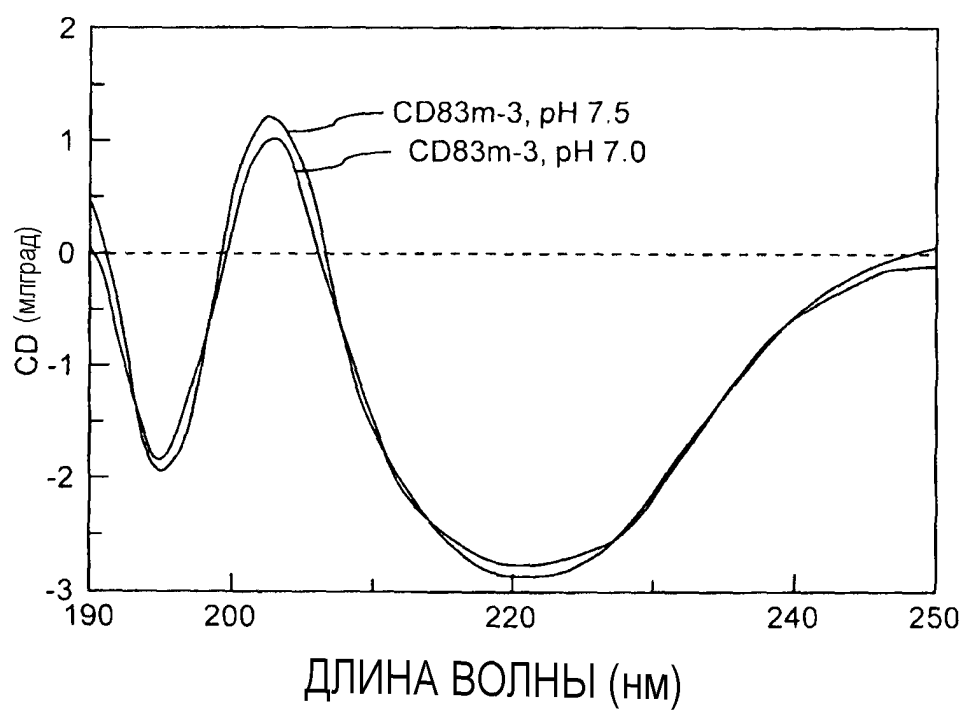
ФИГ.14



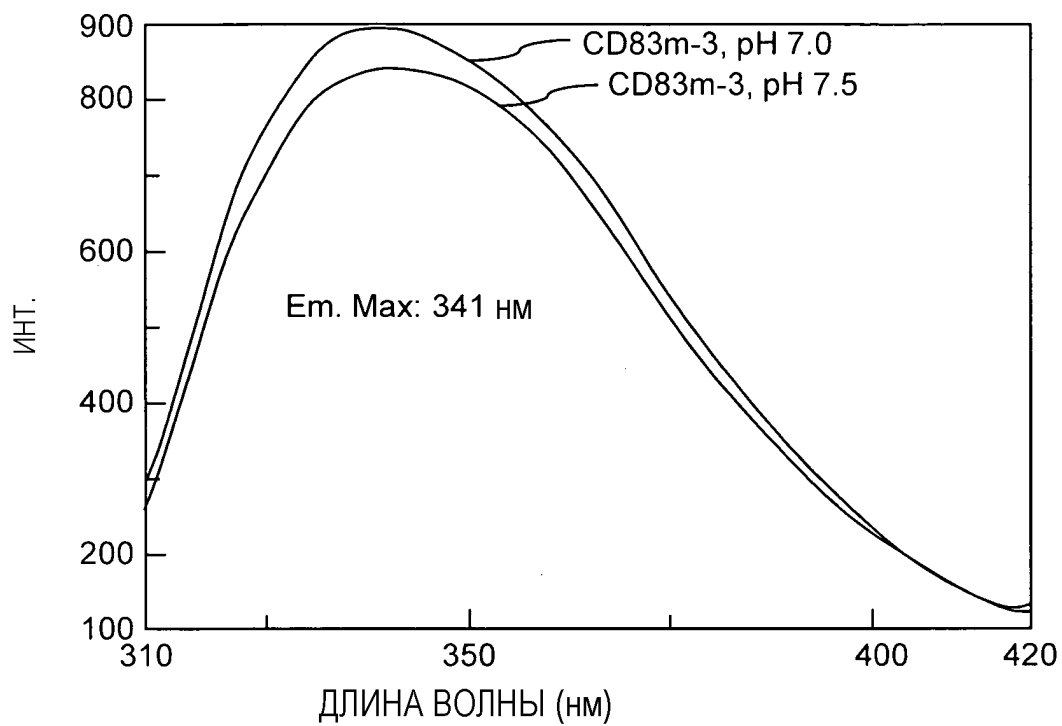
ФИГ.15



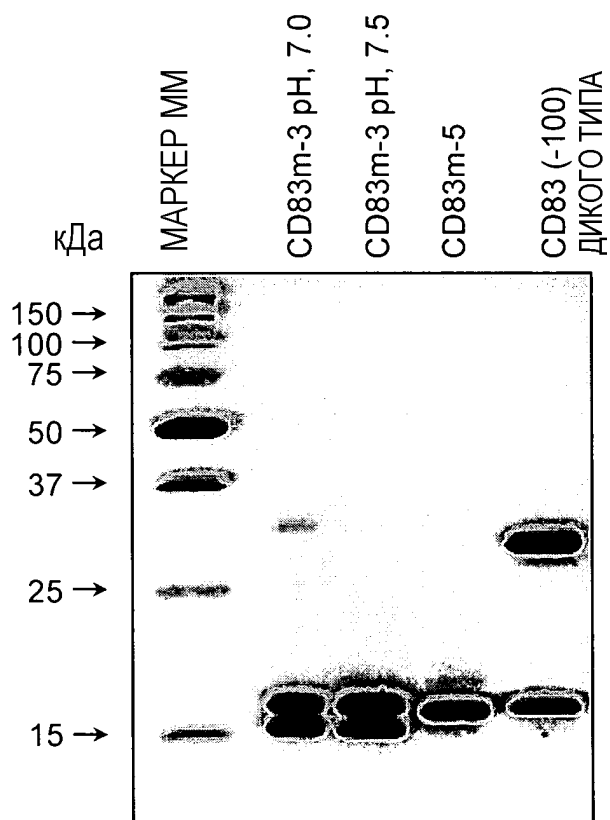
ФИГ.16



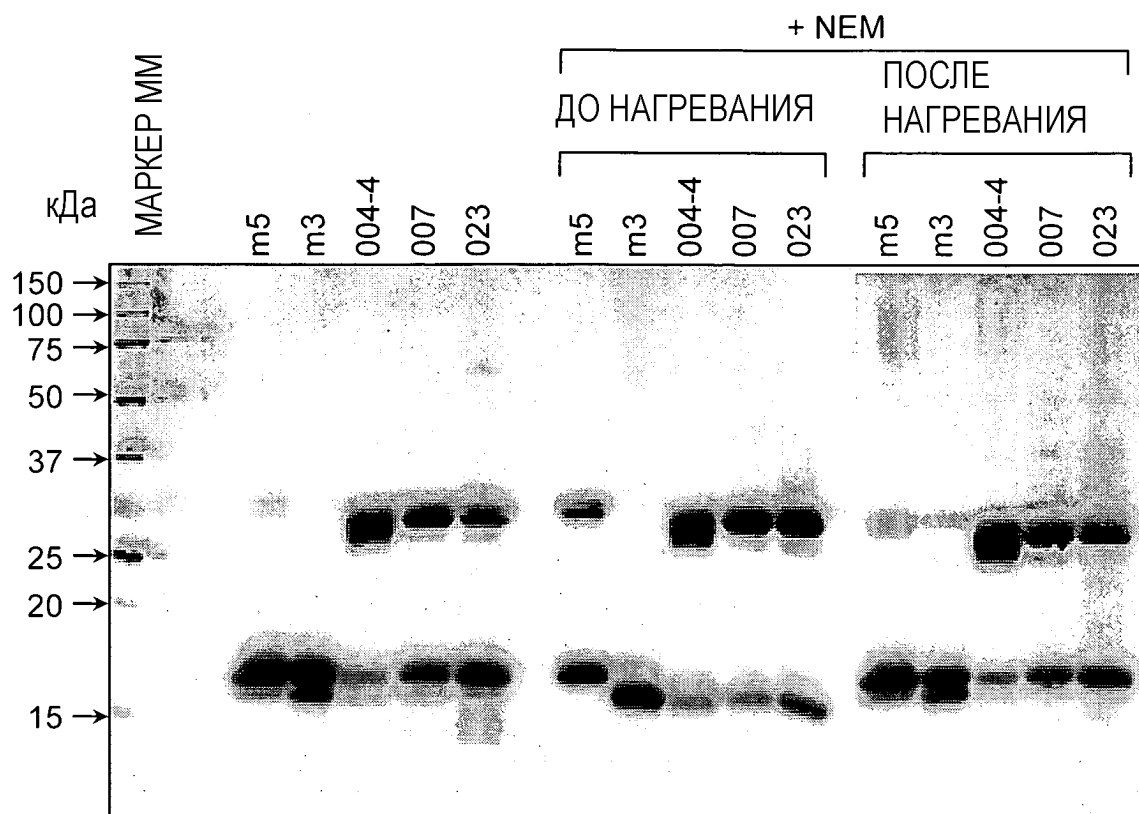
ФИГ.17



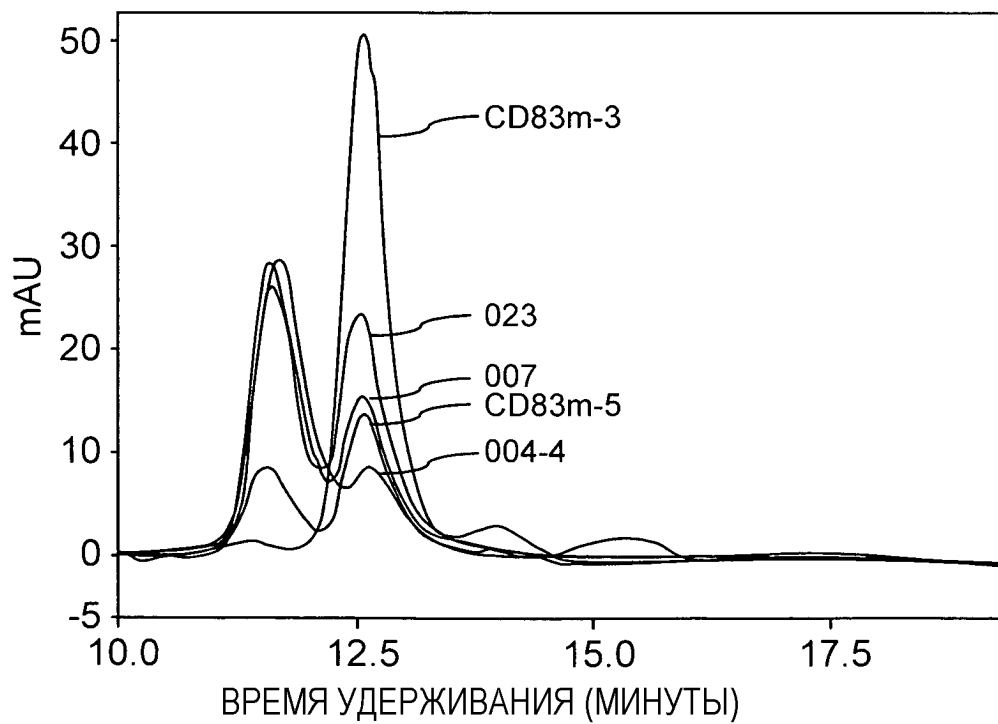
ФИГ.18



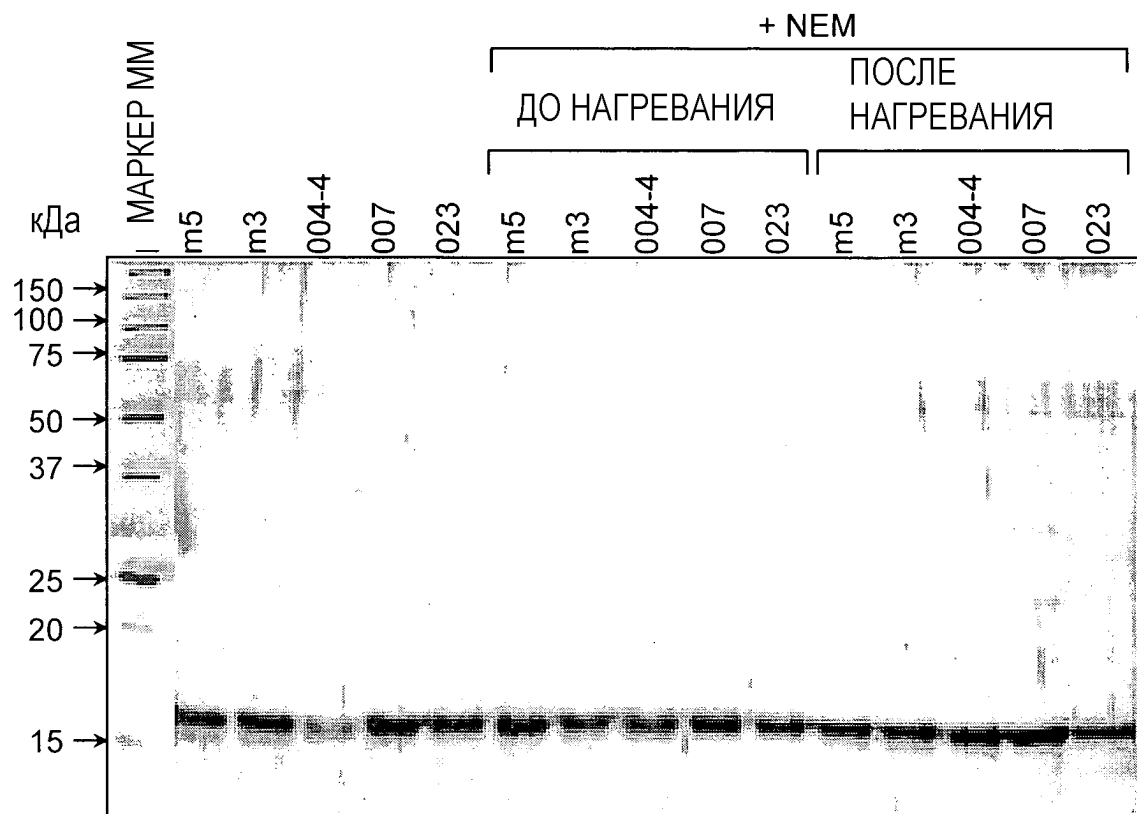
ФИГ.19



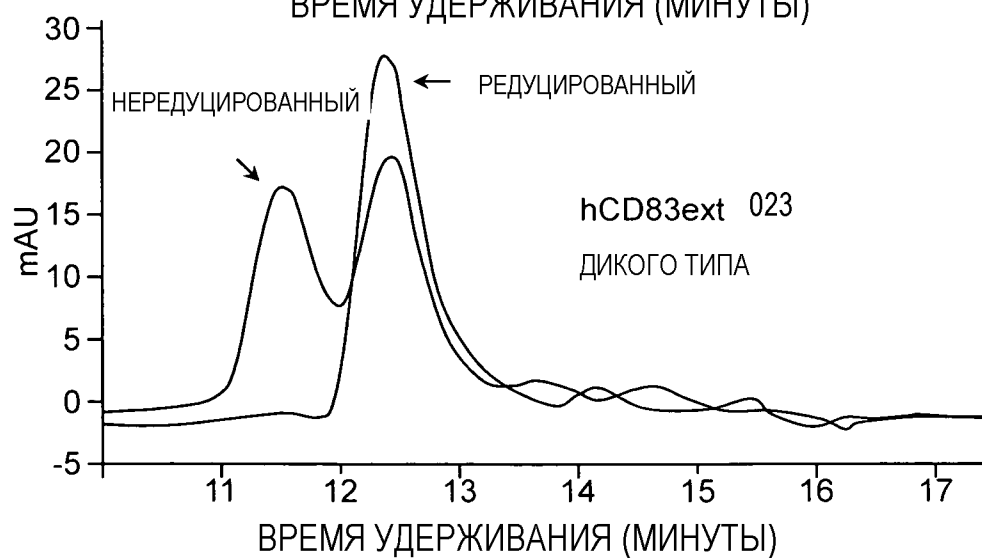
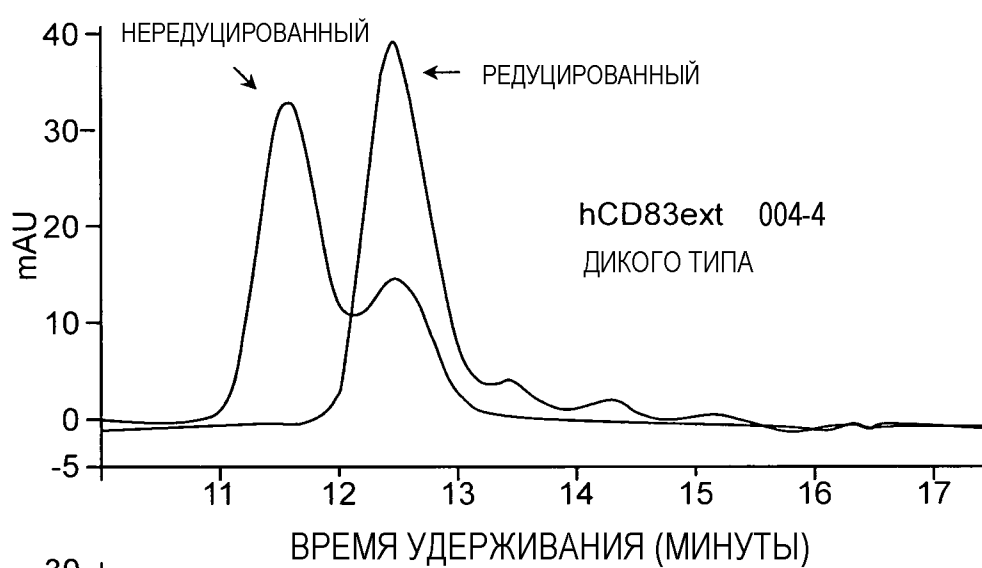
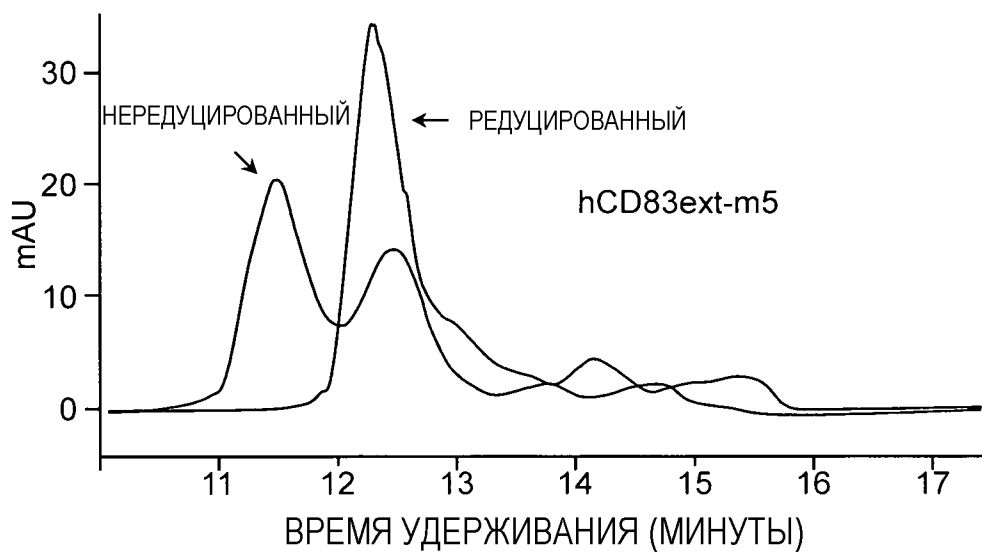
ФИГ.20



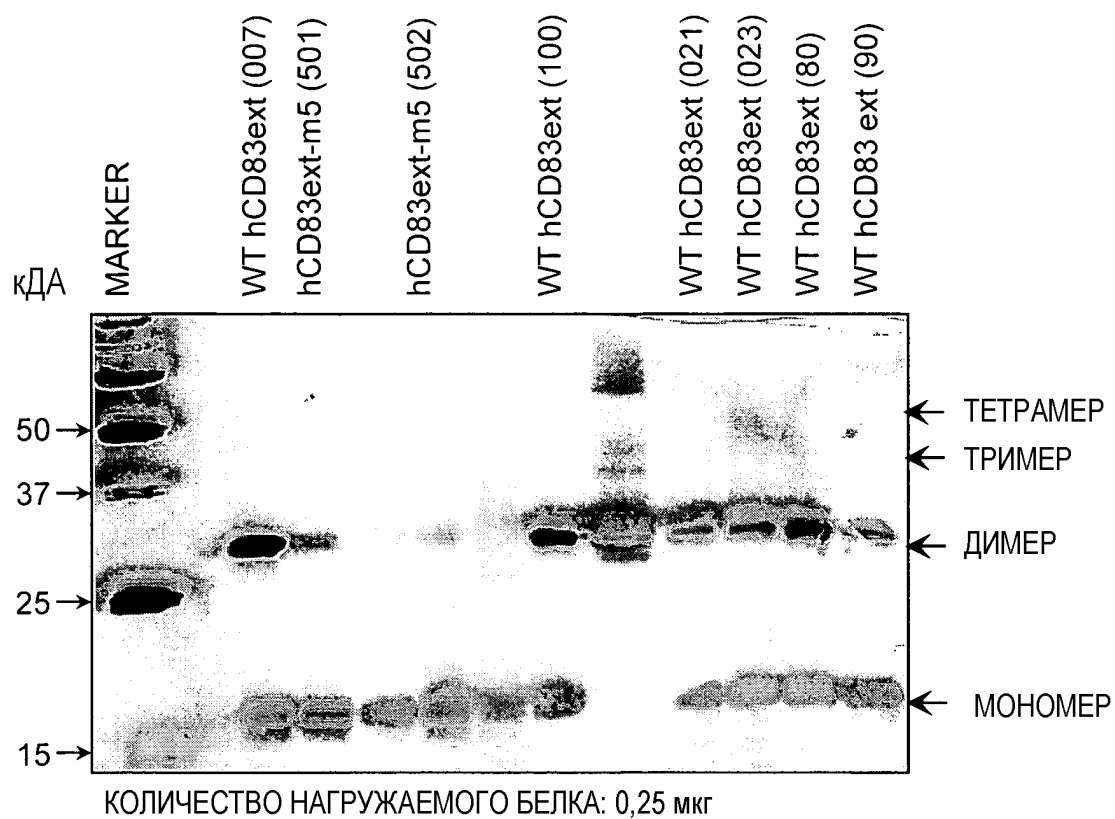
ФИГ.21



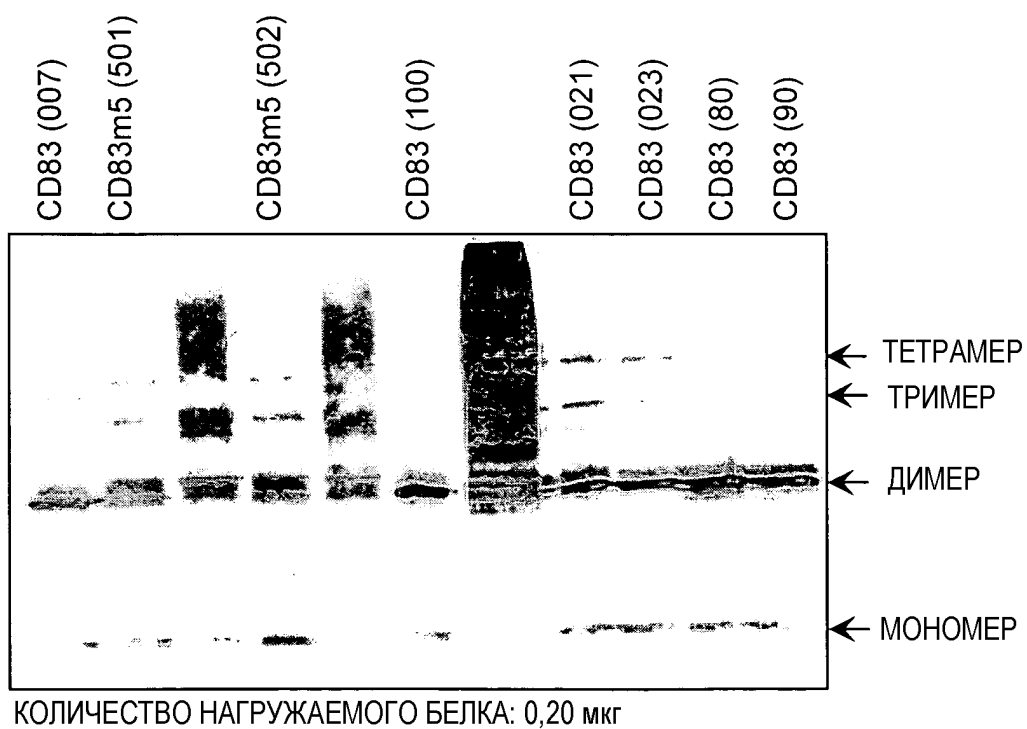
ФИГ.22



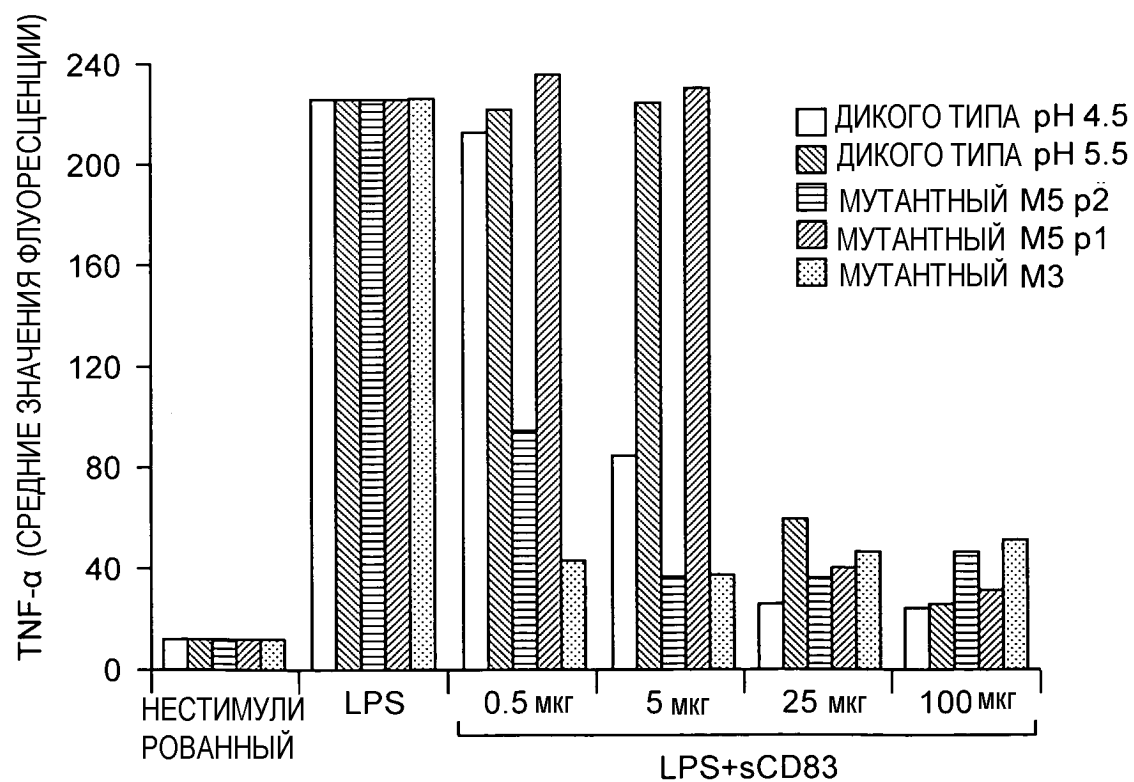
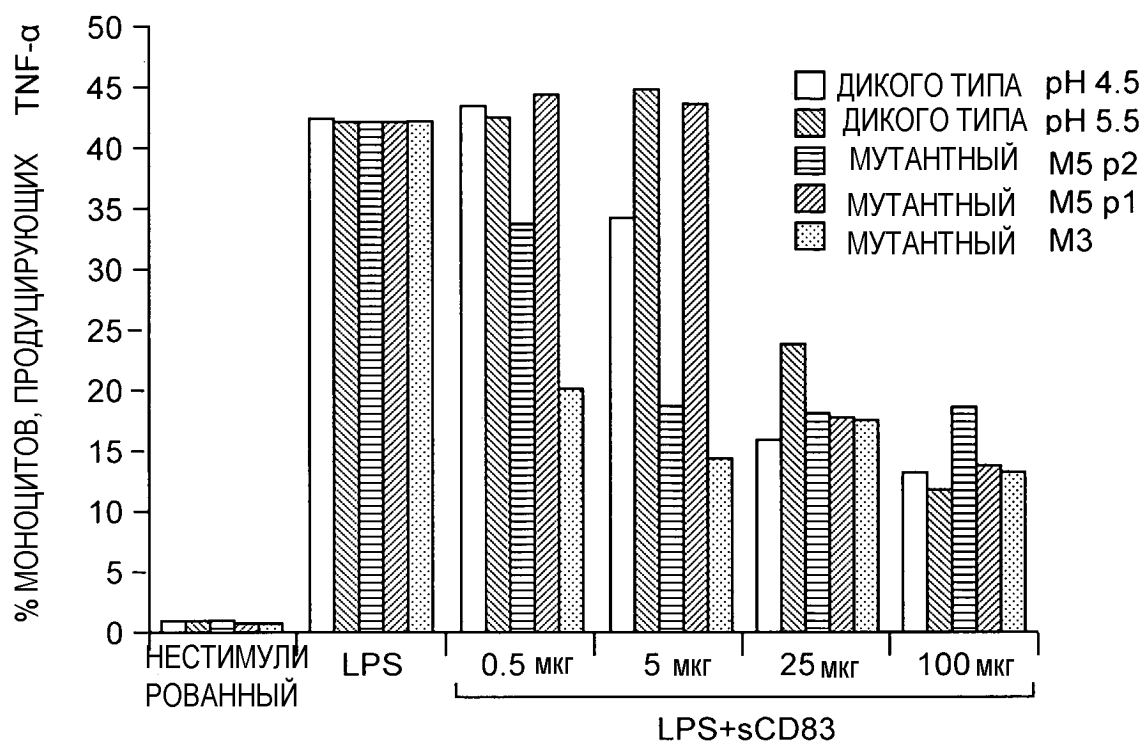
ФИГ.23



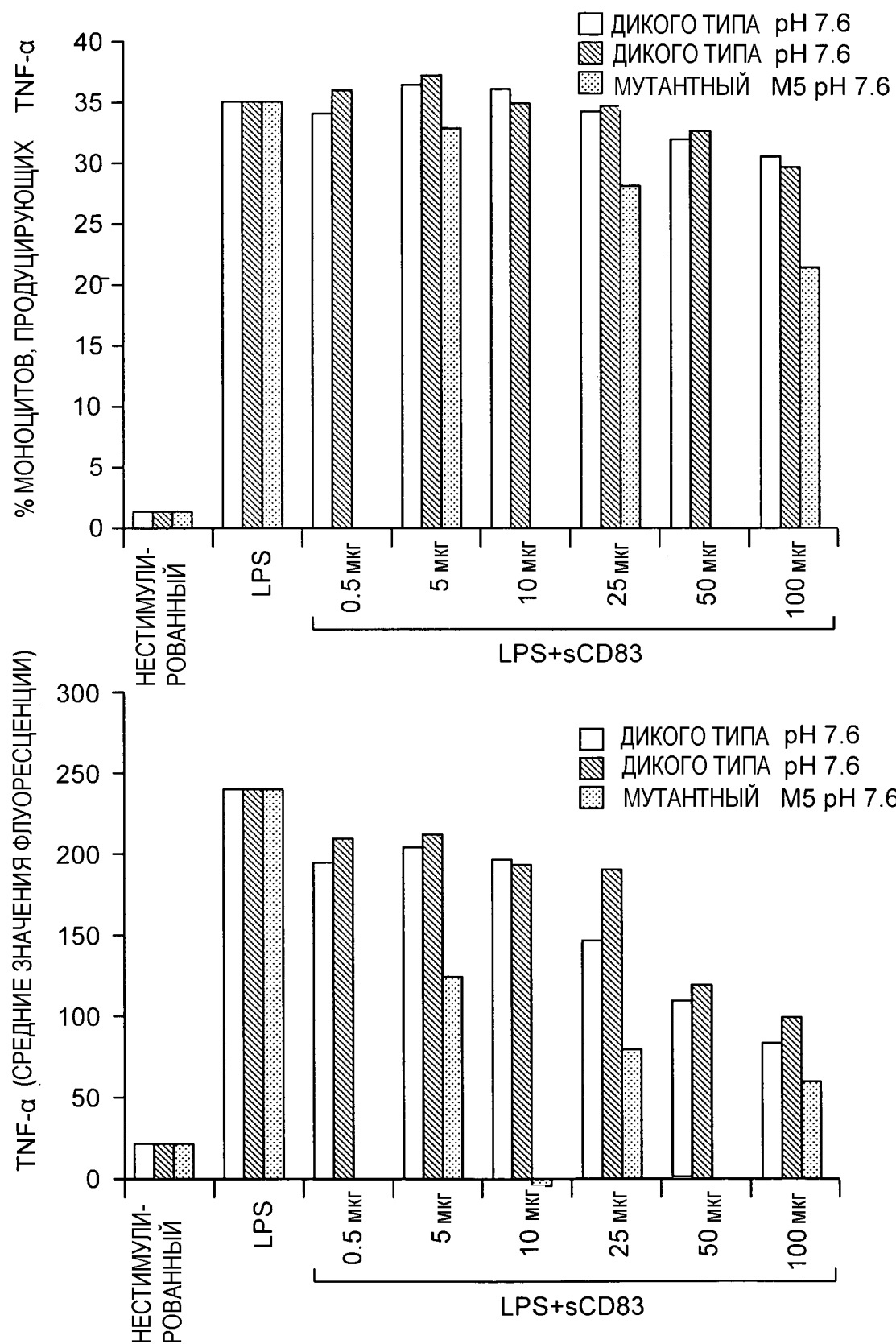
ФИГ.24



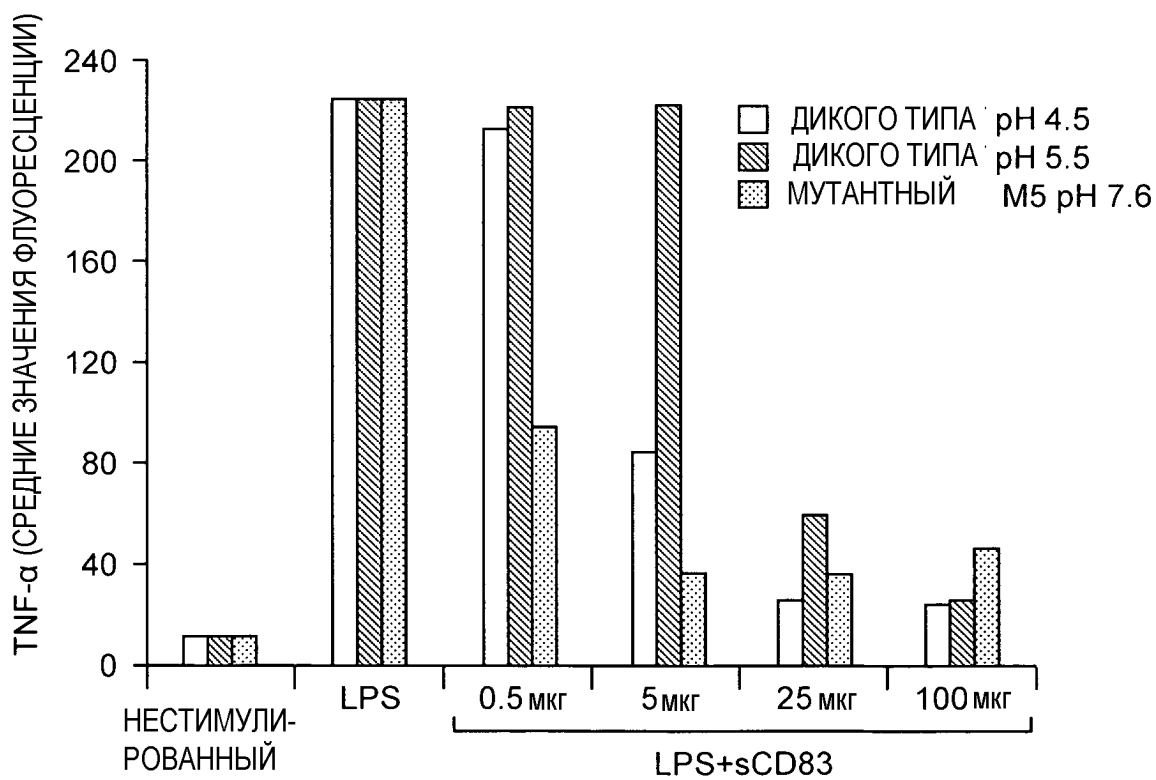
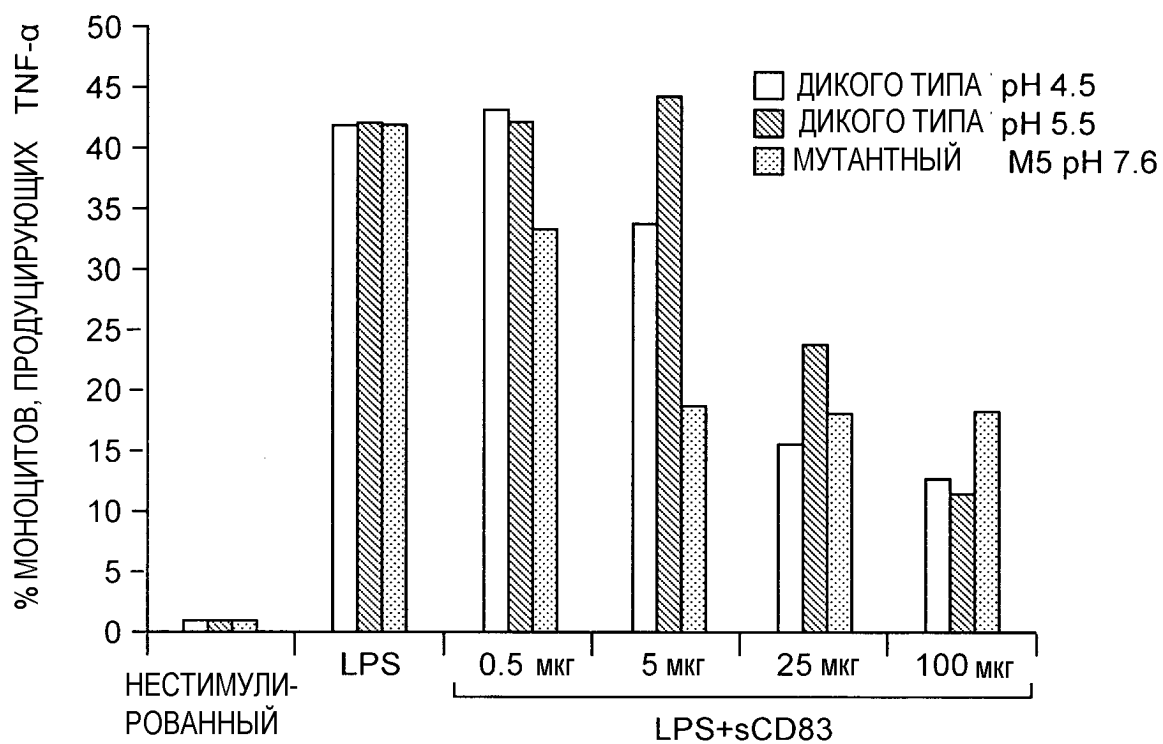
ФИГ.25



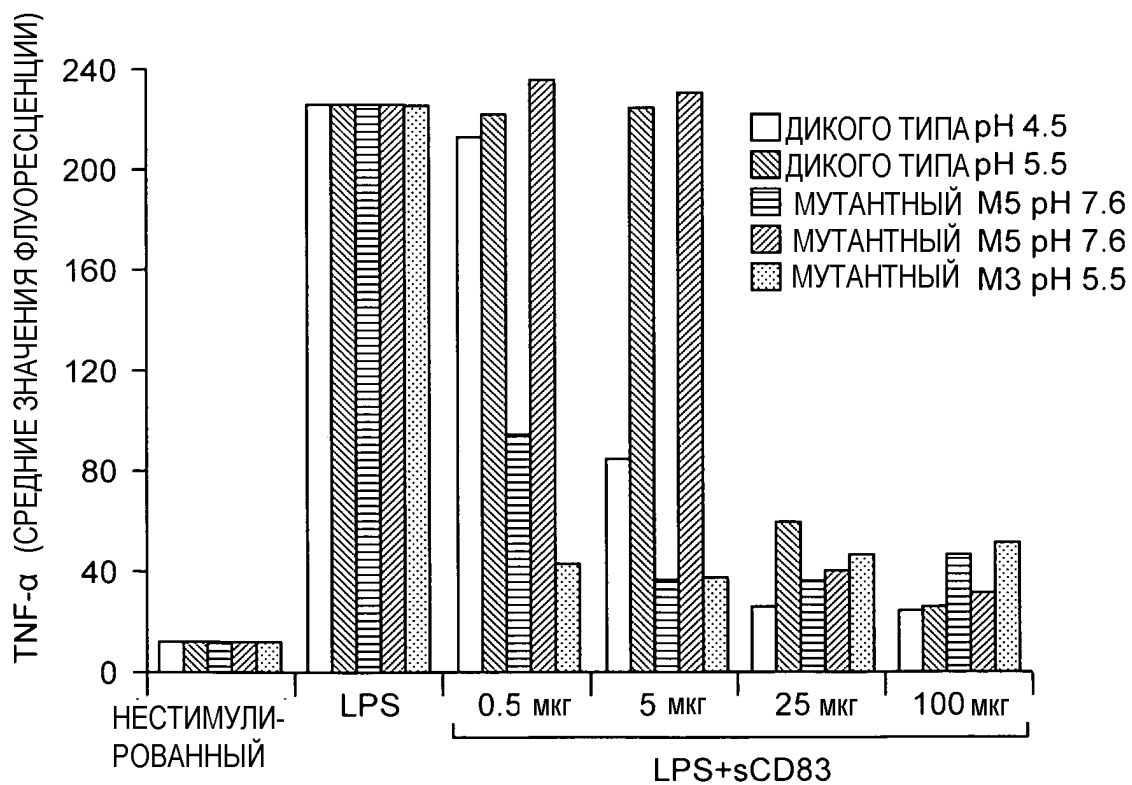
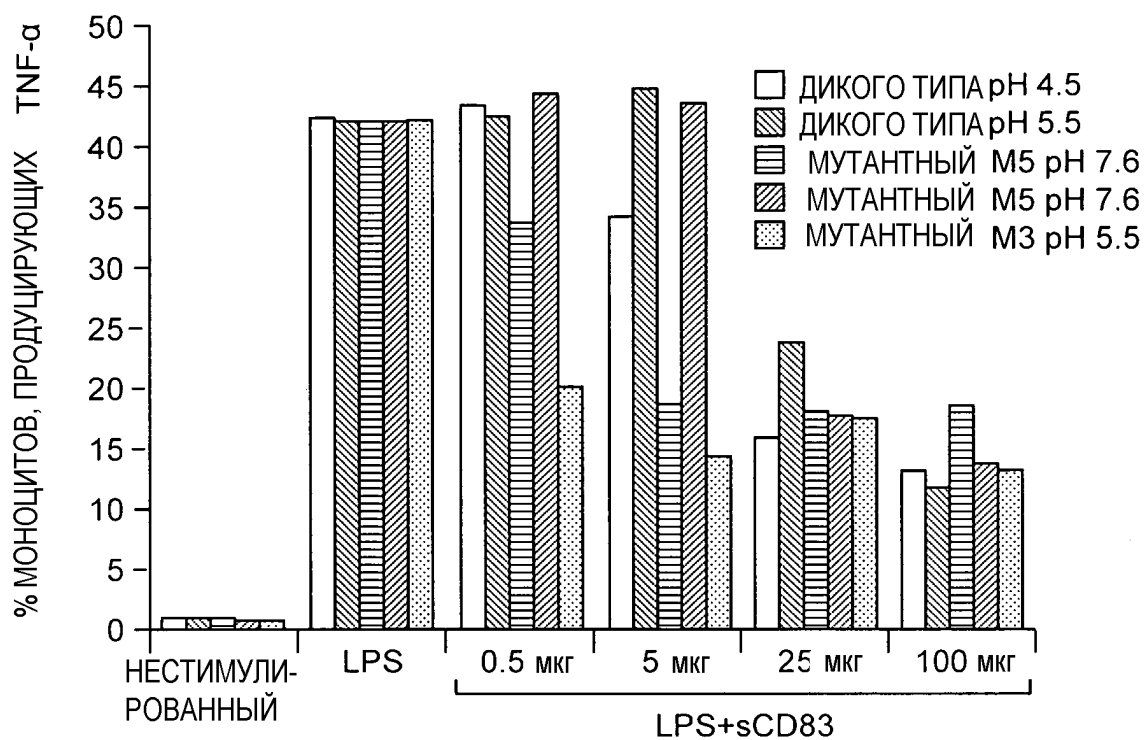
ФИГ.26



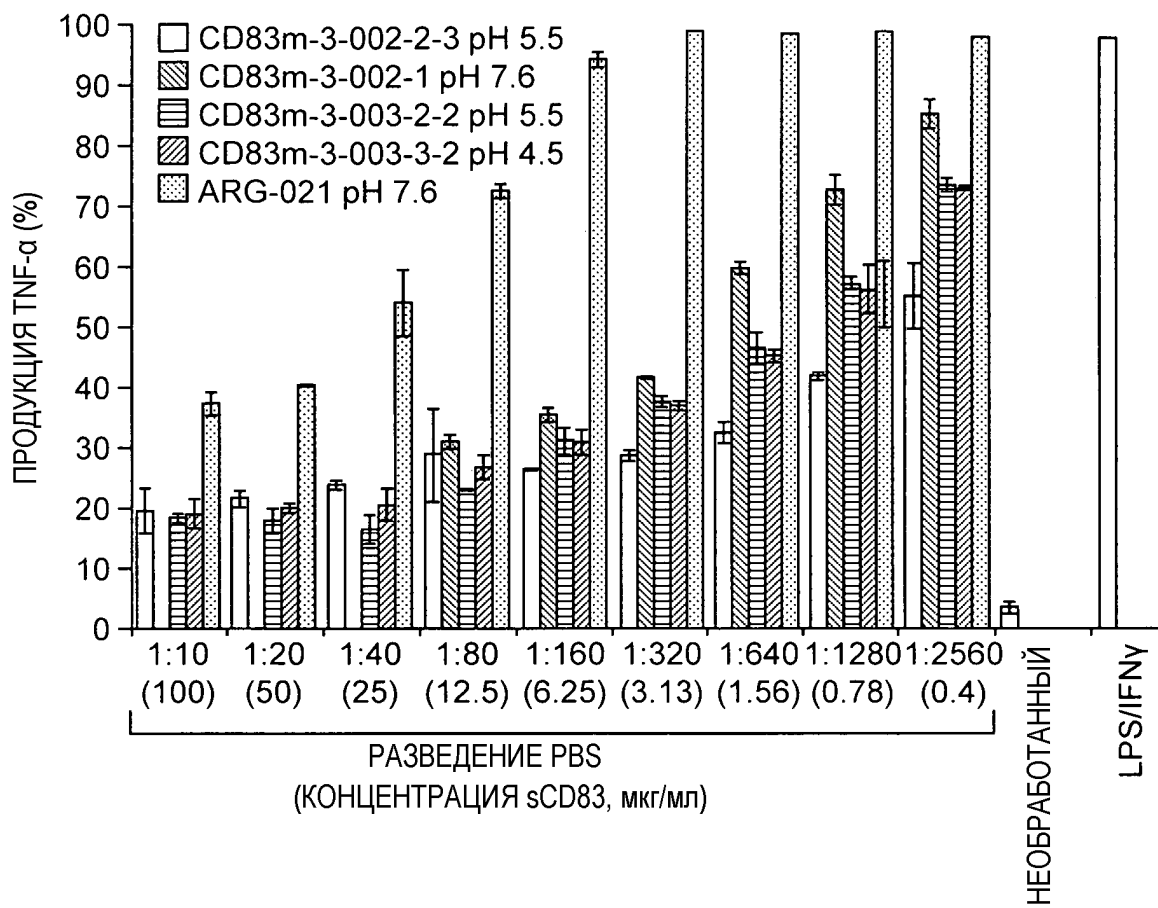
ФИГ.27



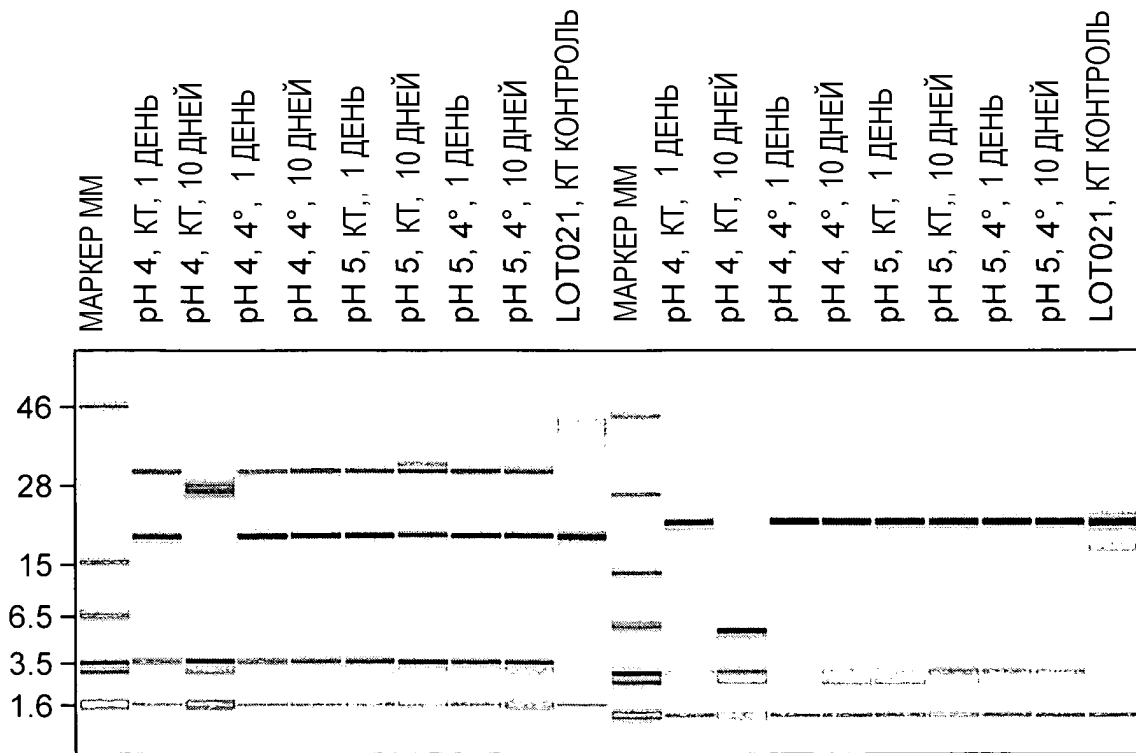
ФИГ.28



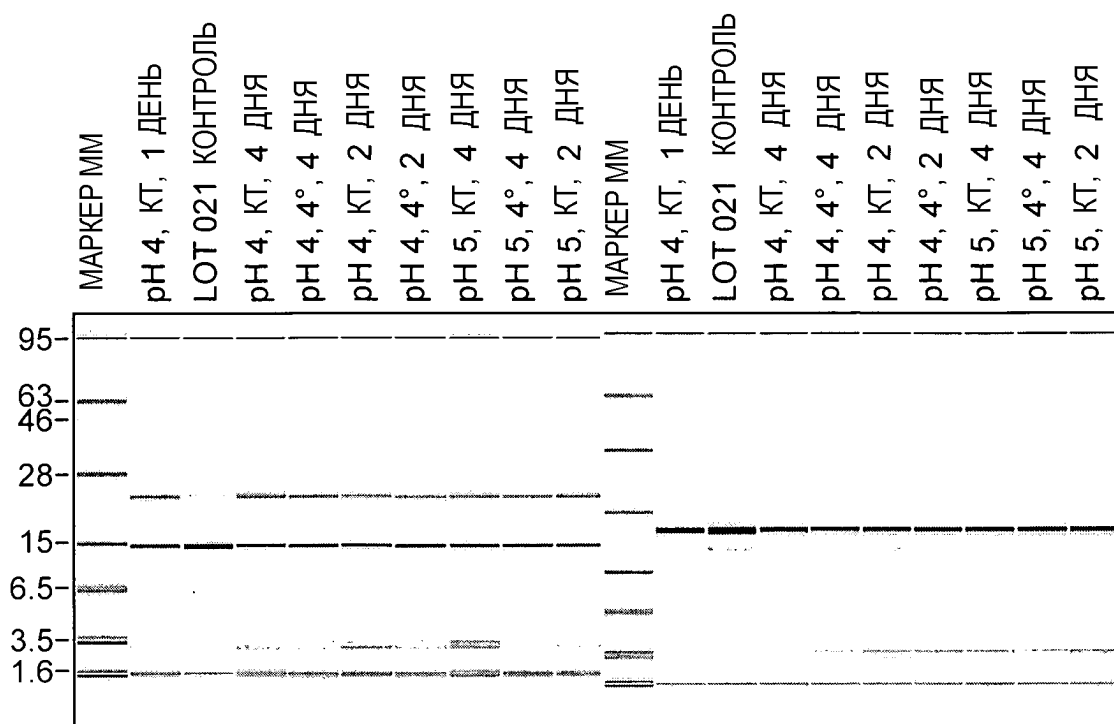
ФИГ.29



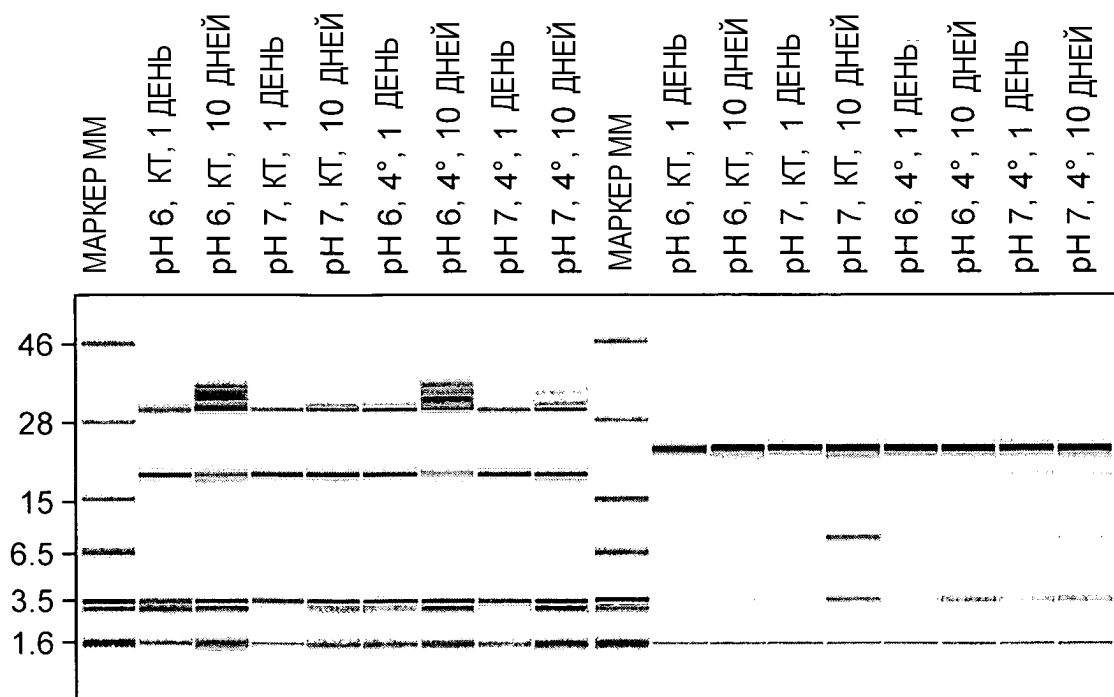
ФИГ.30



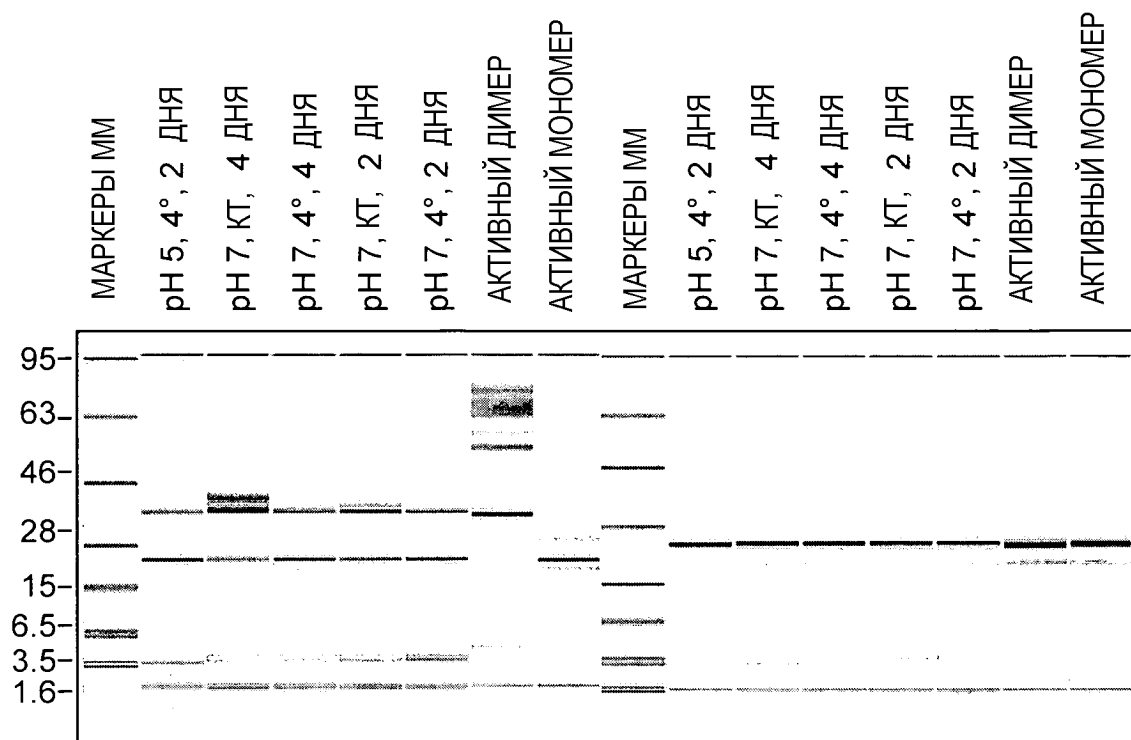
ФИГ.31



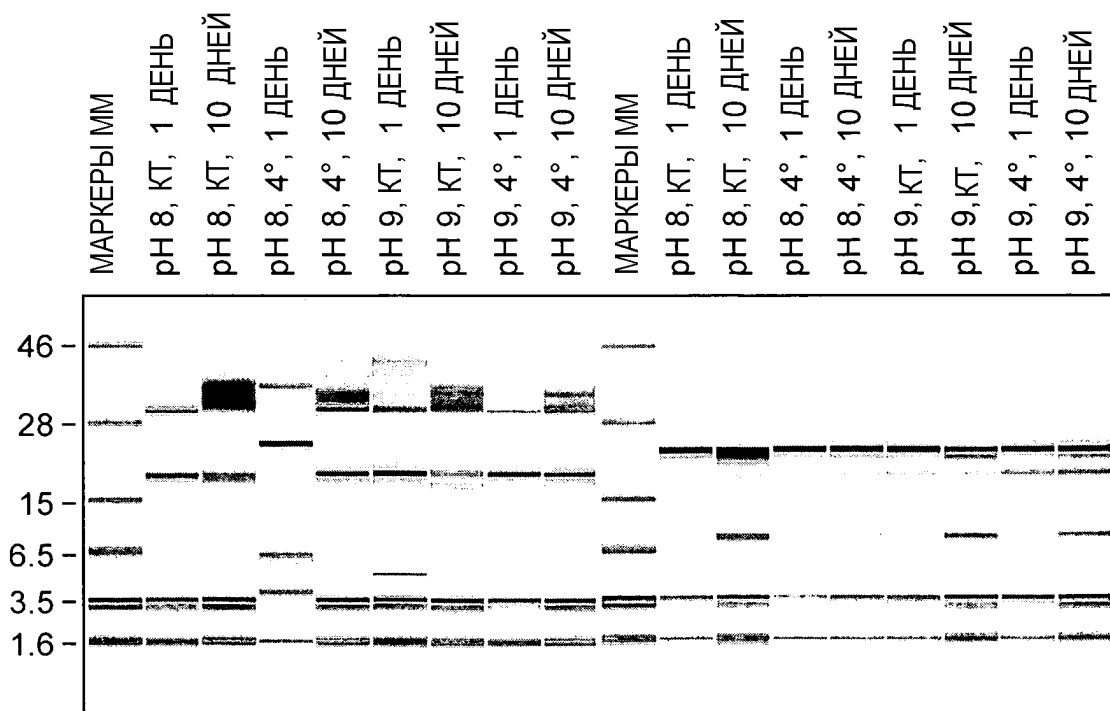
ФИГ.32



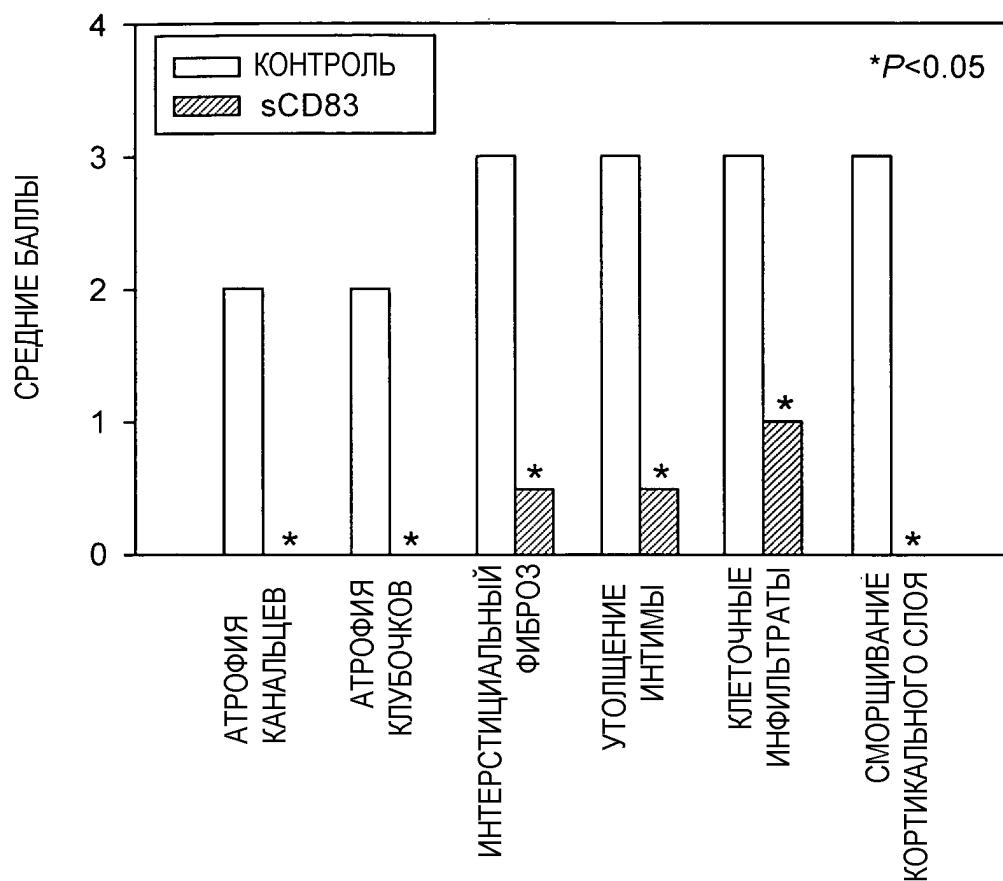
ФИГ.33



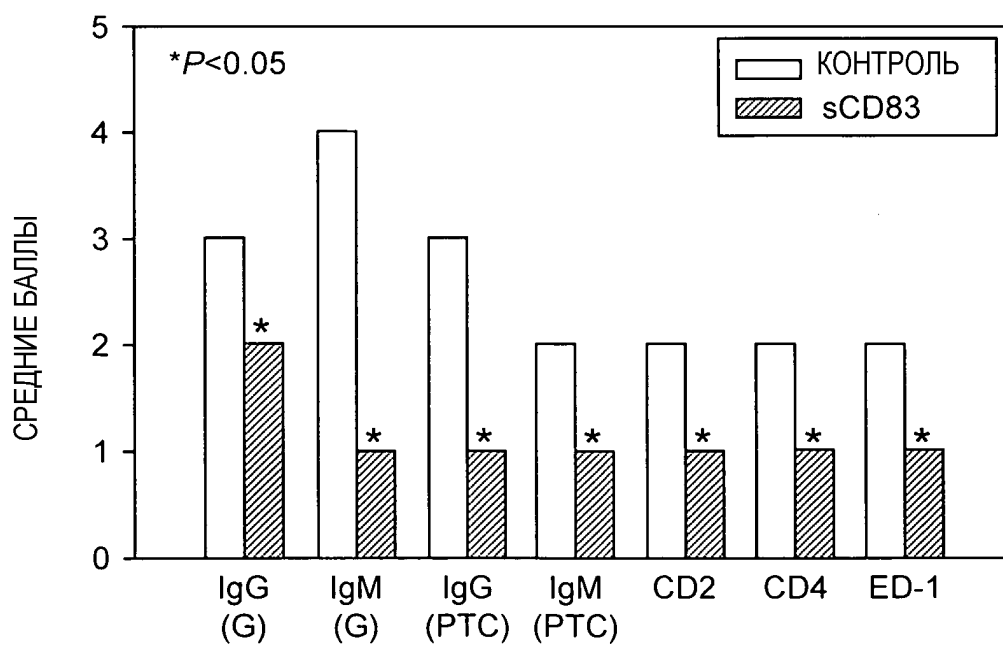
ФИГ.34



ФИГ.35



ФИГ.36



ФИГ.37