

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 308**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2003 E 03767573 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1562985**

54 Título: **Uso de formas solubles de CD83 y ácidos nucleicos que las codifican para el tratamiento o prevención de enfermedades**

30 Prioridad:

19.11.2002 EP 02025851

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.04.2015

73 Titular/es:

**ARGOS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4233 TECHNOLOGY DRIVE
DURHAM, NC 27704, US**

72 Inventor/es:

**STEINKASSERER, ALEXANDER;
LECHMANN, MATTHIAS y
ZINSER, ELISABETH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 308 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de formas solubles de CD83 y ácidos nucleicos que las codifican para el tratamiento o prevención de enfermedades

5 La presente invención da a conocer el uso de formas solubles de CD83 y ácidos nucleicos que las codifican para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por la disfunción o la función indeseada de una respuesta inmunitaria celular en la que intervienen las células dendríticas, los linfocitos T y/o los linfocitos B. Además la invención da a conocer moléculas CD83 solubles específicamente adecuadas para dicho propósito.

Antecedentes de la invención

10 El sistema inmunitario de los mamíferos debe poseer la capacidad de reaccionar con un gran número de antígenos foráneos. Los linfocitos constituyen un elemento central del sistema inmunitario porque pueden reconocer los antígenos y pueden llevar a cabo una respuesta inmunitaria adaptativa y específica. Los linfocitos pueden dividirse en dos clases generales de células, los linfocitos B, que son capaces de expresar los anticuerpos, y los linfocitos T, que pueden subdividirse en los linfocitos T cooperadores CD4+ y los linfocitos T citotóxicos CD8+. Ambos subgrupos de linfocitos T son capaces de reconocer los antígenos cuando están asociados a proteínas de la superficie conocidas como el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). El reconocimiento del CMH se produce a través del receptor de linfocitos T (TCR, por su nombre en inglés), un complejo proteico que está anclado a la membrana citoplasmática de los linfocitos T. El receptor de linfocitos T CD8+ interviene exclusivamente en las interacciones entre los antígenos del CMH de clase I y los linfocitos T citotóxicos; el receptor de linfocitos T CD4+ interviene exclusivamente en las interacciones entre los antígenos del CMH de clase II y los linfocitos T cooperadores.

20 El desencadenamiento de una respuesta inmunitaria no progresa exclusivamente a partir de tan solo los linfocitos T, sino más bien a través de la interacción de los linfocitos T con las llamadas células presentadoras de antígeno (CPA, también conocidas como células accesorias) y sus marcadores de superficie (por ejemplo, CMH II).

25 Estas células accesorias pueden subdividirse en CPA «simples», cuya función es presentar antígenos, y CPA «profesionales» que, además de presentar antígenos, también tienen una función accesorial a la hora de estimular los linfocitos. Las CPA por sí mismas no tienen especificidad de antígeno, pero sirven como «adyuvante natural» al presentar los antígenos a los linfocitos T. Además de los fagocitos mononucleados, las células dendríticas son miembros del tipo CPA. De hecho, las células dendríticas son las CPA más potentes conocidas hoy en día y son la única CPA que también es capaz de estimular linfocitos T indiferenciados y, por lo tanto, se denominan «adyuvantes naturales». Como resultado de sus características y funcionamiento diferentes, hasta la fecha se han clasificado dos tipos de células dendríticas:

30 células dendríticas foliculares (también conocidas como células dendríticas relacionadas con el tejido linfático) que están presentes en los ganglios linfáticos, tejidos linfáticos asociados a las mucosas y al bazo, y células dendríticas interdigitantes (también conocidas como células dendríticas derivadas de mieloides) que se encuentran en el espacio intersticial de la mayoría de órganos, en las zonas ricas en linfocitos T de los ganglios linfáticos y el bazo, y se distribuyen por toda la piel, donde se denominan células de Langerhans.

35 Las células dendríticas inmaduras, a saber, células dendríticas que no son completamente capaces de estimular los linfocitos T, se encargan de captar los antígenos y procesarlos en complejos CMH-péptido. Los estímulos como el TNF- α (factor de necrosis tumoral) y el CD40L inducen la maduración de las células dendríticas y conducen a una síntesis masiva *de novo* de moléculas del CMH de clase I y del CMH de clase II, y a la migración de las células dendríticas, por ejemplo, desde el espacio intersticial de los órganos internos a través de la sangre hacia los ganglios linfáticos del bazo y del hígado. Además, el aumento de expresión de las moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD80, CD86) y las moléculas de adhesión (por ejemplo, LFA3) se produce durante la fase de migración en los tejidos linfáticos secundarios. Las células dendríticas maduras estimulan los linfocitos T tras llegar a las regiones ricas en linfocitos T del tejido linfático secundario mediante la presentación de antígenos peptídicos dentro del contexto del CMH de clase I o del CMH de clase II a estos linfocitos T. Según las condiciones, las células dendríticas pueden estimular la activación de una serie de linfocitos T que, a su vez, pueden causar una respuesta diferencial del sistema inmunitario. Por ejemplo, tal y como se menciona más arriba, las células dendríticas que expresan el CMH de clase I pueden ocasionar la proliferación de los linfocitos T citotóxicos y las células dendríticas que expresan el CMH de clase II pueden interaccionar con los linfocitos T cooperadores. En presencia de las células dendríticas maduras y la IL-12 que producen, estos linfocitos T se diferencian en células Th1 que producen el interferón γ .

40 Juntos, el interferón γ y la IL-12 sirven para fomentar los linfocitos T citolíticos. En presencia de la IL-4, las células dendríticas inducen la diferenciación de los linfocitos T en células Th2 que secretan IL-5 e IL-4, que a su vez activan los eosinófilos y ayudan a que los linfocitos B produzcan anticuerpos (Banchereau, J. y Steinman, R. M. (1998) *Nature* 392: 245-252).

55 Las células dendríticas también pueden inducir lo que se denomina reacción leucocitaria mixta (MLR, por su nombre en inglés) *in vitro*, un modelo para la activación de los linfocitos T alogénicos y para el rechazo del injerto.

Una característica típica de estos ensayos por MLR es la formación de grandes agrupamientos de linfocitos T y células dendríticas. La adición de hCD83ext el día 1 inhibía fuertemente la típica formación de agrupamientos de células de células dendríticas y de linfocitos T en proliferación (Lechmann, M. et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194: 1813-1821).

- 5 Las células dendríticas maduras expresan característicamente, entre otras (por ejemplo, CMH I y II, CD80/86, CD40), la molécula marcadora CD83 en su superficie celular (Zhou, L.-J. y Tedder, T. F. (1995) *J. Immunology*, vol. 154: 3821-3835). Se trata de uno de los mejores marcadores de las células dendríticas maduras que se conocen hoy en día.

10 El CD83, una molécula de la superfamilia de proteínas de Ig, es una glucoproteína monocatenaria de 43 kDa que consiste en 205 aminoácidos (SEQ ID n.º 2) en su forma inmadura. Los primeros 19 aminoácidos representan el péptido señal de CD83 y se pierden tras la inserción de la proteína en la membrana, lo que deja una proteína transmembranaria de 186 aminoácidos. La CD83 madura tiene un dominio extracelular formado por los aminoácidos 20 a 144 (SEQ ID n.º 2), un dominio transmembranario que comprende los aminoácidos 145 a 166 (SEQ ID n.º 2), y el dominio citoplasmático formado por los aminoácidos 167 a 205 (SEQ ID n.º 2). El dominio extracelular tiene como peculiaridad estructural un único dominio de tipo Ig (de tipo V) y se expresa muy fuertemente en la superficie celular de las células dendríticas maduras. El dominio extracelular de la proteína CD83 difiere del dominio de tipo Ig típico en el sentido de que está codificado por al menos dos exones: un exón sólo codifica una mitad del dominio de tipo Ig, mientras que el otro exón codifica el dominio transmembranario (véase Zhou, L.-J., Schwarting, R., Smith, H. M., y Tedder, T. F. (1999) *J. Immunology*, vol. 149: 735-742). El ADNc que codifica la CD83 humana contiene un marco abierto de lectura de 618 pb (SEQ ID n.º 1, véanse la ID Z11697 de Genbank y Zhou, L.-J. et al., *supra* (1995)).

15 Aunque la función exacta de CD83 todavía no se ha determinado, se ha demostrado que la inhibición de la expresión de CD83 que aparece en la superficie de las células dendríticas maduras mediante la interferencia con la exportación nuclear del ARNm de CD83 conduce a una reducción clara de la capacidad de estas células para estimular los linfocitos T (Kruse, M. et al., (2000) *J. Exp. Med.* 191: 1581-1589). Por consiguiente, la CD83 parece ser necesaria para el funcionamiento de las células dendríticas.

20 Además, se ha encontrado que cuando se administraba una forma soluble de CD83 a las células, se reduce la cantidad de CD83 expresada por las células (células dendríticas maduras) o las células no se ponen a sintetizar la CD83 (células dendríticas inmaduras). Ya que las células dendríticas inmaduras no tienen CD83 en/sobre la membrana, esta observación conduce a la conclusión de que la CD83 soluble tiene que interactuar con otra proteína celular (de la membrana) distinta a CD83, a saber, se sospecha que se produce una interacción heterófila entre la CD83 soluble y un ligando sin identificar (Lechmann, M. et al. (17 de diciembre de 2001) *J. Exp. Med.* 194: 1813-1821 y (junio de 2002) *Trends in Immunology*, vol. 23(6): 273-275). También existen pruebas de la aparición de CD83 soluble *in vivo*. La CD83 soluble se ha encontrado en los sueros humanos normales y parece que se libera desde las células dendríticas activadas y desde los linfocitos B (Hock et al. (2001) *Int. Immunol.* 13: 959-967).

30 La patente internacional WO 97/29781 se refiere a los métodos y composiciones (vacunas) que estimulan una respuesta inmunitaria humoral en la cual se emplea una forma soluble de CD83 como adyuvante además de un antígeno determinado. Las formas solubles comprenden la proteína de fusión de CD83 y una forma soluble que consiste en los aminoácidos 1 a 124, el dominio extracelular de CD83. Además del uso de CD83 como adyuvante para las preparaciones de vacunas, este documento explica el uso de antagonistas (anticuerpos) contra la CD83 para inhibir en los mamíferos las respuestas específicas indeseables contra un antígeno.

35 La patente internacional WO 93/21318 describe una proteína CD83 que se denomina aquí HB15, moléculas de HB15 quiméricas y fragmentos de HB15, entre ellos, un fragmento que consiste en el dominio extracelular (aminoácidos 1 a 125) de HB15. Además se mencionan los anticuerpos contra HB15. No obstante, no se ofrece ni un uso potencial ni una función de dichos anticuerpos. Debido al papel de HB15 como molécula accesoria para la activación de los linfocitos, se propone que la HB15 soluble y los fragmentos de HB15 resultarán útiles como agonistas para el aumento de la respuesta inmunitaria. De nuevo, no se da a conocer ninguna prueba experimental.

40 La patente de los EE.UU. US 5.710.262 y la correspondiente patente internacional WO 95/29236 revelan que la HB15 de humano y de ratón es un fármaco potencialmente útil para el tratamiento del sida (con respecto al ADN y a la secuencia de aminoácidos de HB15 de ratón, véanse las SEQ ID n.º 3 y 4). El dominio extracelular de HB15 que está descrito en la presente memoria comprende los primeros 19 aminoácidos del péptido señal y luego 106 aminoácidos del dominio extracelular.

45 Las patentes internacionales mencionadas más arriba WO 93/21318 y WO 95/29236 también hacen hincapié en que los anticuerpos monoclonales contra CD83 son idóneos para retirar la CD83 endógena o monitorizar la concentración de CD83 en el suero.

50 Sorprendentemente, se ha encontrado que el dominio extracelular de CD83 (de aquí en adelante también se denominará «hCD83ext») que comprende los aminoácidos 20 a 144 (SEQ ID n.º 2) puede embarcarse en interacciones heterófilas con ligandos de la superficie de las células dendríticas. Dado que la bibliografía actual sólo describe dominios extracelulares completos o dominios extracelulares que carecen de los aminoácidos del extremo

5 carboxilo del dominio extracelular (patente de los EE.UU. US 5.710.262, patentes internacionales WO 95/29236 y WO 97/29781), también resultó sorprendente que la hCD83ext adoptase la conformación correcta, lo que le permite interactuar con las células dendríticas. Fue incluso más sorprendente el efecto que la hCD83ext tuvo sobre las células dendríticas; impidió la maduración de las células dendríticas inmaduras y redujo la expresión de CD83 en las células dendríticas maduras. Como resultado, las células dendríticas pierden su capacidad para activar los linfocitos T. Así pues, la hCD83ext soluble por sí misma resultó ser idónea para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones médicas ocasionadas por respuestas inmunitarias indeseables, en particular al impedir la activación de los linfocitos T. La hCD83ext también se encontró que era idónea para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones médicas ocasionadas por respuestas inmunitarias indeseables en las que intervienen las células dendríticas, los linfocitos T y/o los linfocitos B.

10 Recientemente se ha encontrado que, debido al hecho de que la hCD83ext posee la conformación correcta de la CD83 natural, también es idónea para preparar anticuerpos contra la CD83 (véase Lechmann et al., *Protein Expression and Purification* 24, 445-452 (5 de marzo de 2002)). Dicho artículo también describe la clonación del dominio extracelular de CD83 y el aislamiento de un fragmento de CD83 que comprende los aminoácidos 23 a 128.

15 Además, se encontró que varía la cantidad de proteína CD83 soluble en el suero humano y que es significativamente más alta en el caso de tumores y leucemia de linfocitos B. Así pues, los anticuerpos contra la proteína CD83 soluble son herramientas poderosas para determinar ciertas enfermedades (tales como tumor, enfermedades autoinmunitarias, infección vírica, etc.) en un paciente.

20 Finalmente, se encontró que la hCD83ext existe en forma monomérica y en forma de homodímero (ambas presentan una actividad similar) y que el reemplazo de uno o varios de los restos de cisteína, en particular de la quinta cisteína, por un resto de aminoácido diferente (por ejemplo, por un resto de serina) en el dominio extracelular de hCD83ext conduce a una molécula de CD83 extracelular monomérica que no tiende a dimerizar espontáneamente.

Compendio de la invención

25 Extraordinariamente, la hCD83ext soluble se puede acoplar a las células dendríticas maduras e inmaduras, e impedir la maduración de las células dendríticas inmaduras. Además, las células dendríticas maduras tratadas con la hCD83ext soluble tienen completamente inhibida su actividad estimuladora de linfocitos T. Así pues, los linfocitos T ya no son capaces de proliferar. La CD83 ha sido reconocida como un marcador para las células dendríticas maduras capaces de interactuar con los linfocitos T (y también con los linfocitos B). Cuando las células dendríticas que al principio estaban activas y maduras se tratan con la hCD83ext, no consiguen formar agrupamientos con los linfocitos T (y los linfocitos B) *in vitro*. Por lo tanto, las células dendríticas ya no son capaces de inducir la división/estimulación de los linfocitos T.

30 Como resultado, la invención da a conocer el uso de proteínas CD83 solubles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección médica ocasionada por la disfunción o el funcionamiento indeseado de una respuesta inmunitaria celular en la que intervienen las células dendríticas, los linfocitos T y/o los linfocitos B. En particular, las proteínas CD83 solubles inhiben la interacción entre las células dendríticas y los linfocitos T, y entre las células dendríticas y los linfocitos B.

35 Además, se dan a conocer determinadas proteínas CD83 solubles de estructura monomérica que son muteínas de sustitución de CD83 que son idóneas para el tratamiento o la prevención de enfermedades como está definido más arriba. Más específicamente, la presente invención da a conocer

40 (1) Una proteína CD83 soluble que es una proteína CD83 monomérica en la que uno o más de los restos de cisteína se han sustituido por un resto aminoacídico diferente (de aquí en adelante brevemente «proteína CD83 soluble»), un fragmento, una forma dimérica y/o un derivado funcional de la misma, para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección médica ocasionada por la disfunción o el funcionamiento indeseado de una respuesta inmunitaria celular en la que intervienen las células dendríticas, los linfocitos T y/o los linfocitos B;

45 (2) un ácido nucleico o vector de expresión recombinante que codifica la proteína CD83 soluble del punto (1) anterior;

50 (3) una célula hospedadora procariota o eucariota transformada/transfectada con un ácido nucleico o un vector del punto (2) anterior;

(4) un método para producir la proteína CD83 soluble del punto (1) anterior, que comprende cultivar la célula hospedadora procariota o eucariota transformada/transfectada de acuerdo con el punto (3) anterior;

(5) una composición farmacéutica que comprende la proteína CD83 soluble del punto (1) anterior, o un ácido nucleico o vector como el definido anteriormente en (2);

(6) el uso de la proteína CD83 soluble del punto (1) anterior para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección médica ocasionada por la disfunción o el funcionamiento indeseado de una respuesta inmunitaria celular en la que intervienen las células dendríticas, los linfocitos T y/o los linfocitos B; y

5 (7) el uso del punto (6) anterior, en el que dicha enfermedad o afección médica ocasionada por la disfunción o el funcionamiento indeseado de una respuesta inmunitaria celular en la que intervienen las células dendríticas, los linfocitos T y/o los linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en: alergias, asma, rechazo de un trasplante de tejido u órgano, síndromes autoinmunes tales como miastenia grave, esclerosis múltiple, vasculitis, enfermedades por inflamación crónica del intestino tales como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, HLA B27 asociada a autoinmunitarias tales como la enfermedad de Bechterew y lupus eritematoso sistémico, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, artritis reumatoide, diabetes sacarina insulino dependiente y sida.

Descripción de las figuras

15 Figura 1: Secuencia parcial del vector pGEX2ThCD83ext. La secuencia del dominio extracelular de CD83 se muestra en negrita. La secuencia de aminoácidos «GSPG» se añadió al extremo amino del dominio extracelular de CD83 y es parte del sitio de escisión de la trombina que está subrayado. El aminoácido «I» del extremo carboxilo es parte del dominio citoplasmático de CD83. Los sitios de clonación de SmaI y EcoRI están indicados con una línea discontinua (--).

20 Figura 2: Purificación de hCD83ext. A-D muestran los perfiles de elución cromatográfica de las 4 etapas de purificación. Las alícuotas recogidas se describen en negro. Las proteínas de las fracciones recogidas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y reductoras y se visualizaron con tinción de azul brillante de Coomassie. Además, D también muestra el análisis de inmunotransferencia. A: cromatografía de afinidad en una columna GSTrap: Carril 1: marcador de masa molecular (MMM); carriles 4 a 10: alícuotas de GST-hCD83ext. B: cromatografía de intercambio aniónico en una columna Source 15QPE 4,6/100: carril 1: MMM; carriles 2 a 7: alícuotas de GST-hCD83ext. C: purificación de los productos de escisión de la trombina mediante cromatografía de afinidad en GSTrap: Carril 1: MMM; carriles 2 a 4: eluido recogido que contiene la hCD83ext escindida. D: filtración en gel con una columna Superdex 75 (26/16): Carril 1: MMM; carril 2: hCD83ext. El panel derecho muestra el análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-CD83. E: Liofilización, cantidades iguales de alícuotas de CD83ext, tomadas antes y después de liofilizar, se cargaron en una SDS-PAGE al 15%.

30 Figura 3: La hCD83 inhibe la maduración de las células dendríticas. Análisis por FACS de las células dendríticas. A: las células dendríticas inmaduras se hicieron madurar en presencia del cóctel de maduración desde los días 5 a 8 (= control de simulación para las células dendríticas maduras). B: las células dendríticas inmaduras se hicieron madurar en presencia del cóctel de maduración (día 5-8) y el día 7 se añadió hCD83ext durante 24 horas. C: las células dendríticas inmaduras se incubaron en presencia del cóctel de maduración en combinación con hCD83 desde los días 5 a 8. El día 8 se lavaron las células y se tñieron con los anticuerpos indicados y se analizaron por FACS.

35 Figura 4: La hCD83ext inhibe la proliferación de linfocitos T alógenos. Análisis por MLR: la hCD83ext redujo la proliferación de los linfocitos T de una manera dependiente de la dosis. La GST, que se purificó del mismo modo que la hCD83ext, y la SAB (cada una a 5 µg/ml) se utilizaron como controles.

40 Figura 5: La hCD83ext inhibe la proliferación de linfocitos T alógenos murinos. A: análisis por MLR: la hCD83ext redujo la proliferación de los linfocitos T de una manera dependiente de la dosis (para la concentración, véase la figura 4). La GST, que se purificó del mismo modo que la hCD83ext, se utilizó como control (5 µg/ml). B: Después de la liofilización se conserva la actividad biológica en un análisis por MLR como el de la figura 5A.

45 Figura 6: La hCD83ext inhibe la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) A: en un modelo *in vivo* para la esclerosis múltiple (EM); B: la inhibición tiene un efecto duradero; y C: es adecuado para aplicaciones terapéuticas (hCD83ext se da en días alternos (catorce veces en total), comenzando el día 3 después de la inducción de la EAE).

Figura 7: SDS-PAGE de la hCD83ext con y sin 2-mercaptoetanol (ME).

50 Figura 8: Secuencia parcial del vector pGEX2ThCD83ext_mut129_CtoS. La secuencia del dominio extracelular de CD83 se muestra en negrita. Se ha aumentado el tamaño del cambio de resto nucleotídico y aminoácido. La secuencia de aminoácidos «GSPG» se añadió al extremo amino del dominio extracelular de la CD83 y es parte del sitio de escisión de la trombina que está subrayado. El aminoácido «I» del extremo carboxilo forma parte del dominio citoplasmático de CD83. Los sitios de clonación de EcoRI y SmaI están indicados con una línea discontinua (--).

Figura 9: SDS-PAGE de hCD83ext y hCD83ext_mut129_CtoS con y sin 2-mercaptoetanol (ME).

Figura 10: La CD83 inhibe la reestimulación de las células del bazo tras la primera inducción de la EAE (A) y también tras la segunda inducción de la EAE (B).

Figura 11: La CD83 soluble inhibe la producción de citocinas en los esplenocitos tras la primera inducción de la EAE (A) y tras una segunda inducción de la EAE (B).

Descripción detallada de la invención

5 Mediante una estrategia de PCR, se amplificó el dominio extracelular de CD83 más el primer codón del dominio citoplasmático a partir de un clon de ADNc humano de longitud completa y se insertó detrás del gen de la glutatión transferasa en un vector de expresión. En la proteína de fusión resultante, la glutatión transferasa (GST) en el extremo amino se separó, mediante un sitio de escisión de la trombina, del dominio extracelular de CD83 extendido por la Ile del dominio citoplasmático. La proteína de fusión se purificó de un cultivo bacteriano de una noche, se sometió a la escisión de la trombina y la hCD83ext se purificó adicionalmente. La hCD83ext purificada se utilizó en ensayos de maduración de las células dendríticas y de estimulación de los linfocitos T (MLR). Sorprendente, la adición de la hCD83ext a las células dendríticas inmaduras indujo la alteración del patrón de expresión de los marcadores de superficie. La expresión de CD80 se redujo del 96 al 66% y la expresión de CD83 del 96 al 30%. De igual forma, las células dendríticas maduras cambiaron el patrón de expresión del marcador de la superficie tras la exposición a la hCD83ext. La expresión de CD83 se redujo del 96 al 66%. Las células dendríticas tratadas con hCD83ext perdieron su capacidad para estimular la proliferación de los linfocitos T. Estos resultados sugirieron que la hCD83ext se podría utilizar para el tratamiento de enfermedades o afecciones que se deban a las células dendríticas, a los linfocitos T y/o a los linfocitos B. Por lo tanto, se estudiaron los efectos de la hCD83ext sobre la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple. Sorprendentemente, los ratones tratados con la hCD83ext no desarrollaron la parálisis típica asociada a la EAE.

20 Así pues, de acuerdo con la realización (6) de la invención, la proteína CD83 soluble de la realización (1) se puede usar para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección médica ocasionada por la disfunción o funcionamiento indeseado de una respuesta inmunitaria celular en la que intervienen células dendríticas, linfocitos T y/o linfocitos B. Preferiblemente, la proteína CD83 soluble comprende al menos los restos de aminoácidos 20 a 144, ó 20 a 145, de la SEQ ID n.º 2. Los fragmentos adecuados son los que tienen la misma actividad y conformación que la CD83 natural. Los derivados adecuados incluyen, pero no se limitan a, las proteínas que tienen otras secuencias adicionales unidas a su extremo amino o carboxilo, p. ej., se pueden utilizar las que llevan parte de un dominio transmembranario en su extremo carboxilo o las que llevan en el extremo amino un péptido funcional corto (Gly-Ser-Pro-Gly). Los medicamentos que contienen estas proteínas y fragmentos son útiles para el tratamiento o la prevención de la parálisis, como, por ejemplo, el observado con la esclerosis múltiple progresiva.

De una manera similar, los ácidos nucleicos o vectores que codifican la proteína CD83 soluble de la realización (1) pueden utilizarse en la producción de medicamentos para el tratamiento y la prevención de las afecciones médicas ocasionadas por la disfunción o el funcionamiento indeseado de la respuesta inmunitaria celular en la que intervienen células dendríticas, linfocitos T y/o linfocitos B. En particular, se pueden utilizar secuencias de ADN que comprenden los nucleótidos 58 a 432, más preferiblemente 58 a 435, de la SEQ ID n.º 1. Estos medicamentos pueden utilizarse para hacer disminuir el nivel de expresión de la proteína y/o del ARN de CD83 en los mamíferos.

35 Puede ser adecuado el uso de estos medicamentos para la prevención o el tratamiento de enfermedades tales como alergias, asma, rechazo de un trasplante de tejido u órgano, síndromes autoinmunitarios tales como miastenia grave, esclerosis múltiple, vasculitis, enteropatías inflamatorias crónicas tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, autoinmunitarias asociadas a HLA B27 tales como espondilitis anquilosante, y lupus eritematoso sistémico, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, artritis reumatoide, diabetes sacarina insulino dependiente y sida. Los métodos de tratamiento y/o prevención de las afecciones médicas ocasionadas por la disfunción o el funcionamiento indeseado de los linfocitos T pueden comprender la administración de una cantidad eficaz de CD83 o de fragmentos como está descrito en la presente memoria; un método también podría comprender la administración de una cantidad eficaz de un ácido nucleico o vector como el descrito más arriba; los métodos podrían aplicarse al tratamiento o prevención de enfermedades tales como alergias, asma, rechazo de un trasplante de tejido u órgano, síndromes autoinmunitarios tales como miastenia grave, esclerosis múltiple, vasculitis, enteropatías inflamatorias crónicas tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, autoinmunitarias asociadas a HLA B27 tales como espondilitis anquilosante, y lupus eritematoso sistémico, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, artritis reumatoide, diabetes sacarina insulino dependiente y sida.

45 Tal y como se define en la presente memoria, la terminología «inhibir la interacción» se utiliza para indicar que las formas solubles de los miembros de la familia de proteínas de CD83 de la presente invención son capaces de alterar la interacción entre las células dendríticas y los linfocitos T y/o los linfocitos B y/o inhibir la formación de agrupamientos de células dendríticas y linfocitos T o de células dendríticas y linfocitos B *in vitro* a pH y concentración salina fisiológicos, preferiblemente, a valores de pH que oscilan de pH 6,0 a 8,0 y/o a concentraciones salinas que oscilan de 50 mM a 250 mM, preferiblemente de 125 mM a 175 mM.

En los ejemplos se da a conocer un ensayo preferido para determinar la fijación de las células dendríticas a los linfocitos T y la formación de agrupamientos de células dendríticas y linfocitos T (Lechman M. et al., (2001) *J. Exp. Med.* 194: 1813-1821).

La proteína CD83 soluble para el uso en la presente invención es capaz de alterar la fijación entre las células dendríticas y los linfocitos T y/o los linfocitos B y/o la formación de agrupamientos entre células dendríticas y linfocitos T o células dendríticas y linfocitos B de al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 50%, aún más preferiblemente al menos el 75% y lo más preferiblemente al menos el 90% o más, según se midió en uno de los ensayos anteriores. La terminología «proteína CD83 soluble» se utiliza aquí para definir una molécula proteínica que tiene al menos una porción del dominio extracelular de un miembro de la familia de proteínas de CD83, pero que no tiene una secuencia de aminoácidos que es capaz de anclar dicha molécula a la membrana de una célula en la cual se expresa. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD83 humana así como la secuencia de aminoácidos de CD83 se describen en Zhou, L. J. et al., (1992) *J. Immunol.* 149 (2): 735-742 (número de acceso de GenBank Z11697) y se dan a conocer en la SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2, respectivamente.

Tal y como está definido en la presente memoria, un miembro de la familia de proteínas de CD83 incluye cualquier proteína que se produce de forma natural que tiene al menos el 70%, preferiblemente el 80% y más preferiblemente el 90% o más, de identidad de aminoácidos con la CD83 humana tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 2.

Así pues, además de la propia CD83 humana, los miembros de la familia de proteínas de CD83 incluyen la proteína de ratón HB15 que está codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID n.º 3 y que está representada por la secuencia de aminoácidos dada a conocer en la SEQ ID n.º 4, número de acceso a Genbank NM_009856 (Berchthold et al.).

Otros miembros de la familia de proteínas de CD83 que se producen de forma natural se pueden obtener mediante la hibridación de un ácido nucleico que comprende, por ejemplo, toda la región codificante, o la porción extracelular, de la CD83 humana o de la HB15 de ratón, a distintas fuentes de ácidos nucleicos (ADN genómico, ADNc, ARN) de otros animales, preferiblemente mamíferos, o de otros tejidos del mismo organismo.

La hibridación se refiere a la fijación entre secuencias complementarias de ácido nucleico (p. ej, sentido/antisentido, siRNA, etc.). Tal y como conocen los expertos en la técnica, T_m (temperatura de fusión) se refiere a la temperatura a la cual la fijación entre las secuencias ya no es estable. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «hibridación selectiva» se refiere a la hibridación en condiciones moderadamente rigurosas o muy rigurosas, que puede diferenciar las secuencias nucleotídicas relacionadas con CD83 de las secuencias que no están relacionadas con ella.

En las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones utilizadas para conseguir un nivel particular de rigor variarán según la naturaleza de los ácidos nucleicos que se van a hibridar. Por ejemplo, se pueden tener en cuenta la longitud, grado de complementariedad de las secuencias, la composición de la secuencia (p. ej., el contenido de GC frente al de AT) y el tipo (p. ej., ARN frente a ADN) de las regiones que hibridarán a la hora de seleccionar las condiciones de hibridación concretas. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, sobre un filtro.

En general, la estabilidad de un híbrido de ácido nucleico disminuye a medida que en la reacción de hibridación disminuye el ion de sodio y se incrementa la temperatura. Un ejemplo de reacción de hibridación de rigor moderado es el siguiente: SSC a 2X/SDS al 0,1% a unos 37 °C o 42 °C (condiciones de hibridación); SSC a 0,5X/SDS al 0,1% a aproximadamente la temperatura ambiente (condiciones de lavado poco rigurosas); SSC a 0,5X/SDS al 0,1% a unos 42 °C (condiciones de lavado moderadamente rigurosas). Un ejemplo de condiciones de hibridación muy rigurosas es el siguiente: SSC a 2X/SDS al 0,1% a aproximadamente la temperatura ambiente (condiciones de hibridación); SSC a 0,5X/SDS al 0,1% a aproximadamente la temperatura ambiente (condiciones de lavado poco rigurosas); SSC a 0,5X/SDS al 0,1% a unos 42 °C (condiciones de lavado moderadamente rigurosas); y SSC a 0,1X/SDS al 0,1% a unos 65 °C (condiciones muy rigurosas).

Típicamente, las condiciones de lavado se ajustan para conseguir el grado de rigor deseado. Así pues, el rigor de la hibridación puede determinarse, por ejemplo, mediante el lavado en una condición determinada, p. ej, en condiciones poco rigurosas o condiciones muy rigurosas, o utilizando cada una de las condiciones, p. ej., durante 10-15 minutos cada una, en el orden enumerado más arriba, repitiendo alguna o todas las etapas enumeradas. Las condiciones óptimas para la hibridación selectiva variarán según sea la reacción de hibridación en concreto, y puede determinarse empíricamente.

Una vez que se ha clonado un ácido nucleico que codifica una proteína CD83 que se produce en la naturaleza, el dominio extracelular puede determinarse mediante la comparación del dominio extracelular de las moléculas de CD83 conocidas con el de la secuencia de CD83 clonada. A continuación, una forma soluble de una proteína CD83 dada que se produce en la naturaleza puede expresarse recombinantemente mediante las técnicas que se describen en la presente memoria. Por ejemplo, puede producirse un ácido nucleico que codifica una forma soluble de CD83, insertarlo en un vector y transformarlo en células hospedadoras procariontas o eucariotas mediante las técnicas bien conocidas que se describen en la presente memoria y otras más que se conocen en la técnica (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1989).

Así pues, cuando se clona en los sistemas bacterianos, pueden utilizarse promotores constitutivos tales como T7 y similares, así como promotores inducibles tales como π , de bacteriófago X, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido de ptrp-

lac). Cuando se clona en sistemas de células de mamíferos, se pueden utilizar promotores constitutivos tales como SV40, RSV, CMV, entre ellos CMV-IE, y similares, o promotores inducibles procedentes del genoma de las células de mamíferos (p. ej., promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., la repetición terminal larga del virus del tumor de mama de ratón; el promotor tardío del adenovirus). También pueden utilizarse promotores producidos mediante técnicas sintéticas o de ADN recombinante para garantizar la transcripción de las secuencias del ácido nucleico de la invención.

Se pueden construir por ingeniería genética sistemas de expresión de mamíferos mediante el uso de virus recombinantes o elementos víricos para la expresión directa. Por ejemplo, al utilizar vectores de expresión de adenovirus, el ácido nucleico de interés puede estar ligado a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, p. ej., la secuencia del promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Alternativamente, puede utilizarse el promotor 7,5K del virus de la variolovacuna.

De interés particular son los vectores basados en el virus del papiloma bovino (VPB) que tienen la capacidad de replicarse como los elementos extracromosómicos. Poco después de la entrada de un vector extracromosómico en las células de ratón, el vector se replica hasta unas 100 a 200 copias por célula. Dado que la transcripción del ADNc insertado no requiere la integración del plásmido en el cromosoma del hospedador, se produce un nivel alto de expresión. Estos vectores pueden utilizarse para la expresión estable al incluir un marcador de selección en el plásmido, tal como el gen *neo*, por ejemplo. Alternativamente, el genoma retrovírico puede modificarse para utilizarlo como un vector capaz de introducir y dirigir la expresión del ácido nucleico de interés en las células hospedadoras. También puede conseguirse un nivel alto de expresión mediante el uso de promotores inducibles, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, el promotor RA de la metalotioneína y los promotores de choque térmico.

En la levadura pueden utilizarse una serie de vectores que contienen promotores inducibles o constitutivos. Se puede utilizar un promotor de levadura constitutivo, tal como ADH o LEU2, o un promotor inducible, tal como GAL. Alternativamente, se conocen en la técnica y pueden utilizarse una serie de vectores que facilitan la integración de secuencias de ácido nucleico foráneo en un cromosoma de levadura, mediante la recombinación homóloga, por ejemplo.

Un ácido nucleico de interés que codifica una proteína CD83 soluble para el uso de acuerdo con la presente invención se puede insertar en un vector de expresión para la expresión *in vitro* (p. ej., mediante ensayos de transcripción/traducción *in vitro* o kits disponibles comercialmente) o se pueden insertar en un vector de expresión que contiene una secuencia promotora que facilita la transcripción y/o traducción en procariotas o eucariotas (p. ej., una célula de insecto) mediante la transferencia de un ácido nucleico apropiado en una célula adecuada. Una célula en la cual se puede propagar un vector y se puede transcribir su ácido nucleico, o se puede expresar un polipéptido codificado, se denomina en la presente memoria una «célula hospedadora».

La terminología también incluye a toda progenie de la célula hospedadora en cuestión. Además, un ácido nucleico de interés de acuerdo con la presente invención puede insertarse en un vector de expresión para la expresión *in vivo* para una genoterapia somática. Gracias a estos vectores, por ejemplo, vectores retrovíricos, vectores de adenovirus, vectores del virus adenoasociado, vectores de expresión plasmídicos, los ácidos nucleicos de la invención se expresan tras la infección/introducción del vector en la célula dendrítica.

Las células hospedadoras incluyen, pero sin limitarse a ellos, microorganismos tales como bacterias, levadura, insecto y organismos mamíferos. Por ejemplo, bacterias transformadas con ácido nucleico de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ácido nucleico cosmídico o de ácido nucleico plasmídico que contienen un ácido nucleico de interés; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen un ácido nucleico de interés; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (p. ej., el plásmido Ti) que contienen un ácido nucleico de interés; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (p. ej., baculovirus) que contienen un ácido nucleico de interés; o sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (p. ej., retrovirus, adenovirus, virus de la variolovacuna) que contienen un ácido nucleico de interés o sistemas de células animales transformadas que se modifican genéticamente para la expresión estable.

Para la expresión duradera de la proteína CD83 soluble en las células hospedadoras, se prefiere la expresión estable. Así pues, mediante el uso de vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, por ejemplo, las células pueden transformarse con un ácido nucleico de interés controlado mediante los elementos de control apropiados (p. ej., secuencias promotoras/potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc). Opcionalmente, el vector de expresión también puede contener un ácido nucleico que codifica un marcador de selección o identificable que confiere resistencia a una presión selectiva, lo que permite identificar las células que tienen el vector, hacerlas crecer y expandirlas. Alternativamente, el marcador de selección puede estar en un segundo vector que se cotransfecta en una célula hospedadora con un primer vector que contiene un polinucleótido de la invención.

Pueden utilizarse una serie de sistemas de selección, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, el gen de la timidina

cinasa del virus del herpes simple, el gen de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y los genes de la adenina fosforribosiltransferasa en células tk-, hgprt o aprt, respectivamente. Adicionalmente, puede utilizarse la resistencia a los antimetabolitos como base para la selección del gen *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato; del gen *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico; del gen de la neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418; y del gen de la higromicina, que confiere resistencia a la higromicina. Se han descrito otros genes de selección, a saber, *trpB*, que permite que las células utilicen el indol en lugar de triptófano; *hisD*, que permite que las células usen histinol en vez de histidina; y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, la 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «transformación» significa un cambio genético en una célula después de que se haya incorporado el ADN exógeno en la célula. Así pues, una «célula transformada» es una célula en la cual (o en cuya progenie) se ha introducido una molécula de ADN por medio de técnicas de ADN recombinante.

La transformación de una célula hospedadora con ADN puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cuando la célula hospedadora es eucariota, los métodos de transformación de ADN incluyen, por ejemplo, coprecipitación con fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encapsulado en liposomas, y vectores víricos. Las células eucariotas también pueden cotransformarse con secuencias de ADN que codifican un ácido nucleico de interés, y una segunda molécula de ADN foráneo que codifica un fenotipo seleccionable, tal como las descritas en la presente memoria. Otro método es utilizar un vector vírico eucariótico, tal como el virus 40 de simio (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar transitoriamente o transformar las células eucariotas y expresar la proteína.

Después de la transformación, puede aislarse la forma soluble de CD83 y purificarla siguiendo los métodos convencionales. Por ejemplo, el lisado preparado a partir de un hospedador (p. ej., bacteria) que la expresa puede purificarse por HPLC, cromatografía de exclusión por tamaños, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. Las proteínas sustancialmente puras también pueden obtenerse mediante síntesis química con un sintetizador de péptidos (p. ej., Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA; modelo 430A o similar).

Los compuestos para el uso en la presente invención también incluyen derivados de la proteína CD83 de acuerdo con la presente invención, tal y como está mencionado más arriba, en donde se ha añadido, eliminado, sustituido, insertado o invertido uno o varios aminoácidos siempre y cuando estos derivados permanezcan solubles tal y como está definido más arriba y sean capaces de ocasionar una alteración en la fijación de las células dendríticas a los linfocitos T y/o a los linfocitos B y/o la formación de agrupamientos células dendríticas y linfocitos T tal y como está definido más arriba. También incluye variantes de ajuste de los compuestos de CD83 mencionados hasta ahora.

Adiciones concretas preferidas son aquéllas en donde la proteína CD83 soluble tal y como está definida más arriba tiene uno o más restos de aminoácidos procedentes del dominio intracelular cercano en su extremo carboxilo, preferiblemente, la proteína CD83 soluble comprende los restos de aminoácidos 20 a 145 de la SEQ ID n.º 2; y/o tiene secuencias funcionales unidas a su extremo amino, preferiblemente secuencias funcionales de hasta 10 restos de aminoácidos y, lo más preferiblemente, lleva en el extremo amino los aminoácidos adicionales Gly-Ser-Pro-Gly.

Cuando se sustituyen uno o varios aminoácidos de una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas de CD83, se prefiere que uno o varios aminoácidos estén sustituidos conservativamente. Por ejemplo, las sustituciones conservativas incluyen sustituciones en las cuales los restos de aminoácidos alifáticos tales como Met, Ile, Val, Leu o Ala están sustituidos por otro de ellos. Asimismo, los restos de aminoácidos polares pueden estar sustituidos por otro tal como Lys y Arg, Glu y Asp o Gln y Asn.

La proteína CD83 soluble de las realizaciones (1) y (6) de la invención es una proteína CD83 monomérica en la que uno o más de los restos de cisteína se han sustituido por uno o más restos diferentes de aminoácidos pequeños y/o polares. Preferiblemente los restos de aminoácidos pequeños y/o polares se seleccionan de serina, alanina, glicina, valina, treonina, etc., preferiblemente son serina. Además se prefiere que un resto de cisteína, más preferiblemente el quinto resto de cisteína, se haya sustituido. Lo más preferiblemente la proteína CD83 soluble comprende los restos de aminoácidos del 20 al 144 de la SEQ ID n.º 2, donde el resto de cisteína de la posición 129 se ha reemplazado por un resto de serina, o los restos de aminoácidos del 1 al 130 de la SEQ ID n.º 10. Las moléculas monoméricas definidas poseen particular importancia para aplicaciones farmacéuticas.

De acuerdo con la invención, los derivados de una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas de CD83 también incluyen derivados en los cuales uno o más de los aminoácidos que contiene, tiene una cadena lateral alterada. Tales polipéptidos derivados incluyen, por ejemplo, los que comprenden aminoácidos en los cuales los grupos amino libres forman hidrocloruros de amina, grupos sulfonilo de p-tolueno, grupos carboxilo; los grupos carboxi libres forman sales, ésteres de metilo y ésteres de etilo; los grupos hidroxilo libres que forman derivados de O-acilo u O-alquilo así como derivados de aminoácidos que se producen de forma natural, por ejemplo, 4-hidroxiprolina para la prolina, 5-hidroxilisina para la lisina, homoserina para la serina, ornitina para la lisina, etc. También se incluyen derivados de aminoácidos que pueden alterar los enlaces covalentes, por ejemplo, el puente disulfuro que

se forma entre dos restos de cisteína que produce un polipéptido ciclado.

Una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas de CD83 o derivados de la misma puede tener un patrón de glucosilación nativo de una molécula de CD83 o un patrón de glucosilación alterado o puede no estar glucosilada siempre y cuando estas moléculas sean solubles tal y como está definido más arriba y sean capaces de ocasionar una alteración de la fijación de las células dendríticas a las células dendríticas, a los linfocitos T y/o a los linfocitos B y/o la formación de agrupamientos de células dendríticas y linfocitos T tal y como está definido más arriba.

En una realización preferida, la forma soluble de CD83 para el uso en la presente invención comprende los aminoácidos de la posición 20 a la 144, más preferiblemente los aminoácidos de 20 a 145, de la proteína CD83 humana como está descrito en la SEQ ID n.º 2 o los aminoácidos 1 a 130 de la SEQ ID n.º 8.

En otra realización preferida más, la forma soluble de CD83 para el uso en la presente invención comprende los aminoácidos de las posiciones 22 a la 135 de la proteína de ratón HB15 tal y como está descrito en la SEQ ID n.º 4.

La presente invención también se refiere al uso de un ácido nucleico o un vector de expresión que codifica una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas de CD83 o un derivado de tal proteína para producir un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección médica ocasionada por la disfunción o el funcionamiento indeseado de una respuesta inmunitaria celular en la que intervienen las células dendríticas, los linfocitos T y/o los linfocitos B.

Los ácidos nucleicos para utilización en la presente invención tal como los descritos más arriba pueden ser en forma de ADN (ácido desoxirribonucleico) que contiene las bases adenina, timina, guanina y citosina, o de ARN (ácido ribonucleico) que contiene las bases adenina, uracilo, guanina y citosina, o mezclas de los dos.

Cuando la molécula de ácido nucleico para utilización en la invención procede de la proteína CD83 de humano, la porción de la región codificante es preferiblemente del nucleótido 58 al 432 de la secuencia de SEQ ID n.º 1. Alternativamente, la porción de la región codificante es del nucleótido 58 al 435 de la secuencia de SEQ ID n.º 1.

Cuando la molécula de ácido nucleico para utilización en la invención procede de la proteína HB15 de ratón, la porción de la región codificante es preferiblemente desde aproximadamente el nucleótido 76 al 418 de la secuencia de SEQ ID n.º 3.

Un ácido nucleico que codifica una proteína para utilización de acuerdo con la invención puede estar insertado en un vector. La terminología «vector» se refiere a un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que puede manipularse mediante la inserción o incorporación de un polinucleótido. Tales vectores pueden utilizarse para la manipulación genética (a saber, «vectores de clonación») o pueden utilizarse para transcribir o traducir el polinucleótido insertado («vectores de expresión»). Un vector contiene por lo general al menos un origen de replicación para la propagación en una célula y un promotor. Los elementos de control, que incluyen los elementos de control de la expresión que se exponen en la presente memoria, presentes dentro de un vector de expresión, se incluyen para facilitar la transcripción y traducción correctas (p. ej., señal de ajuste para los intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción en fase del ARNm, y codones de parada, etc.). La terminología «elemento de control» pretende incluir, como mínimo, uno o más componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y puede también incluir otros componentes, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañero de fusión.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «elemento de control de la expresión» se refiere a una o varias secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico a la cual están unidas operativamente. Un elemento de control de la expresión unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico controla la transcripción y, según sea necesario, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Así pues, un elemento de control de la expresión puede incluir, según sea necesario, promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (p. ej., ATG) al frente de un gen que codifica una proteína. «Unido operativamente» se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes así descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la forma en la que fueron diseñados.

Mediante «promotor» se hace referencia a una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. Tanto los promotores constitutivos como los inducibles están incluidos en la invención (véase p. ej., Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153: 516-544, 1987). Los promotores inducibles son activados por señales o agentes externos. También están incluidos en la invención los elementos promotores que son suficientes para que la expresión génica dependiente del promotor se pueda controlar específicamente según los tipos celulares, tejidos o condiciones fisiológicas; tales elementos pueden estar localizados en 5', en 3' o en las regiones intrónicas del gen. Los promotores útiles en la invención también incluyen los promotores condicionales. Un «promotor condicional» es un promotor que es activo sólo en determinadas condiciones. Por ejemplo, el promotor puede estar inactivo o reprimido cuando está presente un agente particular, tal como un compuesto químico. Cuando el agente ya no está presente, la transcripción se activa o deja de estar reprimida. Se puede insertar un ácido nucleico de interés según la presente invención en un vector de expresión para la expresión *in vivo* para terapia génica somática. Con estos vectores, por

ejemplo vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adeno-asociados, vectores de expresión de plásmidos, los ácidos nucleicos de la invención se expresan tras la infección/introducción del vector en las células dendríticas, linfocitos T y/o linfocitos B.

5 Además la invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección médica causada por la disfunción o función indeseada de una respuesta inmune celular que implica a células dendríticas, linfocitos T y/o linfocitos B, en la que una cantidad efectiva de una forma soluble de hCD83ext se administra a un sujeto.

10 Además la invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección médica causada por la disfunción o función indeseada de una respuesta inmune celular que implica a células dendríticas, linfocitos T y/o linfocitos B, en la que la cantidad efectiva de un ácido nucleico o un vector de expresión que codifica una hCD83ext soluble se administra a un sujeto.

15 De acuerdo con la invención, puede utilizarse una hCD83ext soluble o un ácido nucleico o un vector de expresión que codifica una hCD83ext para tratar o prevenir el rechazo de los trasplantes de tejido y/u órgano, en particular los trasplantes de tejido y/o de órgano xenógeno, que se produce como resultado de, por ejemplo, la enfermedad de injerto contra huésped o la enfermedad de huésped contra injerto.

En otra realización de la presente invención, una forma soluble de un miembro de la familia de proteínas de CD83 o un ácido nucleico o un vector de expresión que codifica una hCD83ext puede utilizarse para tratar o prevenir la respuesta indeseable a antígenos foráneos y con eso alergias y asma o afecciones similares.

20 Otros trastornos, enfermedades y síndromes que pueden tratarse o prevenirse mediante el uso de una hCD83ext soluble o un ácido nucleico o un vector de expresión que codifica una hCD83ext soluble incluyen síndromes autoinmunitarios tales como miastenia grave, esclerosis múltiple, vasculitis, enteropatías inflamatorias crónicas tales como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, autoinmunitarios asociadas a HLA B27 tales como espondilitis anquilosante, y lupus eritematoso sistémico, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, artritis reumatoide, diabetes sacarina insulín dependiente y sida.

25 En particular, la hCD83ext es idónea para el tratamiento de la parálisis asociada a la esclerosis múltiple.

30 Para el uso terapéutico o preventivo, los compuestos de la presente invención solos, o en politerapia con otros compuestos moduladores inmunitarios, p. ej., antígenos inductores de tolerancia, se administran a un sujeto, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un paciente humano, para el tratamiento o la prevención de una manera adecuada para la indicación médica. Se puede elegir la administración transcutánea, intracutánea, subcutánea y/o sistémica para introducir la hCD83ext y los derivados de la misma.

35 La producción de composiciones farmacéuticas con una cantidad de uno o varios compuestos de acuerdo con la invención y/o su uso en la aplicación de acuerdo con la invención se produce de la manera habitual por medio de los métodos de tecnología farmacéutica habituales. Por esto, los compuestos de acuerdo con la invención se procesan juntos a adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para las formas medicinales adecuadas para las diferentes indicaciones y tipos de aplicación. Por lo tanto, los medicamentos pueden producirse de tal manera que se obtenga la velocidad de liberación deseada correspondiente, por ejemplo, una carga rápida y/o un efecto mantenido o de liberación prolongada.

Las preparaciones para el uso parenteral, a las cuales pertenecen las inyecciones e infusiones, se encuentran entre los medicamentos empleados sistémicamente más importantes para las indicaciones mencionadas más arriba.

40 Preferiblemente, las inyecciones se preparan bien en forma de viales o también como las denominadas preparaciones de inyección listas para usar, por ejemplo, como jeringuillas listas para usar o desechables, además de frascos perforables para varias tomas. La administración de las preparaciones para inyección puede producirse por la vía de aplicación subcutánea (s. c.), intramuscular (i. m.), intravenosa (i. v.), intranodal (i. n.) o intracutánea (i. c.). Las respectivas formas de inyección adecuadas pueden producirse especialmente como soluciones, suspensiones de cristales, sistemas de nanopartículas o dispersiones coloidales, tal como, por ejemplo, hidrosoles.

50 Las formulaciones inyectables también pueden producirse como concentrados que se pueden ajustar con agentes de dilución isotónicos acuosos para la dosis deseada de los compuestos de la invención. Además, también pueden producirse como polvos, tales como, por ejemplo, liofilizados, que luego preferiblemente se disuelven o dispersan inmediatamente antes de la aplicación con los diluyentes adecuados. Las infusiones también pueden formularse en forma de soluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones en liposomas, microemulsiones y líquidos a base de micelas mixtas, por ejemplo, a base de fosfolípidos. Al igual que con las preparaciones para inyección, las formulaciones para infusión también pueden prepararse en forma de concentrados para diluir. Las formulaciones inyectables también pueden aplicarse en forma de infusiones continuas de tipo estacionario, así como en el tratamiento ambulatorio, por ejemplo, en forma de minibombas.

55 A las formas medicinales parenterales se les pueden añadir albúmina, expansores plasmáticos, compuestos

tensioactivos, solventes orgánicos, compuestos que influyen en el pH, compuestos formadores de complejos o compuestos poliméricos con el objetivo de disminuir la adsorción de los compuestos de la presente invención a materiales tales como los instrumentos de inyección o a los materiales de acondicionamiento, por ejemplo, plástico o vidrio.

5 Los compuestos de acuerdo con la invención pueden estar fijados a nanopartículas en la preparaciones para el uso parenteral, por ejemplo, en partículas dispersas muy finas a base de poli(met)acrilatos, poliacetatos, poliglicolatos, poliaminoácidos o poliéter-uretanos. Las formulaciones parenterales también pueden modificarse constructivamente como preparaciones de liberación prolongada, por ejemplo, sobre el principio de unidad múltiple, en donde los compuestos de la presente invención se incorporan en una forma suspendida lo más finamente distribuida y/o
10 dispersa o como suspensiones de cristales, o en el principio de unidad única, en donde los compuestos según la invención se encierran en una forma medicinal, por ejemplo, un comprimido o una semilla, que posteriormente se implanta. A menudo, estos medicamentos de implantación o de liberación prolongada en las formas medicinales de unidad múltiple y unidad única consisten en los llamados polímeros biodegradables tales como por ejemplo, poliéter-uretanos de ácido láctico y glicólico, poliéter-uretanos, poliaminoácidos, poli(met)acrilatos o polisacáridos.

15 A modo de adyuvantes y vehículos para la producción de preparaciones para el uso parenteral, son adecuados el agua destilada, las sustancias que alteran el valor del pH, tales como, por ejemplo, ácidos o bases orgánicos e inorgánicos así como sus sales, sustancias tamponantes para establecer el valor del pH, agentes para la isotonicidad, tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de monosodio, glucosa y fructosa, los tensioactivos y/o sustancias activas de superficie y emulsionantes, tales como por ejemplo, ésteres parciales de
20 ácidos grasos de polioxietilensorbitano (Tween®) o por ejemplo ésteres de ácidos grasos de polioxietileno (Cremophor®), aceites grasos como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite de ricino, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como por ejemplo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y aceite neutro (Miglyol®) así como adyuvantes poliméricos tales como, por ejemplo, gelatina, dextrano, polivinilpirrolidona, aditivos de tipo solventes orgánicos que incrementan la solubilidad, tales como, por ejemplo, propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o compuestos formadores de complejos tales como, por ejemplo, citratos y urea,
25 conservantes tales como, por ejemplo, benzoato de hidroxipropilo y benzoato de hidroximetilo, alcohol bencílico, antioxidantes tales como, por ejemplo, sulfito de sodio y estabilizantes tales como, por ejemplo, EDTA..

En las suspensiones también se añaden espesantes para impedir la decantación de los compuestos de la presente invención de los tensioactivos y peptizadores, para asegurar la agitabilidad del sedimento, o formadores de complejos, tales como EDTA. Esto puede lograrse con los diferentes complejos de agentes poliméricos, por ejemplo,
30 con polietilenglicoles, poliestirol, carboximetilcelulosa, Pluronic® o ésteres de ácidos grasos con sorbitano y polietilenglicol. Los compuestos de acuerdo con la invención también pueden incorporarse en formulaciones líquidas en forma de compuestos de inclusión, por ejemplo, con ciclodextrinas. Los agentes dispersantes también son adecuados como adyuvantes adicionales. Para la producción de liofilizados también se utilizan soportes, tales como
35 por ejemplo manita, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, PVP o variedades de gelatina.

Otra forma más de aplicación sistémica de importancia es la administración por vía oral como comprimidos, cápsulas de gelatina duras o blandas, comprimidos recubiertos, polvos, microesferas, microcápsulas, comprimidos oblongos, gránulos, comprimidos masticables, pastillas para chupar, gomas o bolsitas de dosis unitaria. Estas formas sólidas de administración por vía oral también pueden prepararse como sistemas de acción sostenida y/o de liberación
40 prolongada. Entre estos hay medicamentos con una cantidad de uno o varios compuestos micronizados de la presente invención, difusiones y formas de erosión a base de matrices, por ejemplo, utilizando grasas, compuestos de tipo cera y/o poliméricos, o los llamados sistemas de reservorio. Como retardador y/o agente para la liberación controlada, las sustancias formadoras de matrices o películas, tal como, por ejemplo, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, derivados de poli(met)acrilato (por ejemplo Eudragit®), ftalato de
45 hidroxipropilmetilcelulosa, son idóneos en las soluciones orgánicas, así como en forma de dispersiones acuosas. En este sentido, también merecen mención las denominadas preparaciones bioadhesivas en las cuales el incremento del tiempo de retención se consigue mediante el contacto intensivo con las membranas mucosas del cuerpo. Un ejemplo de un polímero bioadhesivo es el grupo de Carbomers®.

Para la aplicación sublingual son especialmente adecuados los comprimidos, tales como por ejemplo los comprimidos no disgregables de forma oblonga de un tamaño adecuado con una liberación lenta de los compuestos de la presente invención. Para los propósitos de una liberación selectiva de los compuestos de la presente invención en los diferentes tramos del tubo digestivo, se pueden emplear mezclas de microesferas que se liberan en los diferentes tramos, por ejemplo, mezclas de microesferas solubles del intestino grueso y resistentes a los jugos
50 gástricos y/o solubles en el intestino delgado y solubles en los jugos gástricos. El mismo objetivo de liberación en diferentes tramos del tubo digestivo también se puede concebir con los comprimidos laminados producidos adecuadamente con un núcleo, en donde el revestimiento del fármaco se libera rápidamente en el jugo gástrico y el núcleo del fármaco se libera lentamente en el medio del intestino delgado. El objetivo de la liberación controlada en diferentes tramos del tubo digestivo también puede conseguirse con comprimidos multicapa. Las mezclas de microesferas con el fármaco de liberación diferencial pueden usarse para rellenar cápsulas duras de gelatina.

60 Los agentes de separación y lubricantes y antideslizantes, dispersantes tales como dióxido de silicón apagallamas,

disgregantes tales como diferentes tipos de almidón, PVC, ésteres de celulosa como agentes granulantes o retardadores, tales como por ejemplo compuestos de tipo cera y/o poliméricos a base de Eudragit®, celulosa o Cremophor®, se utilizan como adyuvantes adicionales para producir comprimidos, tales como por ejemplo comprimidos o cápsulas duras y blandas de gelatina, así como comprimidos revestidos y granulados.

- 5 Se utilizan antioxidantes, edulcorantes tales como por ejemplo sacarosa, xilita o manita, saborizantes masticables, aromas, conservantes, colorantes, sustancias tamponantes, agentes de compresión directa, tales como por ejemplo celulosa microcristalina, almidón e hidrolizados de almidón (por ejemplo Celutab®), lactosa, polietilenglicoles, polivinilpirrolidona y fosfato de dicalcio, lubricantes, sustancias de relleno, tales como lactosa o almidón, aglutinantes en forma de lactosa, variedades de almidón, tales como por ejemplo almidón de trigo o maíz y/o arroz, derivados de celulosa, por ejemplo metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o sílice, polvo de talco, estearatos, tales como por ejemplo estearato de magnesio, estearato de aluminio, estearato de calcio, talco, talco siliconizado, ácido esteárico, alcohol acetílico y grasas hidratadas.

En este sentido, también se mencionan los sistemas terapéuticos orales construidos especialmente sobre los principios osmóticos, tales como por ejemplo GIT (sistema terapéutico digestivo) u OROS (sistema osmótico oral).

- 15 Entre los comprimidos que se pueden administrar por vía oral se encuentran los comprimidos o tabletas efervescentes, los cuales representan formas medicinales instantáneas bebibles inmediatamente que se disuelven o suspenden rápidamente en agua. Entre las formas que se pueden administrar por vía oral se encuentran también las soluciones, por ejemplo gotas, zumos y suspensiones, que pueden producirse de acuerdo con el método ofrecido más arriba y pueden aún contener conservantes para incrementar la estabilidad y opcionalmente aromas por razones de facilitar la ingestión, y colorantes para una mejor diferenciación, así como antioxidantes y/o vitaminas y edulcorantes tales como azúcar o edulcorantes artificiales. Esto también es cierto para zumos concentrados que se formulan con agua antes de ingerirlos. Las resinas de intercambio iónico en combinación con uno o más compuestos de la presente invención también se mencionan para la producción de formas ingeribles líquidas.

- 25 Una forma de liberación especial consiste en la preparación de las denominadas formas medicinales flotantes, por ejemplo, basadas en comprimidos o microesferas que producen gas tras el contacto con líquidos corporales y, así pues, flotan en la superficie del jugo gástrico. Además, los denominados sistemas de liberación controlada electrónicamente también pueden formularse mediante la liberación de los compuestos de la presente invención que se puede ajustar selectivamente a las necesidades individuales.

- 30 Otro grupo de administración sistémica y también opcionalmente formas medicinales eficaces por vía tópica están representados por los medicamentos aplicables por vía rectal. Entre éstos se encuentran los supositorios y las formulaciones en enema. Las formulaciones en enema pueden prepararse a base de comprimidos con solventes acuosos para producir esta forma de administración. También puede disponerse de cápsulas rectales a base de gelatina u otros vehículos.

- 35 La grasa endurecida, tal como por ejemplo Witepsol®, Massa Estarinum®, Novata®, grasa de coco, conglomerado de glicerol-gelatina, geles de glicerol-jabón y polietilenglicoles son idóneos para hacer de base para los supositorios.

Para la aplicación a largo plazo con una liberación sistemática de los compuestos de la presente invención de hasta varias semanas, resultan adecuados los implantes prensados que se formulan preferiblemente a base de los denominados polímeros biodegradables.

- 40 Como otro grupo importante más de medicamentos activos por vía sistémica, también deben destacarse los sistemas transdérmicos que tienen por característica distintiva, con respecto las formas rectales mencionadas anteriormente, la de soslayar sistema de circulación del hígado y/o el metabolismo hepático. Estos emplastos se pueden preparar especialmente como sistemas transdérmicos que son capaces de liberar los compuestos de la presente invención de una manera controlada durante periodos de tiempo más largos o más cortos sobre la base de diferentes capas y/o mezclas de adyuvantes y vehículos adecuados.

- 45 Además de los adyuvantes y vehículos adecuados tales como los disolventes y componentes poliméricos, por ejemplo, a base de Eudragit®, las sustancias que incrementan la infiltración de la membrana y/o los promotores de la permeación, tales como por ejemplo ácido oleico, Azone®, derivados de ácido adipínico, etanol, urea, propilglicol, son adecuadas para la producción de sistemas transdérmicos de este tipo con el propósito de mejorar y/o acelerar la penetración.

- 50 Como medicamentos de administración tópica local o regional, los siguientes son adecuados como formulaciones especiales: emulsiones aplicables por vía vaginal o genital, cremas, espumas anticonceptivas, implantes de liberación prolongada, soluciones de instilación para administración ovular o transuretral. Para la aplicación oftalmológica son adecuados los ungüentos, soluciones y/o gotas o cremas y emulsiones oculares muy estériles.

- 55 Del mismo modo, las correspondientes gotas otológicas, ungüentos o cremas se pueden diseñar para la aplicación en el oído. Para las dos aplicaciones mencionadas anteriormente, también es posible la administración de formulaciones semisólidas, tales como por ejemplo geles a base de Carbopols® u otros compuestos poliméricos tal

como por ejemplo derivados de polivinilpirrolidona y celulosa.

5 Para la aplicación convencional en la piel o también en la membrana mucosa, cabe nombrar las emulsiones normales, geles, ungüentos, cremas o sistemas de emulsión anfipática y/o de fases mixtas (mezcla de fases aceite/agua o agua/aceite) así como liposomas y transferosomas. A modo de adyuvantes y/o vehículos, son adecuados el alginato de sodio como un formador de gel para la producción de una base adecuada o derivados de celulosa, tal como por ejemplo goma guar o goma de xanteno, formadores de gel inorgánico, tales como por ejemplo hidróxidos de aluminio o bentonitas (también denominado formador de gel tixotrópico), derivados de ácido poliacrílico, tales como por ejemplo Carbopol®, polivinilpirrolidona, celulosa microcristalina o carboximetilcelulosa. Además, son adecuados los compuestos de masa molecular baja y alta anfipáticos así como los fosfolípidos. Los geles pueden estar presentes bien como hidrogeles a base de agua o como organogeles hidrófobos, por ejemplo, a base de mezclas de hidrocarburos parafínicos y vaselina de baja y alta masa molecular.

10 Se pueden emplear tensioactivos aniónicos, catiónicos o neutros como emulsionantes, por ejemplo, jabones alcalinizados, detergentes metílicos, detergentes amínicos, compuestos sulfonatados, detergentes catiónicos, alcoholes grasos altos, ésteres parciales de ácidos grasos de sorbitano y de polioxietilensorbitano, por ejemplo, tipos de Lanette, cera de la lana, lanolina u otros productos sintéticos para producir emulsiones de aceite/agua y/o agua/aceite.

15 Se pueden formular organogeles hidrófilos, por ejemplo, a base de polietilenglicoles de alta masa molecular. Estas formas de tipo gel son lavables. La vaselina, las ceras naturales o sintéticas, los ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, como mono-, di- o triglicéridos, aceite de parafina o aceites vegetales, aceites de ricino o aceite de coco endurecidos, grasa de cerdo, grasas sintéticas, por ejemplo a base de ácido acrílico, caprílico, láurico y estárico, tal como por ejemplo Softisan® o mezclas de triglicéridos tal como Miglyol® se emplean como lípidos en forma de grasa y/o aceite y/o componentes de tipo cera para producir ungüentos, cremas o emulsiones.

20 Para ajustar el valor del pH se utilizan los ácidos y las bases osmóticamente eficaces, tales como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido cítrico, solución de hidróxido de sodio, solución de hidróxido de potasio, carbonato de monosodio, otros sistemas tamponantes, tales como por ejemplo citrato, fosfato, tampón Tris o trietanolamina. Para incrementar la estabilidad se pueden añadir conservantes tal como, por ejemplo, benzoato de metilo o de propilo (parabenos) o el ácido sórbico.

25 Las pastas, polvos o soluciones se deben mencionar como otras formas de aplicación tópica. Las pastas a menudo contienen agentes auxiliares lipófilos e hidrófilos con cantidades muy altas de materia grasa como base para dar consistencia. Los polvos o los polvos aplicables por vía tópica pueden contener, por ejemplo, variedades de almidón tales como almidón de trigo o arroz, dióxido de silicón o sílice apagallamas, que también sirven como diluyentes, para incrementar la fluidez así como la lubricidad y también para impedir que se formen aglomerados.

30 Las gotas nasales o pulverizadores nasales sirven como formas de aplicación nasal. En este sentido, pueden utilizarse los nebulizadores o cremas o ungüentos nasales.

35 Además, los pulverizadores nasales o las formulaciones de polvo seco así como los aerosoles de dosificación controlada también son adecuados para la administración sistémica de los compuestos de la presente invención.

40 Estos aerosoles con dosis controlada y/o por presión y formulaciones de polvo seco pueden inhalarse y/o insuflarse. Las formas de administración de este tipo desde luego que también tienen importancia para la aplicación directa y regional en el pulmón o los bronquios y la laringe. En consecuencia, las composiciones de polvo seco se pueden formular, por ejemplo, como microesferas blandas con los compuestos de la invención, como una mezcla de microesferas con los compuestos de la invención con los vehículos adecuados, tales como por ejemplo lactosa y/o glucosa. Para la inhalación o insuflación, los aplicadores habituales que son adecuados son los adecuados para el tratamiento de la nariz, boca y/o faringe. Los compuestos de la presente invención también pueden aplicarse por medio de un dispositivo nebulizador ultrasónico. Como gas propelente para las formulaciones de pulverizador en aerosol y/o aerosoles de dosificación controlada, son adecuados el tetrafluoroetano o HFC 134a y/o el heptafluoropropano o HFC 227, en donde se pueden preferir los hidrocarburos sin fluorar u otros propelentes que son gaseosos a la presión normal y la temperatura ambiente, tal como por ejemplo propano, butano o dimetiléter. En vez de aerosoles de dosificación controlada, también pueden utilizarse los sistemas manuales con bomba libres de propelentes.

45 Los aerosoles con gas propelente también pueden contener convenientemente adyuvantes tensioactivos, tales como por ejemplo miristato de isopropilo, éster de ácido graso con polioxietilensorbitano, trioleato de sorbitano, lecitinas o lecitina de soja.

50 Además, cuando la composición farmacéutica comprende un ácido nucleico para el uso en la invención para la administración a determinadas especies de animales, el ácido nucleico para uso en la invención procede preferiblemente de esa especie. Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica se debe administrar a humanos, el ácido nucleico de la sustancia farmacéutica preferiblemente comprende la forma soluble de la proteína CD83

humana o un derivado de la misma.

Los ácidos nucleicos para el uso en la invención pueden administrarse junto con agentes que incrementan la permeabilidad de la membrana celular y/o la captación celular de los ácidos nucleicos. Ejemplos de estos agentes son las poliaminas como se describe, por ejemplo, en Antony T. et al. (1999) *Biochemistry* 38: 10775-10784; poliaminas ramificadas como se describe, por ejemplo, en Escriou, V. et al. (1998) *Biochem. Biophys. Acta* 1368(2): 276-288; poliaminolípidos como los que se describen, por ejemplo, en Guy-Caffey, J. K. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270(52): 31391-31396; DOTMA como se describe en Feigner, P. L. et al. (1987) *PNAS USA* 84 (21): 7413-7417 y porfirinas catiónicas como se describe, por ejemplo, en Benimetskaya, L. et al. (1988) *NAR* 26(23): 5310-5317.

La CD83 soluble anteriormente definida es adecuada para preparar anticuerpos (policlonales o monoclonales) contra CD83. Los anticuerpos se pueden preparar según métodos estándar conocidos en la técnica. Estos anticuerpos son útiles específicamente en métodos de ensayo para determinar enfermedades correlacionadas con un presencia aumentada de la proteína CD83 soluble en el suero del paciente, preferiblemente el método para determinar en un paciente tumores, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, etc., incluyendo leucemia de linfocitos B.

Empleando un ensayo Elisa se detectó CD83 soluble a una concentración de aproximadamente 0,25 ng/ml (+/- 0,25 ng/ml) en individuos sanos. Sorprendentemente, en pacientes con tumores se detectaron concentraciones de hasta 15 ng/ml. Así, este ensayo podría tener valor tanto para diagnóstico como para pronóstico en pacientes con tumores. Y también para pacientes que padezcan trastornos autoinmunes, alergias e infecciones virales, bacterianas y/o parasitarias.

A continuación se describen más detalladamente diferentes aspectos de la invención por medio de ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión recombinante en *Escherichia coli* del dominio extracelular de la CD83 humana.

Utilizando de plantilla un clon de ADNc humano de longitud completa se amplificó por PCR el dominio extracelular de CD83 (condiciones de la PCR: 1 ciclo de 1 min a 94 °C; 30 ciclos, en donde cada uno consiste en 1 min a 94 °C para la «desnaturalización», 1 min a 64 °C para la «hibridación», 1 min a 72 °C para la «extensión») con los siguientes cebadores de PCR: 5'-TCCCCGGGAACGCCGGAGGTGAAGGTGGCT-3' (SEQ ID n.º 5) 5'-AATTAGAATTCTCAAATCTCCGCTCTGTATT-3' (SEQ ID n.º 6).

El fragmento de ADNc amplificado se clonó entre los sitios SmaI y EcoRI del vector de expresión pGEX2T (Amersham Pharmacia Biotech, Friburgo, Alemania), lo que dio lugar al plásmido pGEX2ThCD83ext y este plásmido se introdujo por transformación en la cepa de *E. coli* TOP10F' [F{lacI^qTn10 (Tet^R) mcrA Δ(mrr- hsd RMS-mcrBC) Φ 80 lacZ, ΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG] (Invitrogen, Groningen, Países Bajos). La secuencia nucleotídica correcta de pGEX2ThCD83ext se verificó por secuenciación. La CD83 extracelular se expresó como una proteína de fusión que contiene la glutatión S-transferasa como compañero de fusión en el extremo amino. Se insertó un sitio de reconocimiento para la escisión por la trombina entre la GST y el dominio extracelular de CD83 (véase la figura 1).

Ejemplo 2: Purificación de la CD83ext humana recombinante

Cultivo:

Un cultivo bacteriano de una noche de la bacteria mencionada anteriormente se diluyó 1:10 en el medio LB nuevo (complementado con ampicilina a 100 µg/ml) y se hizo crecer a una densidad óptica de 1,0. Se añadió el IPTG (concentración final de 1 mM) y se continuó con el cultivo durante una hora más. Las células se sedimentaron, se resuspendieron en 10 ml de tampón nativo (NaCl a 140 mM, KCl a 2,7 mM, Na₂HPO₄ a 10 mM, KH₂PO₄ a 1,8 mM, MnCl₂ a 2,6 mM, MgCl₂ a 26 mM, leupeptina a 1 µg/ml, aprotinina a 1 µg/ml, ADNasa I a 1 µg/ml, pH 7,6) por cultivo de 500 ml y se le añadió lisozima a 50 µg/ml. Después de una incubación de 15 min en hielo, se centrifugó el lisado a 20.000 x g.

Etapas de captura:

Se añadieron 40 ml del sobrenadante a una columna de 5 ml de GSTrap en un sistema ÄKTA Explorer 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) que se equilibró previamente con 4 volúmenes de columna del tampón de fijación: PBS (solución salina tamponada con fosfato), pH 7,6. A continuación se lavó la columna con 12 volúmenes de columna del mismo tampón de fijación y posteriormente se eluyó con 5 volúmenes de columna del tampón de elución: Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0 con glutatión reducido a 5 mM a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Entonces se trató la columna con 5 volúmenes de columna de NaCl a 2 M/PBS, pH 7,6 y 5 volúmenes de columna del tampón de fijación (figura 2A).

Etapas de purificación intermedias:

Las fracciones que contienen la GST-CD83ext se dializaron frente a 1-metil-piperazina (Sigma) a 50 mM, Bis-Tris (Sigma) a 50 mM, Tris (Sigma) a 25 mM, pH 9,5 (tampón A) y se cargaron en una columna de intercambio aniónico 15Q PE 4.6/100 (Amersham Pharmacia Biotech) en un sistema ÄKTA Explorer 10 (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas se separaron mediante 3 gradientes salinos lineales diferentes: 16 volúmenes de columna a una concentración esperada del tampón B al 10% (tampón A/NaCl a 1 M); 20 volúmenes de columna a una concentración esperada del tampón B al 50% y 10 volúmenes de columna a una concentración esperada del tampón B al 100% (véase la figura 2B).

- 5
- 10
- Las fracciones con la GST-CD83ext se dializaron frente a PBS, pH 7,6. A continuación, la proteína de fusión GST-hCD83ext se incubó con trombina (20 U/ml) en una matriz de glutatión-Sepharose a 22 °C durante 16 h. Para separar la proteína hCD83ext de GST, esta solución se cargó en columnas de glutatión-Sepharose 4B empacadas previamente en las mismas condiciones de tampón que en la etapa de captura. Las fracciones con la proteína CD83ext humana recombinante se recogieron directamente en las condiciones del tampón de fijación. Los resultados se muestran en la figura 2C.

Etapa de acabado final:

- 15
- Finalmente se realizó una separación de filtración en gel preparativa en la que dicha fracción eluida se depositó en una columna Superdex 200 (26/16) de calidad prep (Amersham Pharmacia Biotech) en un sistema ÄKTA Explorer 10 (Amersham Pharmacia Biotech) con tampón de elución de PBS, pH 7,6, a una velocidad de flujo de 3 ml/min.

Las fracciones correctas se analizaron por tinción con plata, tinción de coomassie y análisis de inmunotransferencia con anti-CD83 (Coulter-Immunotech, Marsella, Francia) (véase la figura 2D).

- 20
- Liofilización de la CD83 soluble recombinante:

El dominio soluble de la CD83 recombinante que había sido purificado por HPLC se dializó frente a una dilución de 1:20 de DPBS (BioWhittaker Europe). A continuación, esta solución de proteína se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 4 h en un dispositivo de liofilización α 1-2 LD (Christ). La proteína se volvió disolver con ddH₂O filtrada por 0,22 μ m en un volumen de concentración final de DPBS a 1x.

- 25
- El análisis por SDS-PAGE reveló que se observaba que la proteína recombinante liofilizada no se degradaba tras este procedimiento, y que de hecho era comparable a la proteína sin liofilizar (figura 2E).

Ejemplo 3: Inhibición de la maduración de las células dendríticas, del agrupamiento de células *in vitro* y de los experimentos (con humano) por MRL

Cultivo:

- 30
- A menos que se mencione otra cosa, todas las células se cultivaron en un medio estándar (medio con plasma humano al 1%) que consistía en RPMI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) complementado con glutamina (200 μ g/ml) (BioWhittaker, Verviers, Bélgica), penicilina/estreptomicina (20 μ g/ml), HEPES a 10 mM, pH 7,5 (Sigma-Aldrich) y plasma humano inactivado por calor (56 °C; 30 min) al 1% de un único donante obtenido del Departamento de Transfusiones Médicas, Eriangen, Alemania.

- 35
- Generación de células dendríticas:

Se aislaron células mononucleadas de la sangre periférica a partir de capas de leucocitos por sedimentación en Ficoll-hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Friburgo, Alemania) y se dispusieron en placas de cultivo de 100 mm revestidas con IgG (10 μ g/ml de la γ -globulina de la fracción de Cohn; Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5%. Tras incubaciones de 1 y 7 h, se recogieron las fracciones celulares no adherentes, y las células adherentes se cultivaron adicionalmente en medio con plasma humano al 1% complementado con las citocinas GM-CSF (800 U/ml) e IL-4 (500 U/ml). El medio nuevo con GM-CSF a una concentración final de 400 U/ml e IL-4 (500 U/ml) se añadió el día 3 del periodo de incubación. Las células no adherentes se recogieron al día 4 o 5, se contaron y se transfirieron a placas nuevas a una densidad de 0,3-0,5 x 10⁵ células/ml. Para la maduración final de las células dendríticas, el medio con plasma humano al 1% se complementó con TNF- α (1,25 ng/ml), GM-CSF (40 U/ml), IL-4 (200 U/ml), prostaglandina E₂ (0,5 μ g/ml) (Lechmann, M. et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194: 1813-1821).

- 45
- La hCD83ext soluble inhibe la maduración de las células dendríticas inmaduras:

Para analizar la influencia de hCD83ext sobre el fenotipo de las células dendríticas, el día 8 se realizó el análisis por FACS (véase la figura 3). Las células dendríticas se pueden hacer madurar completamente con el uso de un cóctel de maduración específico compuesto por IL-1 β , TNF- α y PGE₂ (figura 3a). Es interesante que cuando este cóctel de maduración se administró el día 5 a las células dendríticas inmaduras junto con la hCD83ext (4 μ g/ml) y se dejó hasta el análisis por FACS final el día 8, estas células revelaron una reducción manifiesta de la expresión de CD80 (del 96 al 66%) y de CD83 (del 96 al 30%) en la superficie celular (figura 3c), cuando se compararon con las células dendríticas maduras con normalidad (figura 3a). Así pues, la hCD83ext induce una reducción de la maduración de las células dendríticas (véase también el incremento de células positivas CD14). En cambio, las células dendríticas

- 50

5 maduras que se incubaron con hCD83 durante 24 horas el día 7 y se analizaron el día 8 sólo presentaron una alteración mínima de la expresión de CD80 (del 96 al 92%), mientras que también se redujo la expresión de CD83 (del 96 al 66%) (figura 3b). Es interesante que la expresión de CD86 no estuviera influida en ningún punto del tiempo por la administración de hCD83ext. Tampoco resultó afectada la expresión del CMH de clase I y II, ni en las células dendríticas maduras ni en las inmaduras (Lechmann, M. et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194: 1813-1821) (véase la figura 3).

MLR alógena:

10 Los linfocitos T CD4+ y CD84+ se aislaron a partir de capas de leucocitos (las fracciones de células no adherentes recogidas se incubaron con eritrocitos de oveja tratados con neuramidasa, se recogieron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll y se cultivaron en RPMI, complementado con suero humano al 5% de un único donante AB) y se estimularon con diferentes proporciones de células dendríticas alógenas maduras. Las células se dejaron sin tratar o se incubaron con diferentes concentraciones de hCD83ext o con SAB (Biorad) como control. Los linfocitos T (2×10^5 /pocillo) y las células dendríticas se cocultivaron durante 4 días en 200 μ l de RPMI, complementado con suero humano al 5% de un solo donante AB en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Las células recibieron un pulso con [³H]-timidina (1 μ Ci/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech) durante 16 h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron en FilterMate® de fibra de vidrio con un recolector IH-110 (Inotech, Dottikon, Suiza) y los filtros se contaron en un contador de microplacas 1450 (Wallac, Turku, Finlandia) (Lechmann, M. et al., (2001) *J. Exp. Med.* 194: 1813-1821).

15 Una característica típica de estos análisis por MLR es la formación de grandes agrupamientos de células dendríticas y linfocitos T. La adición de hCD83ext el día 1 inhibió fuertemente la típica formación de agrupamientos celulares de células dendríticas y linfocitos T en proliferación (Lechmann, M. et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194: 1813-1821).

20 Además, las células dendríticas maduras tratadas con la hCD83ext soluble ven inhibida, de una manera dependiente de la concentración, su capacidad para estimular los linfocitos T. Así pues, los linfocitos T ya no proliferan más (véase la figura 4).

Ejemplo 4: Agrupamiento de células *in vitro* y experimentos (con ratones) por MLR

25 Los ratones C57/BL6 macho o hembra y los ratones BALB/C (Charles River, Wiga, Sulzfeld, Alemania) se utilizaron con una edad entre 1 y 4 meses.

Generación de médula ósea-células dendríticas:

30 La generación de médula ósea-células dendríticas a partir de ratones C67/BL6 se realizó exactamente como está descrito (*J. Immunol. Methods* 223: 77, 1999). El RPMI 1640 (Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) se complementó con penicilina a 100 U/ml (Sigma), estreptomycin a 100 μ g/ml (Sigma), L-glutamina (Sigma) a 2 mM, ME (Sigma) a 50 μ g/ml, STF filtrado e inactivado con calor al 10% (PAA, Cölbe, Alemania). Se utilizó GM-CSF a 200 U/ml (PrepoTech/Tebu, Rocky Hill, NJ) los días 0, 3, 6, y 8 del periodo de incubación.

MLR alógena:

35 Los linfocitos T CD4+ y CD8+ se aislaron de los ganglios linfáticos inguinales y mesenquimatosos de ratones BALB/C y se utilizaron para la MLR alógena. Estos linfocitos T (2×10^5 células/pocillo) y médula ósea-células dendríticas del día 9 (a diferentes proporciones) se cocultivaron durante 3 días en 200 μ l de RPMI 1640 complementado con penicilina a 100 U/ml, estreptomycin a 100 μ g/ml, L-glutamina a 2 mM, ME a 50 μ g/ml, STF filtrado e inactivado con calor al 10% en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Las células recibieron un pulso con [³H]-timidina (1 μ Ci/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech) durante 16 h. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron en FilterMate® de fibra de vidrio con un recolector IH-110 (Inotech, Dottikon, Suiza) y los filtros se contaron en un contador de microplacas 1450 (Wallac, Turku, Finlandia).

40 La formación de agrupamientos entre células dendríticas de ratón y linfocitos T de ratón fue inhibida por la hCD83ext humana soluble. Además, las células dendríticas murinas tratadas con la hCD83ext humana soluble vieron inhibida, de una forma dependiente de la concentración, su capacidad para estimular los linfocitos T. Por lo tanto, los linfocitos T ya no proliferan más (véase la figura 5A).

Actividad biológica de la CD83 recombinante liofilizada:

45 La actividad biológica de la proteína liofilizada se determinó mediante su actividad inhibidora en un análisis de la reacción linfocítica mixta como está descrito más arriba. La proteína inhibe la estimulación de los linfocitos T mediada por las células dendríticas de una manera dependiente de la dosis, igual que la proteína sin liofilizar (véase la figura 5B). Así pues, la CD83 soluble recombinante es estable tras la liofilización y mantiene su actividad biológica. Se observó un efecto similar en un sistema humano (no se muestran los datos).

Ejemplo 5: Inhibición de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE)

La EAE es el modelo estándar para la esclerosis múltiple. Se indujo la EAE en los ratones inyectándoles por vía

subcutánea en ambos muslos 50 µl de una suspensión que contiene adyuvante de Freundsch completo (AFC) y glucoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG₃₅₋₅₅) el día 0. El mismo día se les inyectó por vía intraperitoneal 100 µl de la toxina pertúsica (2 µg/ml). El día 2 se les administró una segunda dosis de la toxina pertúsica. Aparecieron signos clínicos de parálisis entre los días 10 y 14.

5 Inhibición de la EAE en un modelo *in vivo*:

Para analizar la capacidad de hCD83ext para prevenir y suprimir la parálisis asociada a la EAE, se administraron 100 µl de hCD83 (1 µg/1 µl) mediante inyección los días -1, 1 y 3 (véase la figura 6A). Como control, un grupo de ratones recibió una inyección con 100 µl de SAB (1 µg/1 µl). Un tercer grupo de ratones se dejó sin tratar. En los tres grupos de ratones se indujo la EAE el día 0. Sorprendentemente, la hCD83ext casi inhibió completamente la parálisis asociada a la EAE.

10 Efecto duradero de la inhibición de la EAE:

Se demostró que incluso cuando se induce la EAE una segunda vez, los ratones tratados con la CD83 todavía están protegidos (tres dosis de CD83 soluble protegen a los ratones de la EAE).

La EAE se indujo como está descrito más arriba: se inyectaron (i.p.) 100 µg de hCD83 (o SAB como control) los días -1, 1 y 3. La EAE se indujo el día 0 mediante inyección subcutánea (s.c.) del péptido MOG emulsionado en AFC enriquecido con *M. tuberculosis*. Además, se les administraron (i.p.) 200 ng de la toxina pertúsica (Pt) los días 0 y 2. La hCD83 inhibió casi completamente la parálisis, mientras que los ratones tratados con SAB y sin tratar desarrollaron fuertes síntomas de la enfermedad (véase la figura 6B; 1.EAE, panel izquierdo). El día 28 se indujo la EAE una segunda vez por inmunización de los ratones con el péptido MOG tal y como está descrito más arriba. Sorprendentemente, sólo estaban completamente protegidos los ratones que habían sido tratados tres veces con la CD83 soluble, mientras que los ratones tratados con la SAB y los ratones sin tratar estaban paralizados (véase la figura 6B; 2.EAE, panel derecho).

15 Inhibición de la EAE en una aplicación terapéutica:

La EAE se indujo el día 0 tal y como está descrito más arriba mediante inyección subcutánea (s.c.) del péptido MOG emulsionado en AFC enriquecido con *M. tuberculosis*. Además, se administraron (i.p.) 200 ng de la toxina pertúsica (Pt) los días 0 y el 2. La hCD83ext (100 µg/dosis) se administró 14 veces, en días alternos, desde el día 3 en adelante. Incluso en esta situación terapéutica, la CD83 soluble fue capaz de influir fuertemente en los síntomas de la EAE. La SAB (100 µg/dosis) se utilizó como control negativo (véase la figura 6C).

20 **Ejemplo 6: Producción de anticuerpos monoclonales contra la CD83 humana**

Aproximadamente 50 µg de la proteína de fusión GST-hCD83ext se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) y por vía subcutánea (s.c.) en las ratas LOU/C. Tras un intervalo de 2 meses, se administró i. p. y s.c. un refuerzo final con el antígeno 3 días antes de la fusión. La fusión de la línea celular de mieloma P3X63-Ag8.653 con células inmunitarias del bazo de rata se realizó de acuerdo con el procedimiento estándar. Se analizaron los sobrenadantes de los hibridomas en un inmunoensayo de fase sólida con la proteína GST-hCD83ext adsorbida a las placas de microtitulación de poliestireno. Tras la incubación con sobrenadantes de cultivo durante 1 hora, los anticuerpos monoclonales fijados se detectaron con anticuerpos IgG+IgM antirrata de cabra marcados con peroxidasa (Dianova, Hamburgo, Alemania) y *o*-fenilendiamina como cromógeno en la reacción de la peroxidasa. Una proteína de fusión irrelevante con GST sirvió de control negativo. El isotipo de la inmunoglobulina de los anticuerpos monoclonales se determinó con anticuerpos monoclonales antirrata biotinilados específicos de la subclase de inmunoglobulina (IgG) (ATCC, Rockville, MD). Los CD83-1G11 (IgG1 de rata) y CD83-4B5 (IgG2a de rata) se utilizaron para el análisis de inmunotransferencia y el análisis por FACS.

25 **Ejemplo 7: Determinación de la CD83 soluble en los pacientes**

Con un análisis por ELISA se detectó la CD83 soluble a una concentración de aproximadamente 0,25 ng/ml (\pm 0,25 ng/ml) en los individuos sanos. Sorprendentemente, en los pacientes con tumores, se detectó una concentración de hasta 15 ng/ml. Así pues, este ensayo podría tener valor diagnóstico y pronóstico para los pacientes con tumores.

30 **Ejemplo 8: hCD83ext es una proteína homodimérica mantenida por puentes disulfuro**

La proteína CD83ext humana recombinante purificada por HPLC (la clonación y la expresión están descritas en el ejemplo 1, y la purificación está descrita en el ejemplo 2) se analizó con el sistema SDS-PAGE de Laemmli. Para identificar las posibles formas oligoméricas de CD83 se ha omitido el 2-mercaptoetanol (ME) del tampón de muestra (SDS al 2%, 2-mercaptoetanol (ME) al 5%, glicerol al 10%, EDTA a 0,2 mM, azul de bromofenol al 0,005%, Tris a 62,5 mM, pH 6,8). En ausencia de este reductor, los puentes disulfuro intra- y intercatenarios de CD83 permanecen intactos. Las muestras de proteínas reducidas y sin reducir se incubaron durante 5 min a 95 °C y se compararon entre sí por SDS-PAGE (véase la figura 7). Durante la electroforesis, la movilidad de las proteínas oligoméricas en SDS es menor que la de sus componentes polipeptídicos totalmente desnaturalizados en SDS. Sin ME, aparece una

banda superior del tamaño estimado de un dímero de CD83 (aproximadamente 25 kDa), mientras que la banda de CD83 monomérica (aproximadamente 14 kDa) es tenue. El análisis de inmunotransferencia con el anticuerpo CD83-1G11 anti-CD83 (Lechmann et al., *Protein Expression and Purification* 24: 445-452 (2 de marzo de 2002)) confirmó la especificidad de las bandas de proteína. Por lo tanto, la hCD83ext es una proteína homodimérica mantenida por puentes disulfuro.

La actividad inhibidora del aislado de la proteína homodimérica mantenida por puentes disulfuro se determinó en los experimentos por MLR descritos en los ejemplos 3 y 4. Se encontró que la actividad inhibidora del homodímero aislado era idéntica a la descrita en los ejemplos 3 y 4.

Ejemplo 9: Generación de una forma mutante de la CD83 soluble

Clonación del mutante de Cys a Ser en la posición 129 de hCD83ext en *Escherichia coli*

El dominio extracelular mutante de la CD83 humana (aminoácidos 20 a 145) se amplificó por PCR con el conjunto siguiente de cebadores:

sentido-pGEX2ThCD83: 5'-TCCCCCGGG AACGCCGAG GTGAAGGTGG CT-3' y antisentido-
CD83extra_mutantCtoS: 5'-
AATTAGAATT CTCAAATCTCGCTCTGTAT TTCTTAAAG TCTCTTCTTT ACGCTGTGCAG GGGAT-3'

(MWG-Biotech AG; SEQ ID n.º 11 y 12, respectivamente). El cebador antisentido inserta una transversión de nucleótido de g a c que conduce a un cambio de aminoácido de cisteína a serina en la posición 129 de los aminoácidos (véase la figura 8). Las condiciones de la PCR fueron: etapa de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, 31 ciclos: desnaturalización de 1 min a 94 °C, hibridación de 1 min a 61 °C, elongación de 2 min a 72 °C; y una etapa final de elongación de 10 min a 72 °C. El fragmento de ADNc amplificado se subclonó en los sitios SmaI y EcoRI del vector de expresión pGEX2T (Amersham, Pharmacia Biotech), lo que da lugar al plásmido pGEX2ThCD83ext_mut129_CtoS y se introdujo por transformación en la cepa de *E. coli* TOPO10 (Invitrogen). Se verificó por secuenciación que la secuencia de nucleótidos era la correcta.

Expresión recombinante de la proteína mutante hCD83ext_mut129_CtoS en *Escherichia coli*

La expresión y purificación del mutante de hCD83ext se realizó tal y como está descrito más arriba para la proteína hCD83ext recombinante:

Un cultivo bacteriano de una noche se diluyó 1:10 en medio LB nuevo (complementado con 100 µg/ml de ampicilina). A una densidad óptica de 0,9 se le añadió IPTG a 1 mM y se continuó con el cultivo durante 1 h más. A continuación se sedimentaron las células y se resuspendieron en 10 ml de tampón nativo (NaCl a 140 mM, KCl a 2,7 mM, Na₂HPO₄ a 10 mM, KH₂PO₄ a 1,8 mM, MnCl a 2,6 mM, MgCl₂ a 26 mM, 1 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de ADNasa I, pH 7,6) por 500 ml de cultivo. También se añadieron 50 µg/ml de lisozima. Tras la incubación de 15 min en hielo, se centrifugó el lisado a 20.000 g. Purificación de la proteína: etapa de captura: se depositaron 40 ml del sobrenadante en una columna de 5 ml GSTrap en un sistema ÄKTA Explorer 10 (Amersham Pharmacia Biotech). Tampón de fijación: PBS (NaCl a 140 mM, KCl a 2,7 mM, Na₂HPO₄ a 10 mM, KH₂PO₄ a 1,8 mM, pH 7,6). Tampón de elución: Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0 con glutatión reducido a 5 mM. Velocidad del flujo: 5 ml. Procedimiento cromatográfico: 4 VC (volúmenes de columna) de tampón de fijación, 40 ml de sobrenadante, 12 VC de tampón de fijación, 5 VC de tampón de elución, 5 VC de NaCl a 2 N/PBS, pH 7,6, 5 VC de tampón de fijación. Luego, la proteína de fusión GST-hCD83ext se incubó 16 h con trombina (20 U/ml) a 22 °C. Para separar la proteína hCD83ext de la GST, se cargó de nuevo la elución en una columna de 5 ml GSTrap con las condiciones del tampón de la etapa de captura. El eluido con la proteína CD83ext humana recombinante se recogió en las condiciones del tampón de fijación.

La hCD83ext_mut129_CtoS purificada se comparó con la hCD83ext purificada por SDS-PAGE (véase la figura 9). En condiciones reductoras y no reductoras, la forma mutante de CD83 mostró una banda monomérica estable a 14 kDa. Esta banda es similar a la proteína de tipo silvestre de hCD83ext en condiciones reductoras. En condiciones no reductoras no se pudo detectar ningún dímero de CD83 con la proteína mutante de CD83. Por lo tanto, se necesita la 5.^a cisteína carboxiterminal del dominio extracelular de CD83 para la creación de homodímeros. El análisis de inmunotransferencia confirmó la especificidad de las bandas (no se muestran los datos).

La actividad inhibidora de hCD83ext_mut129_CtoS que se ensayó como en los experimentos por MLR descritos en los ejemplos 3 y 4 fue similar a la del compuesto analizado en los ejemplos 3 y 4.

Ejemplo 10: La CD83 soluble inhibe la proliferación de los esplenocitos.

Inhibición de la proliferación de los esplenocitos:

Después de 30 o, alternativamente, 60 días de la inmunización de los ratones con MOG, se retiraron los bazos para los ensayos de reestimulación. Las células se cultivaron en medio HL-1 sin suero complementado con penicilina (100 U/ml, Sigma), estreptomycin (100 µg/ml, Sigma), L-glutamina (2 mM, Sigma) y 2-mercaptoetanol (50 µM,

5 Sigma). Las células específicas contra MOG se analizaron por incubación de 4×10^5 esplenocitos con diferentes concentraciones del péptido MOG en 200 μ l de HL1/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Adicionalmente, como control, se estimularon 4×10^5 esplenocitos con la IL-2 (500 U/ml, Proleukin). Como control negativo se utilizaron cultivos sin estimular. Trascorridas 72 horas, los cultivos se recibieron un pulso de [³H]-timidina (0,4 Ci/mmol, Amersham TRA-20). Doce horas después se midió la incorporación de la timidina con un contador de microplacas (Wallac).

10 Los esplenocitos procedentes de los ratones tratados con hCD83ext redujeron claramente la proliferación (véase la figura 10A). Adicionalmente, como control, se estimularon 4×10^5 esplenocitos con la IL-2 (500 U/ml). De igual forma, las células tratadas con hCD83ext todavía son capaces de proliferar en respuesta a la IL-2 (véase la figura 10A, inserto a la derecha). Estos datos demuestran con claridad que la proliferación de los esplenocitos está reducida en los ratones tratados con CD83, aunque se pueden volver a estimular con la IL-2. Por lo tanto, no están muertos.

15 La reestimulación de los esplenocitos procedentes de ratones tratados con hCD83ext, con SAB o sin tratar, en donde la EAE se indujo dos veces (véase la figura 10B). Los ratones tratados con hCD83ext mostraron una ligera reducción de la capacidad de proliferación. Sin embargo, mientras que los ratones tratados con SAB y los ratones sin tratar siguen proliferando fuertemente en respuesta a la IL-2, las células tratadas con la hCD83ext proliferan menos en respuesta a la IL-2 (véase la figura 10B, inserto a la derecha).

Estos datos demuestran con claridad que la proliferación de los esplenocitos está reducida en los ratones tratados con la CD83.

20 **Ejemplo 11: la CD83 soluble inhibe la producción de las citocinas en los esplenocitos**

25 A los esplenocitos recogidos que se estimularon con diferentes concentraciones del péptido MOG (tal y como está descrito en el ejemplo 10), se les examinó su producción de citocinas *ex vivo*. Los sobrenadantes del cultivo se tomaron tras 96 horas y se analizaron con los kits de ELISA de sándwich disponibles comercialmente para INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 (BD Biosciences). Las células tratadas con hCD83ext (tras la primera inducción de la EAE) tenían fuertemente inhibida la producción del INF- γ (véase la figura 11A). También estaba reducida con claridad la producción de IL-10. La producción de la IL-2 y de la IL-4 no se había visto considerablemente alterada. Estos datos demuestran con claridad que la CD83 soluble conduce a una reducción de la producción de citocinas en los animales tratados.

30 La producción de las citocinas desde los esplenocitos se determinó también en los esplenocitos procedentes de animales en donde la EAE se indujo dos veces (véase la figura 11B). La producción del INF- γ está fuertemente inhibida. Lo mismo ocurre con la producción de la IL-10. La producción de la IL-2 no se ve muy alterada. Hay cierta producción de IL-4 en las células tratadas con SAB y sin tratar, aunque los valores son muy bajos y están cercanos al límite de detección. De nuevo, estos datos demuestran claramente que la CD83 soluble conduce a una reducción de la producción de citocinas en los animales en los que se ha inducido la EAE una segunda vez.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Steinkasserer, Alexander

5 <120> Uso de formas solubles de CD83 y ácidos nucleicos que las codifican para el tratamiento o prevención de enfermedades

<130> 032723woJH

10 <140>
<141>

<160> 12

15 <170> PatentIn Versión 2.1

<210> 1
<211> 618
<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(615)

25 <400> 1

atg tgc cgc ggc ctc cag ctt ctg ctc ctg agc tgc gcc tac agc ctg	48
Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu	
1 5 10 15	
gct ccc gcg acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac	96
Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp	
20 25 30	
ttg ccc tgc acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc	144
Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser	
35 40 45	
tgg gtc aag tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag	192
Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln	
50 55 60	
gaa gac cac ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt	240
Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly	
65 70 75 80	
tct ttc gac gcc ccc aat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac	288
Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn	
85 90 95	
act acc agc tgc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg	336
Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro	
100 105 110	
gat ggg cag aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga	384
Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly	
115 120 125	
tgc cct gca cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag	432
Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu	
130 135 140	
att gtc ctg ctg ctg gct ctg gtt att ttc tac tta aca ctc atc att	480
Ile Val Leu Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile	
145 150 155 160	

ttc act tgt aag ttt gca cgg cta cag agt atc ttc cca gat ttt tct 528
 Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser
 165 170 175

aaa gct ggc atg gaa cga gct ttt ctc cca gtt acc tcc cca aat aag 576
 Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys
 180 185 190

cat tta ggg cta gtg act cct cac aag aca gaa ctg gta tga 618
 His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val
 195 200 205

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

5

<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

10

<210> 3
 <211> 2051
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<220>

<221> CDS
 <222> (14)..(601)

<400> 3

5

```

gcgctccagc cgc atg tcg caa ggc ctc cag ctc ctg ttt cta ggc tgc 49
      Met Ser Gln Gly Leu Gln Leu Leu Phe Leu Gly Cys
      1 5 10

gcc tgc agc ctg gca ccc gcg atg gcg atg cgg gag gtg acg gtg gct 97
Ala Cys Ser Leu Ala Pro Ala Met Ala Met Arg Glu Val Thr Val Ala
      15 20 25

tgc tcc gag acc gcc gac ttg cct tgc aca gcg ccc tgg gac ccg cag 145
Cys Ser Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln
      30 35 40

ctc tcc tat gca gtg tcc tgg gcc aag gtc tcc gag agt ggc act gag 193
Leu Ser Tyr Ala Val Ser Trp Ala Lys Val Ser Glu Ser Gly Thr Glu
      45 50 55 60

agt gtg gag ctc ccg gag agc aag caa aac agc tcc ttc gag gcc ccc 241
Ser Val Glu Leu Pro Glu Ser Lys Gln Asn Ser Ser Phe Glu Ala Pro
      65 70 75

agg aga agg gcc tat tcc ctg acg atc caa aac act acc atc tgc agc 289
Arg Arg Arg Ala Tyr Ser Leu Thr Ile Gln Asn Thr Thr Ile Cys Ser
      80 85 90

tcg ggc acc tac agg tgt gcc ctg cag gag ctc gga ggg cag cgc aac 337
Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Ala Leu Gln Glu Leu Gly Gly Gln Arg Asn
      95 100 105

ttg agc gcc acc gtg gtt ctg aag gtg aca gga tgc ccc aag gaa gct 385
Leu Ser Gly Thr Val Val Leu Lys Val Thr Gly Cys Pro Lys Glu Ala
      110 115 120

aca gag tca act ttc agg aag tac agg gca gaa gct gtg ttg ctc ttc 433
Thr Glu Ser Thr Phe Arg Lys Tyr Arg Ala Glu Ala Val Leu Leu Phe
      125 130 135 140

tct ctg gtt gtt ttc tac ctg aca ctc atc att ttc acc tgc aaa ttt 481
Ser Leu Val Val Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe
      145 150 155

gca cga cta caa agc att ttc cca gat att tct aaa cct ggt acg gaa 529
Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Ile Ser Lys Pro Gly Thr Glu
      160 165 170

caa gct ttt ctt cca gtc acc tcc cca agc aaa cat ttg ggg cca gtg 577
Gln Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Ser Lys His Leu Gly Pro Val
      175 180 185

acc ctt cct aag aca gaa acg gta tgagtaggat ctccactggt ttttacaag 631
Thr Leu Pro Lys Thr Glu Thr Val
      190 195

ccaagggcac atcagatcag tgtgcctgaa tgccaccg acaagagaag aatgagctcc 691
    
```

atcctcagat ggcaaccttt ctttgaagtc cttcacctga cagtgggctc cacactactc 751
 cctgacacag ggtcttgagc accatcatat gatcacgaag catggagtat caccgcttct 811
 ctgtggctgt cagcttaatg tttcatgtgg ctatctggtc aacctcgtga gtgcttttca 871
 gtcacttaca agctatggtg agatgcaggt gaagcagggt catgggaaat ttgaacactc 931
 tgagctggcc ctgtgacaga ctctgagga cagctgtcct ctctacatc tgggatacat 991
 ctctttgaat ttgtcctggt tcgttgacc agcccagatg tctcacatct ggcggaaatt 1051
 gacaggccaa gctgtgagcc agtgggaaat atttagcaaa taatttcca gtgcgaaggt 1111
 cctgctatta gtaaggagta ttatgtgtac atagaaatga gaggtcagtg aactattccc 1171
 cagcagggcc ttttcatctg gaaaagacat ccacaaaagc agcaatacag agggatgcca 1231
 catttatttt ttaaatcttc atgtacttgt caaagaagaa ttttcatgt ttttcaaag 1291
 aagtgtgttt ctttcctttt ttaaaatag aaggtctagt tacatagcat tgctagctga 1351
 caagcagcct gagagaagat ggagaatggt cctcaaaata gggacagcaa gctagaagca 1411
 ctgtacagtg ccctgctggg aagggcagac aatggactga gaaaccagaa gtctggccac 1471
 aagattgtct gtatgattct ggacgagtca cttgtggttt tcaactctctg gttagtaaac 1531
 cagatagttt agtctggggt gaatacaatg gatgtgaagt tgcttgggga aagctgaatg 1591
 tagtgaatac attggcaact ctactgggct gttaccttgt tgatatccta gagttctgga 1651
 gctgagcgaa tgcctgtcat atctcagctt gcccatcaat ccaaacacag gaggctacaa 1711
 aaaggacatg agcatggtct tctgtgtgaa ctctcctga gaaacgtgga gactggctca 1771
 gcgctttgcg cttgaaggac taatcacaag ttcttgaaga tatggacctc ggggagctat 1831
 tgcgccacga caggaggaag ttctcagatg ttgcattgat gtaacattgt tgcatttctt 1891
 taatgagctg ggctccttcc tcatttgctt cccaaagaga ttttgtccca ctaatgggtg 1951
 gcccatcacc cacactatga aagtaaaagg gatgctgagc agatacagcg tgcttacctc 2011
 tcagccatga ctttcatgct attaaaagaa tgcattgtgaa 2051

<210> 4
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 4
Met Ser Gln Gly Leu Gln Leu Leu Phe Leu Gly Cys Ala Cys Ser Leu
1 5 10 15
Ala Pro Ala Met Ala Met Arg Glu Val Thr Val Ala Cys Ser Glu Thr
20 25 30
Ala Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Leu Ser Tyr Ala
35 40 45

10

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

- 5 <210> 5
 <211> 31
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador de CD83ext
 <400> 5
 tccccggga acgccggagg tgaaggtggc t 31
- 15 <210> 6
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador de CD83ext
 <400> 6
 aattagaatt ctcaaatctc cgctctgtat t 31
- 25 <210> 7
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia parcial de pGEX2ThCD83ext
 <220>
 <221> CDS
- 35 <222> (1)..(417)
 <220>

<221> mat_péptido

<222> (28)..(417)

<400> 7

```

cct cca aaa tcg gat ctg gtt ccg cgt gga tcc ccg gga acg ccg gag 48
Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Thr Pro Glu
          -5          -1 1          5

gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc tgc acc gcc ccc 96
Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro
          10          15          20

tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag tta ttg gag 144
Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu
          25          30          35

ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac ctc agg gga 192
Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly
          40          45          50          55

cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac gcc ccc aat 240
Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn
          60          65          70

gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acc agc tgc aac tcg 288
Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser
          75          80          85

ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag aga aac cta 336
Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu
          90          95          100

agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tgc cct gca cag cgt aaa 384
Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg Lys
          105          110          115

gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tgagaattca tcgtgact 435
Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
          120          125          130
    
```

5

<210> 8

<211> 139

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia parcial de pGEX2ThCD83ext

<400> 8

```

Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Thr Pro Glu
          -5          -1 1          5

Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro
          10          15          20

Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu
          25          30          35

Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly
          40          45          50          55
    
```

15

Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn
 60 65 70
 Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser
 75 80 85
 Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu
 90 95 100
 Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg Lys
 105 110 115
 Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
 120 125 130

<210> 9
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia parcial de pGEX2ThCD83ext_mut129_CtoS

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(417)

<220>
 <221> mat_péptido
 <222> (28)..(417)

<400> 9
 cct cca aaa tcg gat ctg gtt ccg cgt gga tcc ccg gga acg ccg gag 48
 Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Thr Pro Glu
 -5 -1 1 5
 gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc tgc acc gcc ccc 96
 Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro
 10 15 20
 tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag tta ttg gag 144
 Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu
 25 30 35
 ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac ctc agg gga 192
 Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly
 40 45 50 55
 cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac gcc ccc aat 240
 Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn
 60 65 70
 gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acc agc tgc aac tcg 288
 Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser
 75 80 85
 ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag aga aac cta 336
 Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu
 90 95 100
 agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tcc cct gca cag cgt aaa 384
 Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala Gln Arg Lys

105

110

115

gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att tgagaattca tcgtgact 435
Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
120 125 130

<210> 10

<211> 139

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia parcial de pGEX2ThCD83ext_mut129_CtoS

<400> 11

Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Thr Pro Glu
-5 -1 1 5

Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro
10 15 20

Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu
25 30 35

Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly
40 45 50 55

Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn
60 65 70

Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser
75 80 85

Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu
90 95 100

Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Ser Pro Ala Gln Arg Lys
105 110 115

Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu Ile
120 125 130

10

<210> 11

<211> 32

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sentido -pGEX2ThCD83

20 <400> 11

tccccccggg aacgccggag gtgaaggtgg ct 32

<210> 12

<211> 66

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador antisentido-CD83extra_mutantCtoS

30

<400> 12

aattagaatt ctcaaatctc cgctctgtat ttcttaaag tctcttcttt acgctgtgca 60
ggggat 66

REIVINDICACIONES

1. Una proteína CD83 soluble que es una proteína CD83 monomérica en la que uno o más de los restos de cisteína se han sustituido por un resto de aminoácido diferente.
- 5 2. La proteína CD83 soluble de la reivindicación 1, en la que los uno o más restos de cisteína se han sustituido por un resto de aminoácido pequeño y/o polar, diferente, preferiblemente
 - (i) el resto de aminoácido pequeño y/o polar se selecciona de serina, alanina, glicina, valina y treonina, preferiblemente serina; y/o
 - 10 (ii) la CD83 soluble tiene además uno o más restos de aminoácidos derivados del dominio intracelular vecino en su extremo carbonilo, preferiblemente la proteína CD83 soluble comprende los restos de aminoácidos 20 a 145 de la SEQ ID n.º 2, donde uno o más restos de cisteína se han sustituido; y/o
 - (iii) la CD83 soluble además tiene secuencias funcionales unidas a su extremo amino, preferiblemente secuencias funcionales de hasta 10 restos aminoácidos, y lo más preferiblemente porta en el extremo amino los aminoácidos adicionales Gly-Ser-Pro-Gly; y/o
 - 15 (iv) la proteína CD83 soluble comprende los restos aminoácidos 1 a 130 de la SEQ ID n.º 8, en la que uno o más restos de cisteína se han sustituido; y/o
 - (v) un resto de cisteína, preferiblemente el quinto resto de cisteína se ha reemplazado; y/o
 - (vi) el resto de cisteína sustituido está en el dominio extracelular de CD83.
- 20 3. La proteína CD83 soluble monomérica de la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteína CD83 soluble comprende los restos aminoácidos 20 a 144 de la SEQ ID n.º 2, en la que el resto de cisteína en la posición 129 se ha reemplazado por un resto de serina, o comprende los restos aminoácidos 1 a 130 de la SEQ ID n.º 10.
4. La proteína CD83 soluble de la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteína CD83 soluble comprende los restos aminoácidos 20 a 144 de la SEQ ID n.º 2, excepto que el resto de cisteína que corresponde al aminoácido 100 de la SEQ ID n.º 2 se ha reemplazado por un resto aminoácido pequeño y/o polar, diferente, preferiblemente una serina.
- 25 5. La proteína CD83 soluble de la reivindicación 4, que comprende los restos aminoácidos 20 a 145 de la SEQ ID n.º 2, excepto que el resto de cisteína que corresponde al aminoácido 100 de la SEQ ID n.º 2 se ha reemplazado por un resto aminoácido pequeño y/o polar, diferente, preferiblemente una serina.
6. La proteína CD83 soluble de la reivindicación 4, que consiste en los restos aminoácidos 20 a 145 de la SEQ ID n.º 2, excepto que el resto de cisteína que corresponde al aminoácido 100 de la SEQ ID n.º 2 se ha reemplazado por un resto aminoácido pequeño y/o polar, diferente, preferiblemente una serina.
- 30 7. La proteína CD83 soluble de la reivindicación 4, que consiste en:
 - (i) los restos aminoácidos 20 a 145 de la SEQ ID n.º 2, excepto que el resto de cisteína que corresponde al aminoácido 100 de la SEQ ID n.º 2 se ha reemplazado por un resto aminoácido pequeño y/o polar, diferente, preferiblemente una serina; y
 - 35 (ii) secuencias funcionales unidas a su extremo amino, preferiblemente secuencias funcionales de hasta 10 restos aminoácidos, y lo más preferiblemente porta en el extremo amino los aminoácidos adicionales Gly-Ser-Pro-Gly.
8. La proteína CD83 soluble de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha proteína se obtuvo mediante expresión recombinante en una célula hospedadora procarionte.
9. La proteína CD83 soluble de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha proteína se obtuvo mediante expresión recombinante en una célula hospedadora eucariota.
- 40 10. Un ácido nucleico o un vector de expresión recombinante que codifica la proteína CD83 soluble según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Una célula hospedadora procarionte o eucariota transformada/transfectada con un ácido nucleico o un vector de la reivindicación 10.
- 45 12. Un método para producir la proteína CD83 soluble según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende cultivar una célula hospedadora procarionte o eucariota transformada/transfectada según la reivindicación 11.
13. Una composición farmacéutica que comprende la proteína CD83 soluble como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el ácido nucleico o el vector definido en la reivindicación 10.

14. El uso de la proteína CD83 soluble de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección médica causada por la disfunción o función indeseada de una respuesta inmune celular que implica células dendríticas, linfocitos T y/o linfocitos B.

5 15. El uso de la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad o afección médica causada por la disfunción función indeseada de una respuesta inmune celular que implica células dendríticas, linfocitos T y/o linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en alergias, asma, rechazo de un tejido u órgano trasplantados, síndromes autoinmunes tales como miastenia grave, esclerosis múltiple, vasculitis, enteropatías inflamatorias crónicas, tales como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, HLA B27 asociada a autoinmunopatías tales como la enfermedad de Bechterew y lupus eritematoso sistémico, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, artritis reumatoide, diabetes sacarina
10 insulino dependiente y sida.

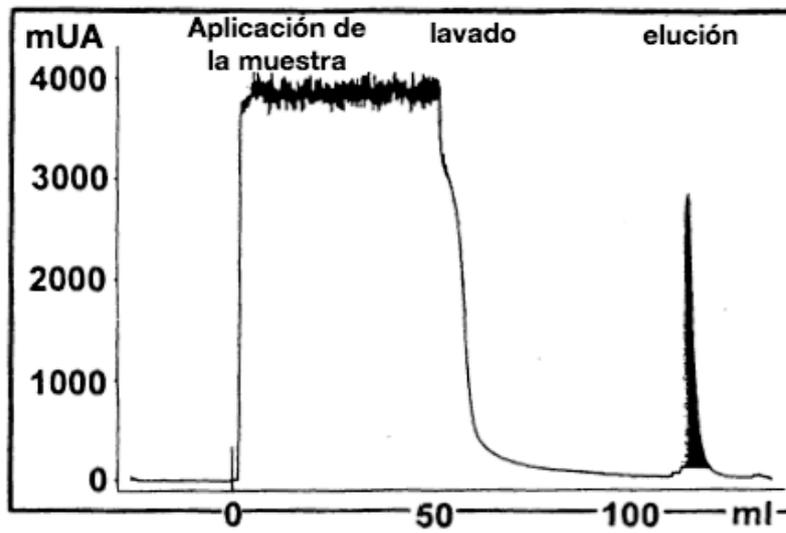


Fig.2 A I

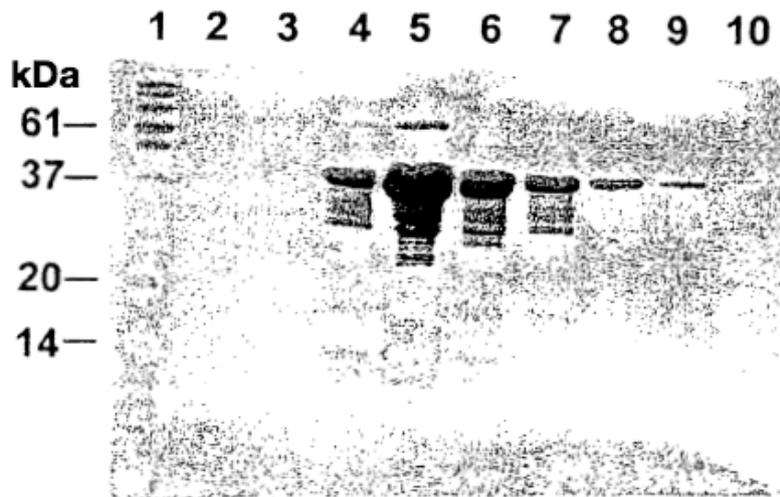


Fig.2 A II

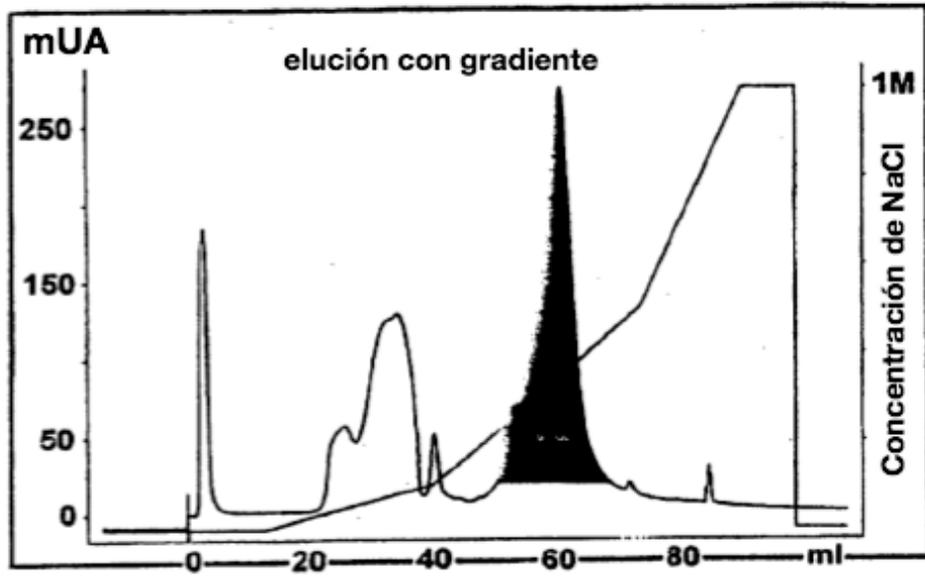


Fig.2 B I

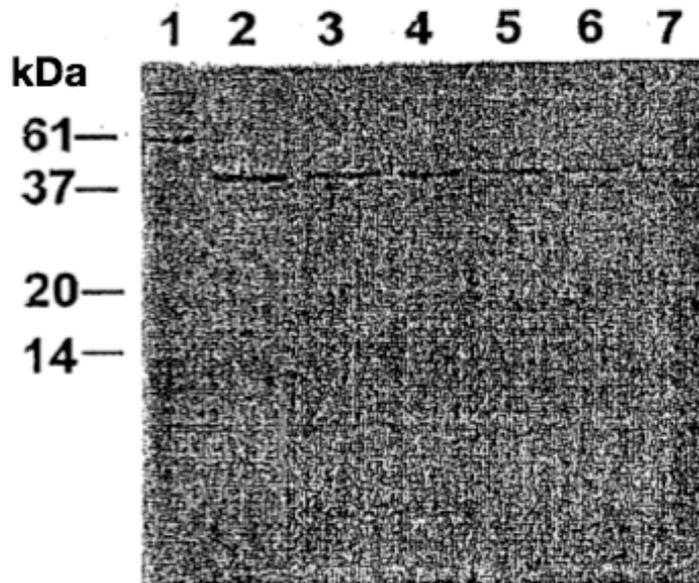


Fig.2 B II

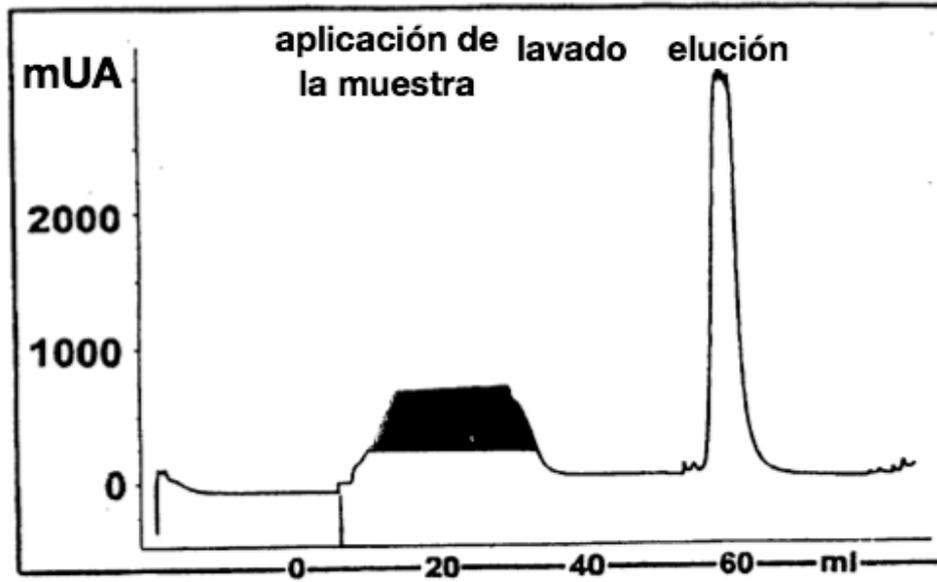


Fig.2 C I

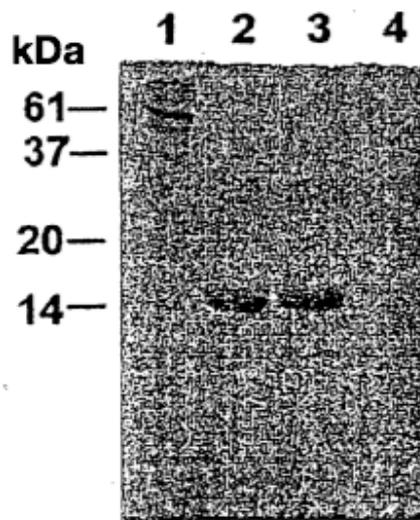


Fig.2 C II

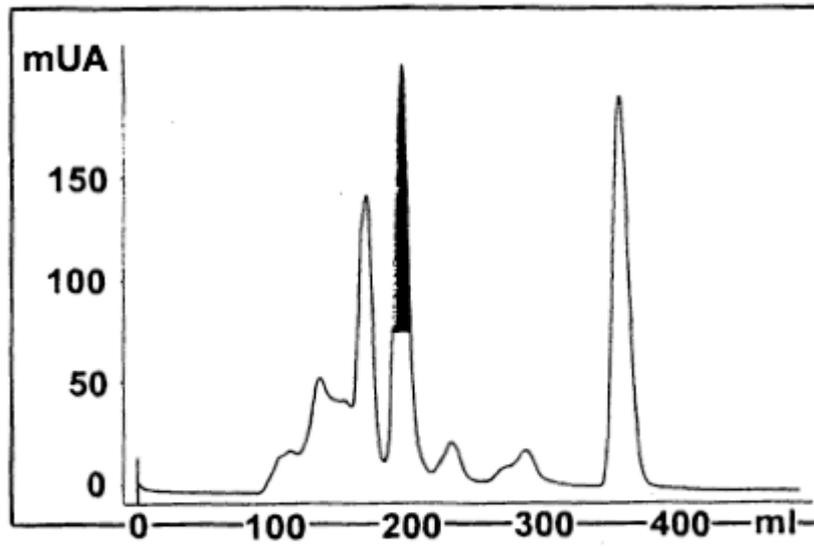


Fig.2 D I

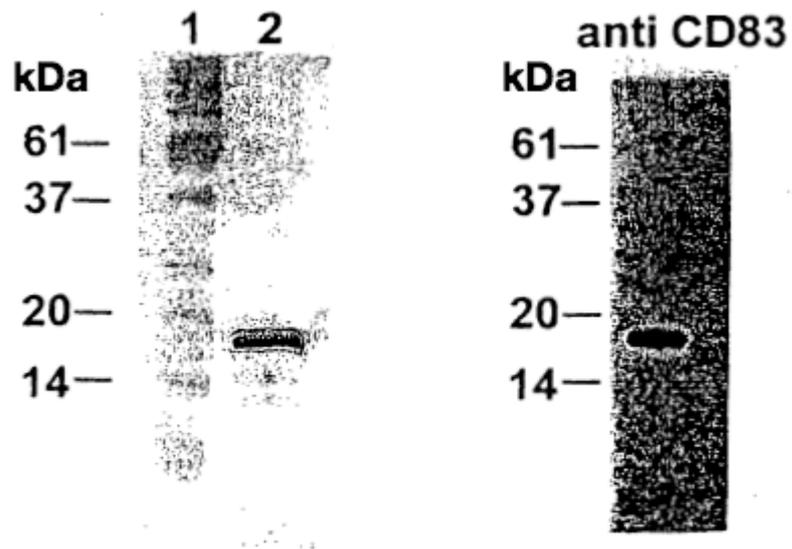


Fig.2 D II

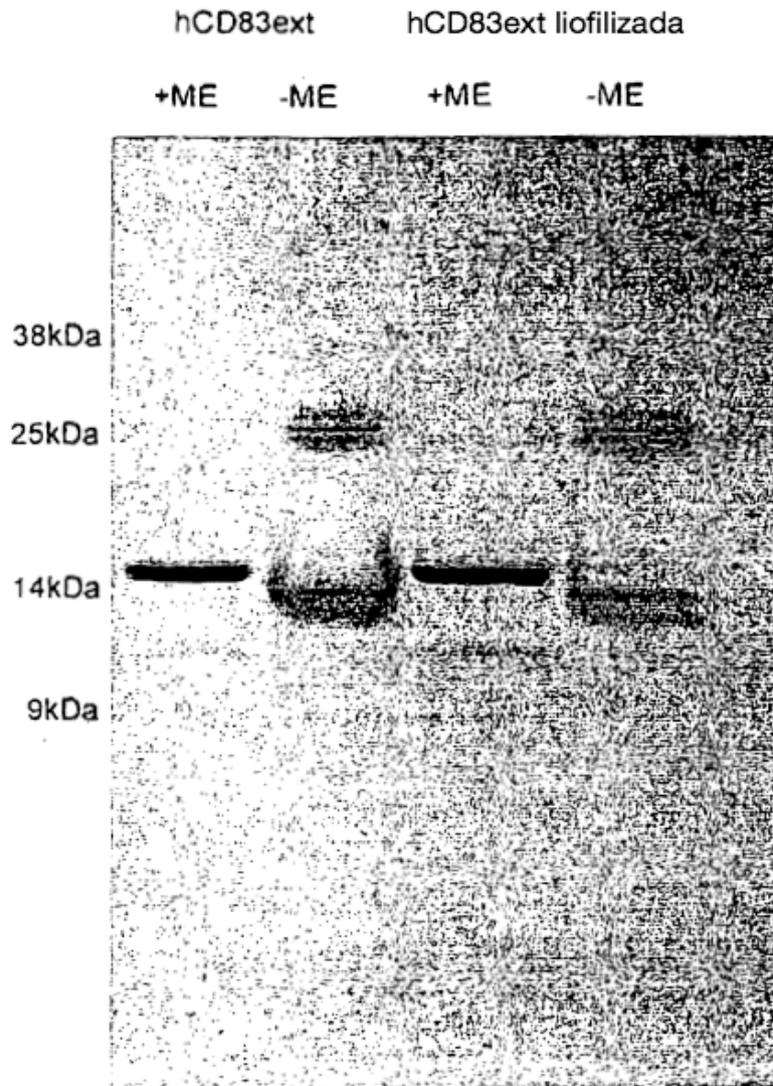
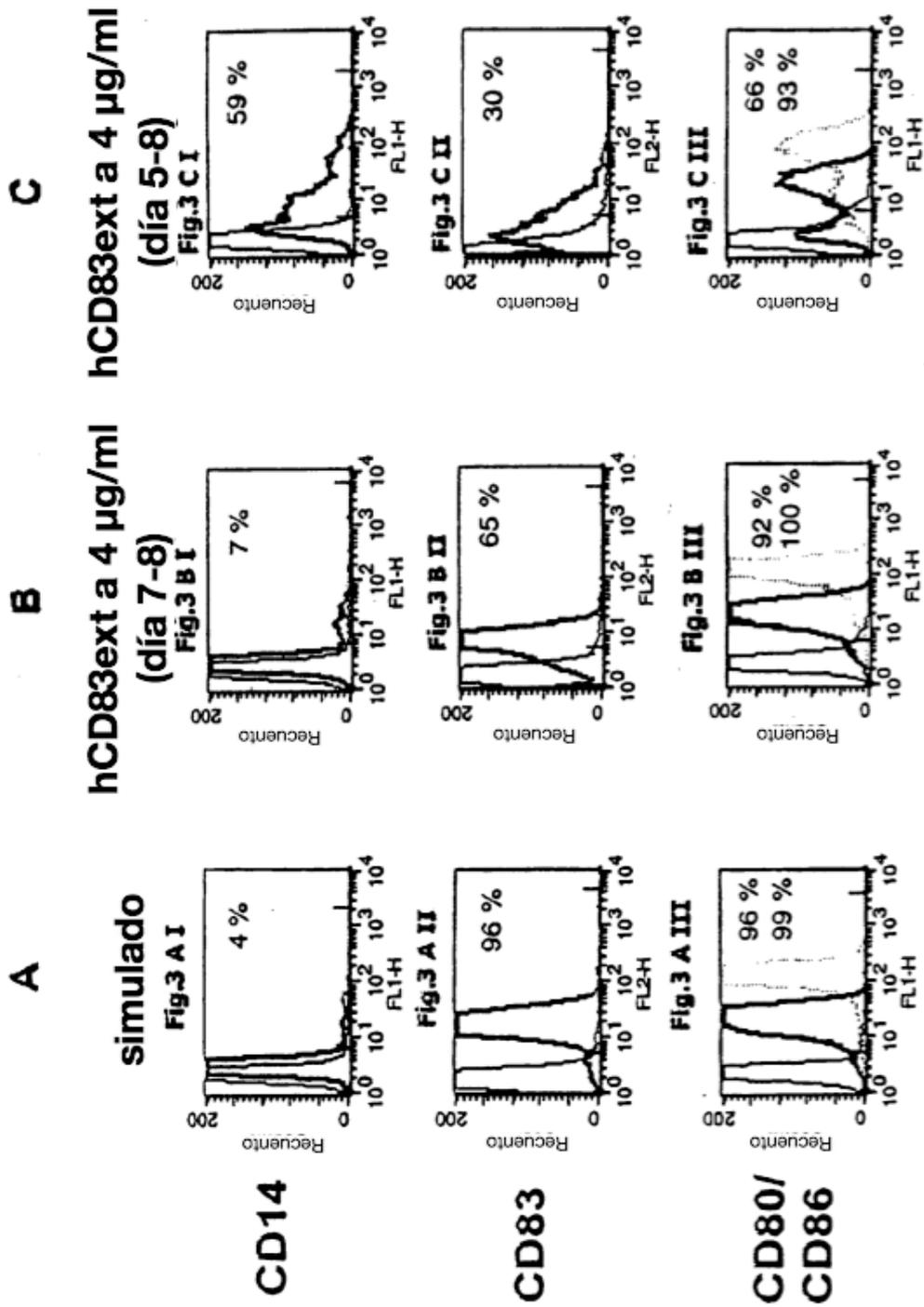


Fig.2 E



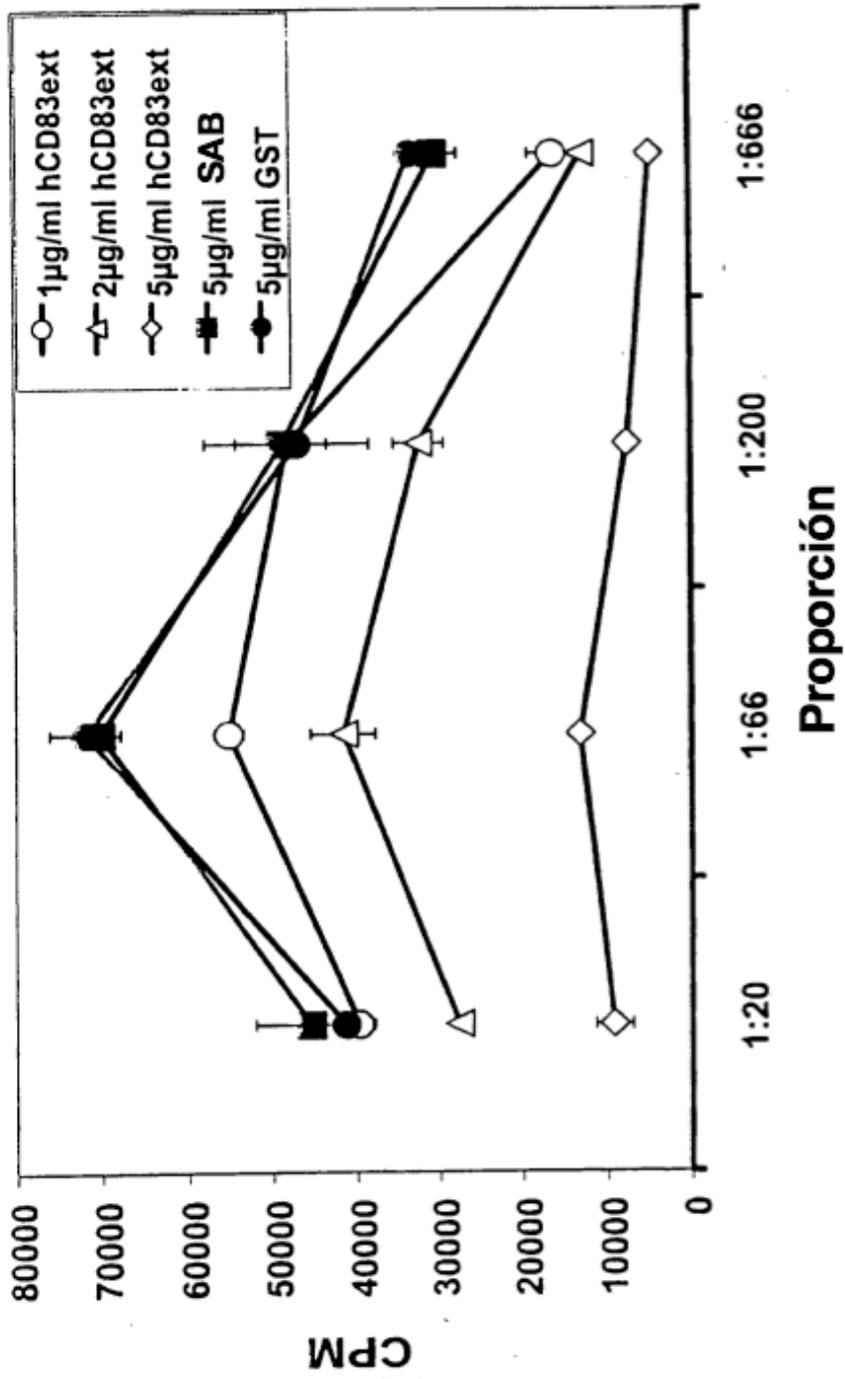


Fig.4
células dendríticas:linfocitos T

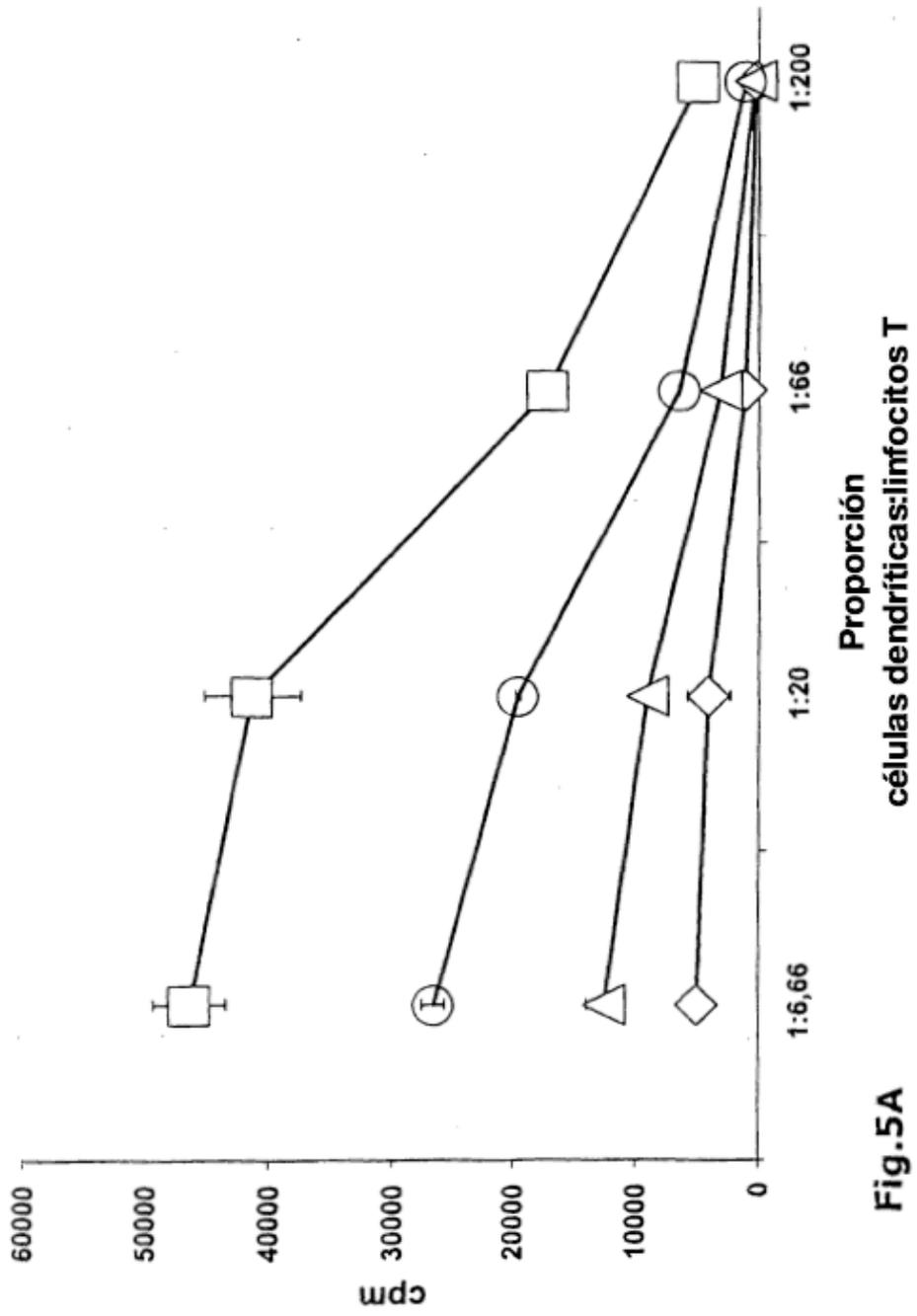


Fig.5A

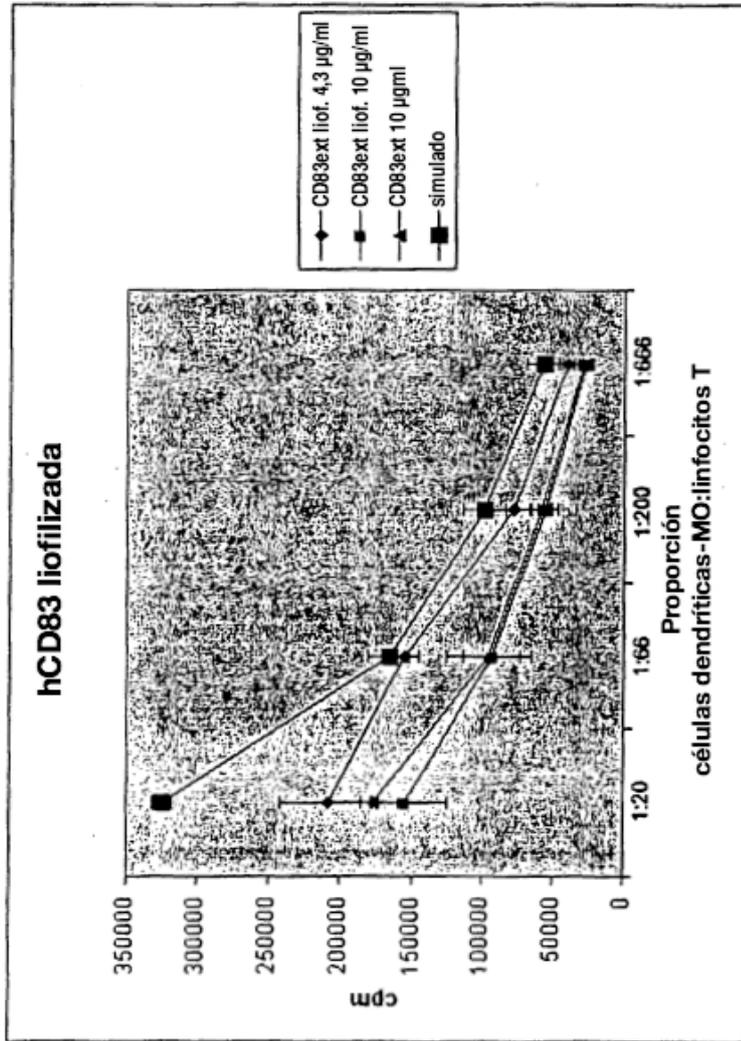


Fig.5B

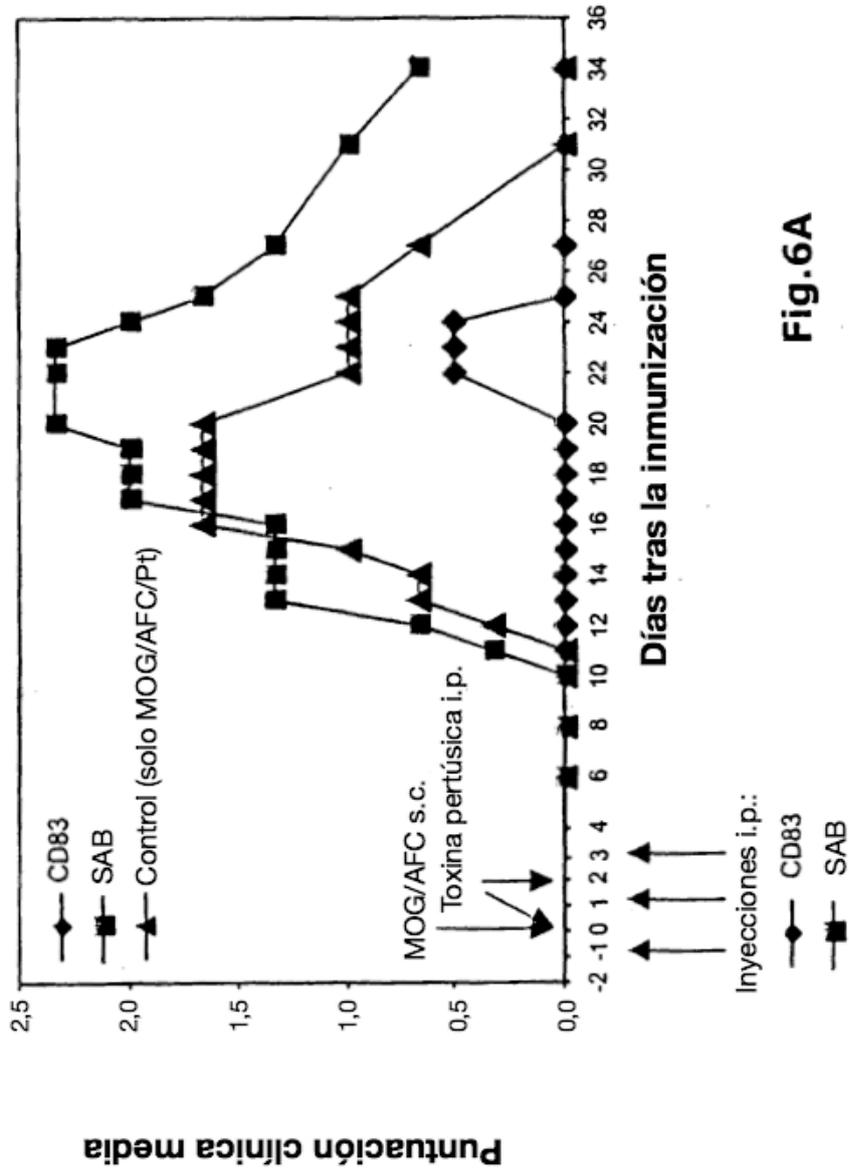


Fig.6A

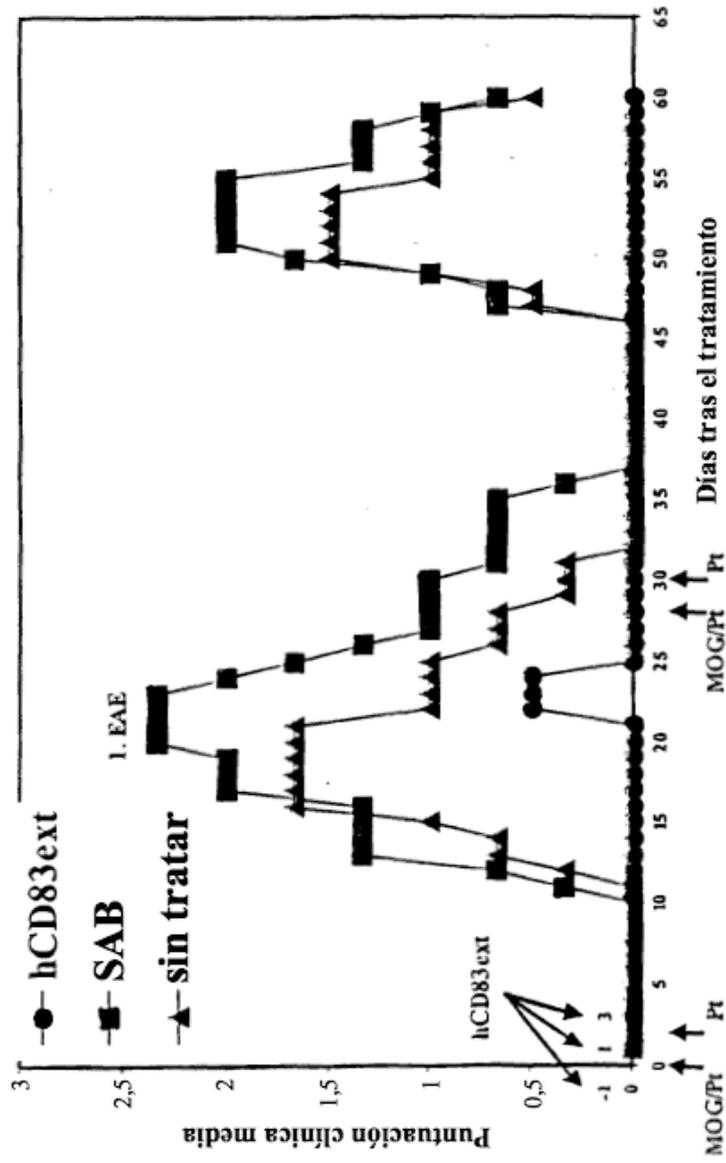


Fig.6B

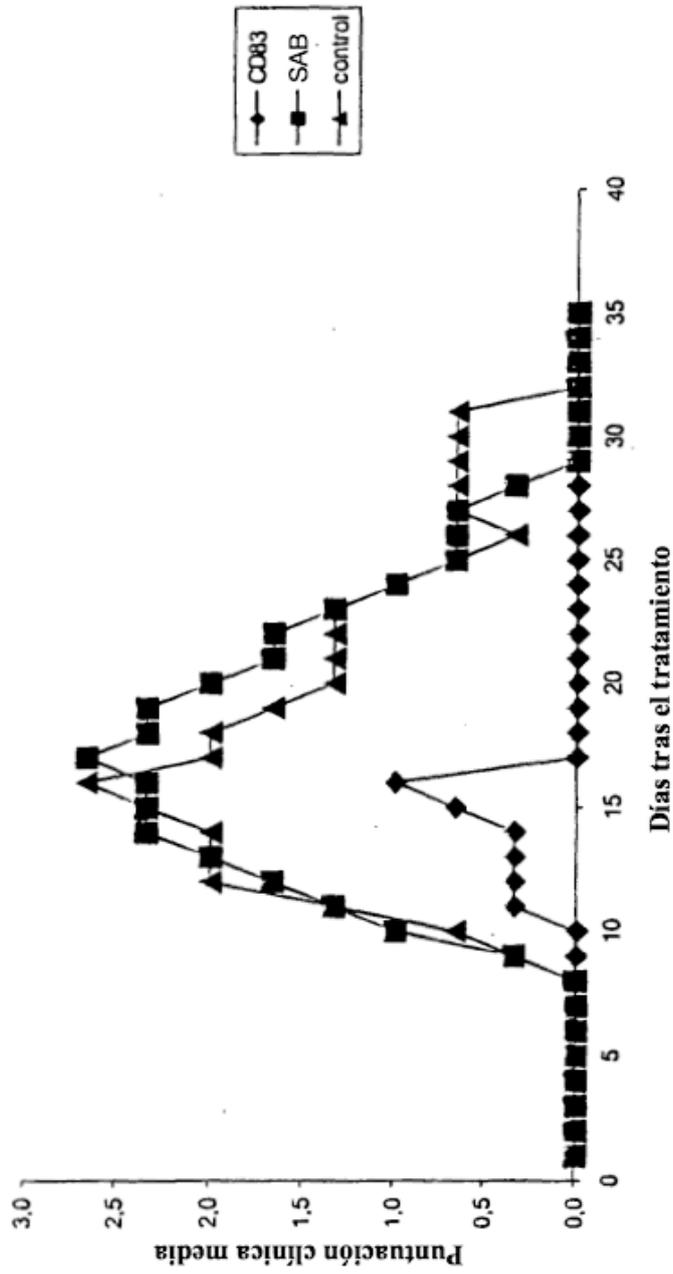


Fig.6C

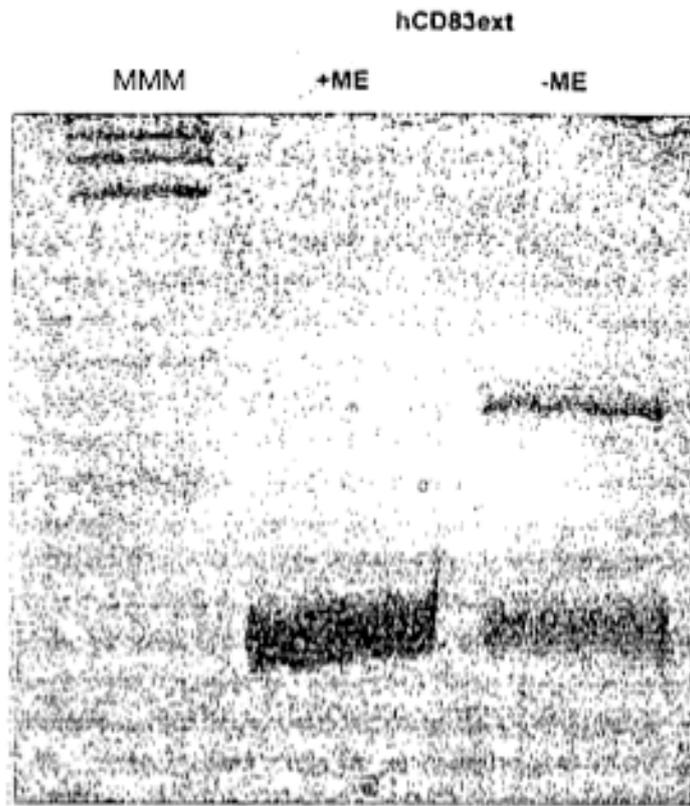


Fig.7

Sitio de corte de
la trombina SmaI

| -----

pGEX2T... CCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGGAACGCCGGAGGT
P P K S D L V P R G S P G T P E V

GAAGGTGGCTTGCTCCGAAGATGTGGACTTGCCCTGCACCGCCCCCTGGGATCCGCAGGT
K V A C S E D V D L P C T A P W D P Q V

TCCCTACACGGTCTCCTGGGTCAAGTTATTGGAGGGTGGTGAAGAGAGGATGGAGACACC
P Y T V S W V K L L E G G E E R M E T P

CCAGGAAGACCACCTCAGGGGACAGCACTATCATCAGAAGGGGCAAAATGGTTCTTTCGA
Q E D H L R G Q H Y H Q K G Q N G S F D

CGCCCCAATGAAAGGCCCTATTCCCTGAAGATCCGAAACACTACCAGCTGCAACTCGGG
A P N E R P Y S L K I R N T T S C N S G

GACATACAGGTGCACTCTGCAGGACCCGGATGGGCAGAGAAACCTAAGTGGCAAGGTGAT
T Y R C T L Q D P D G Q R N L S G K V I

CTTGAGAGTGACAGGAT^CCCCTGCACAGCGTAAAGAAGAGACTTTTAAGAATAACAGAGC
L R V T G S P A Q R K E E T P K K Y R A

GGAGATTGAGAATTCATCGTGA CT ...pGEX2T
E I - -----
EcoRI

Fig.8

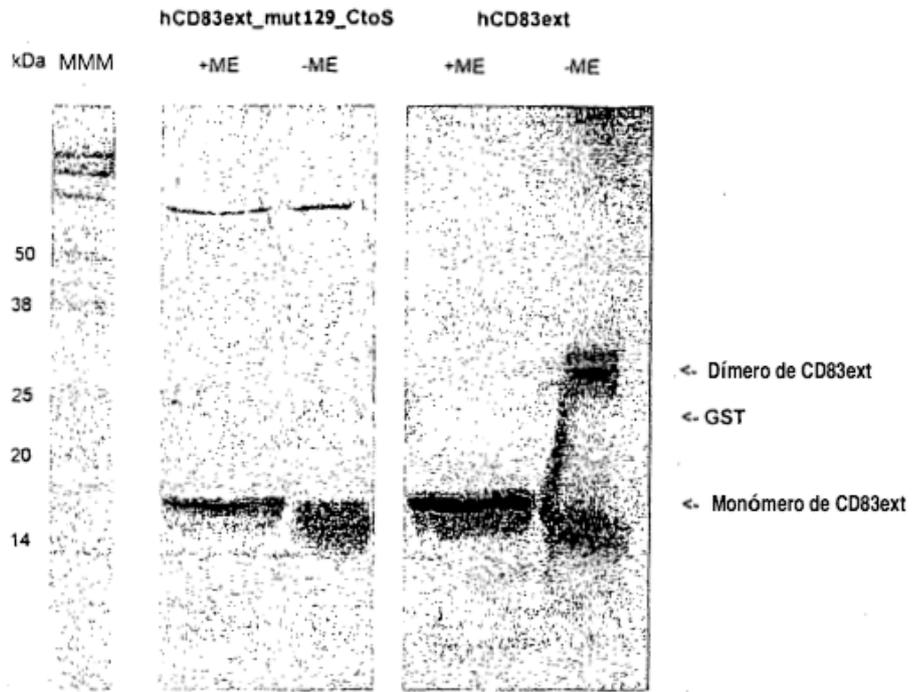


Fig.9

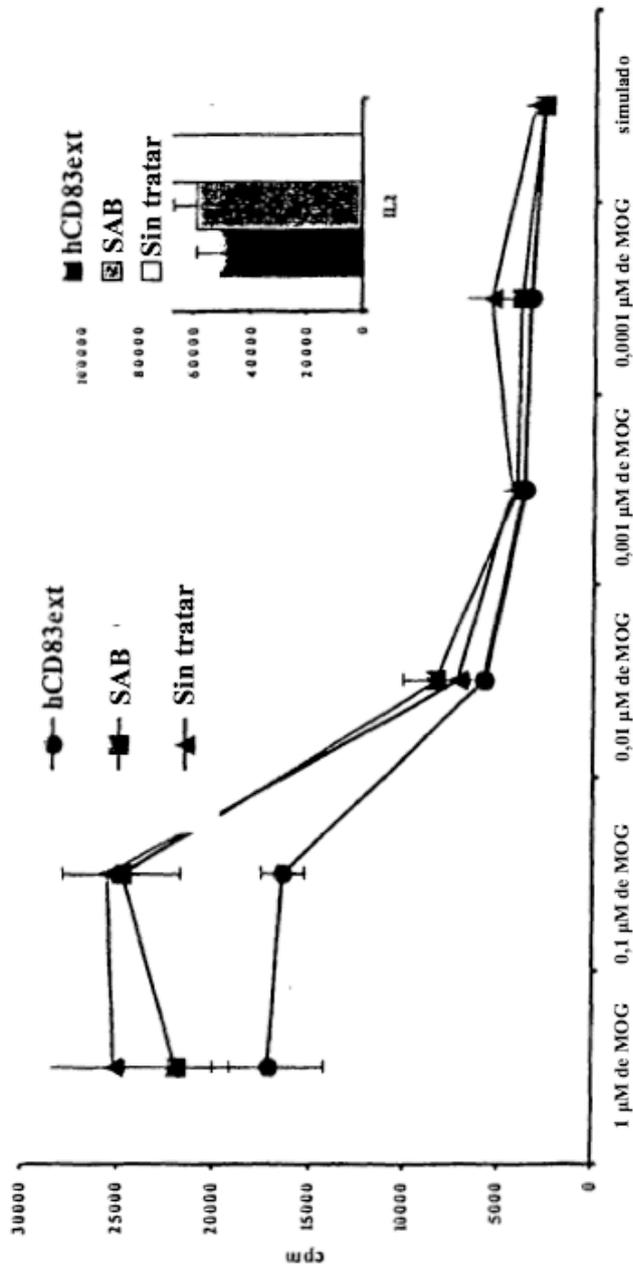


Fig.10A

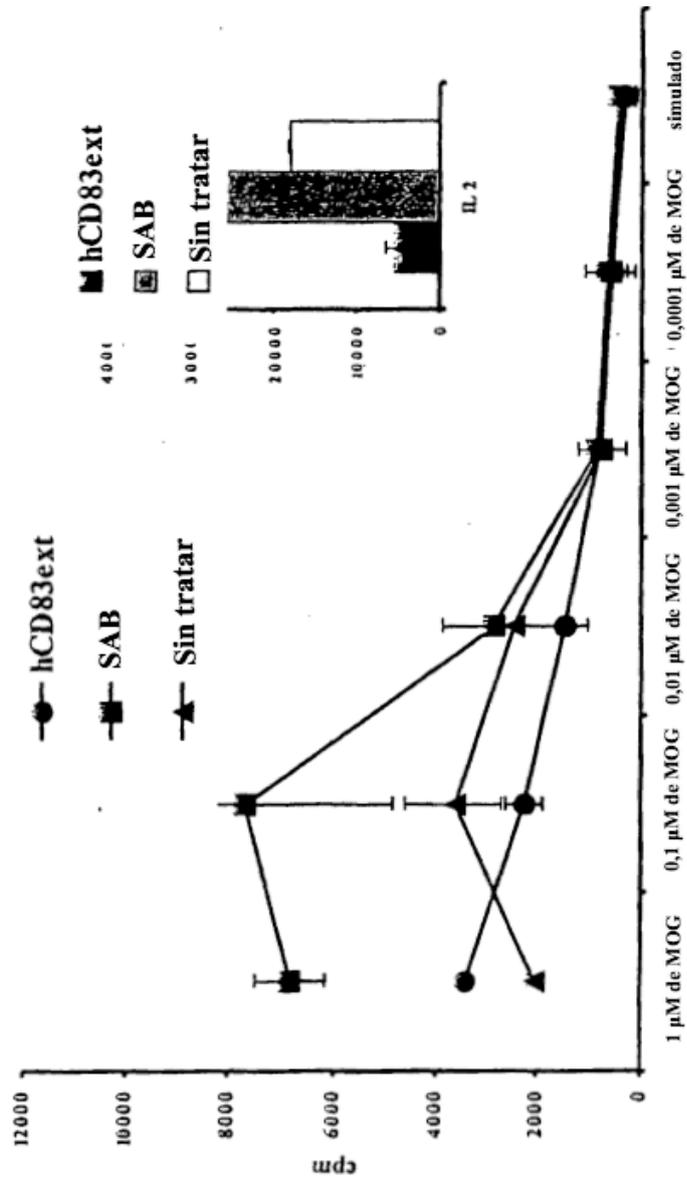


Fig.10B

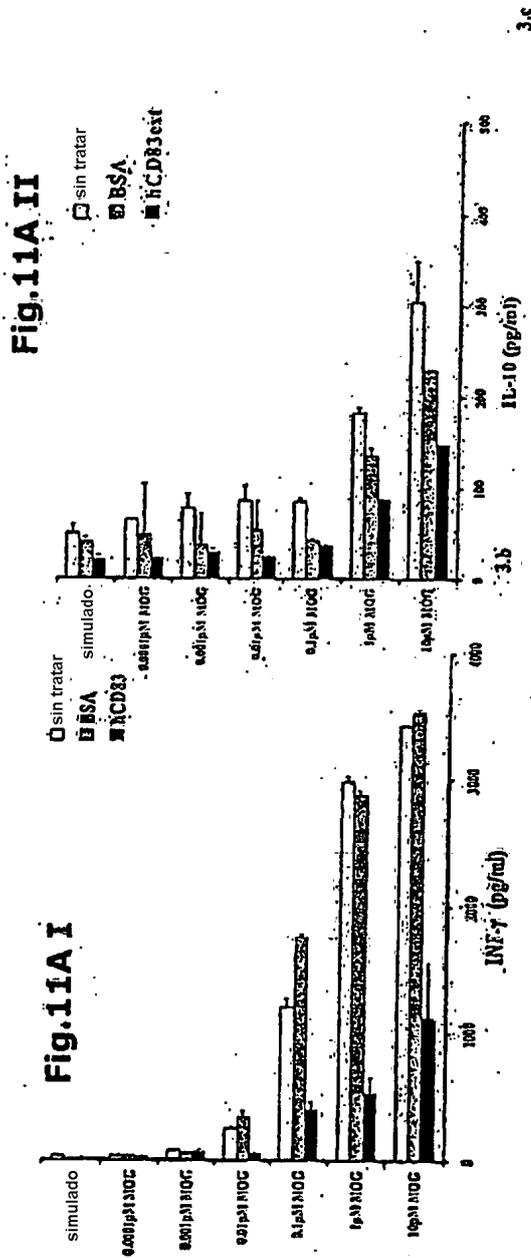


Fig. 1.1A III

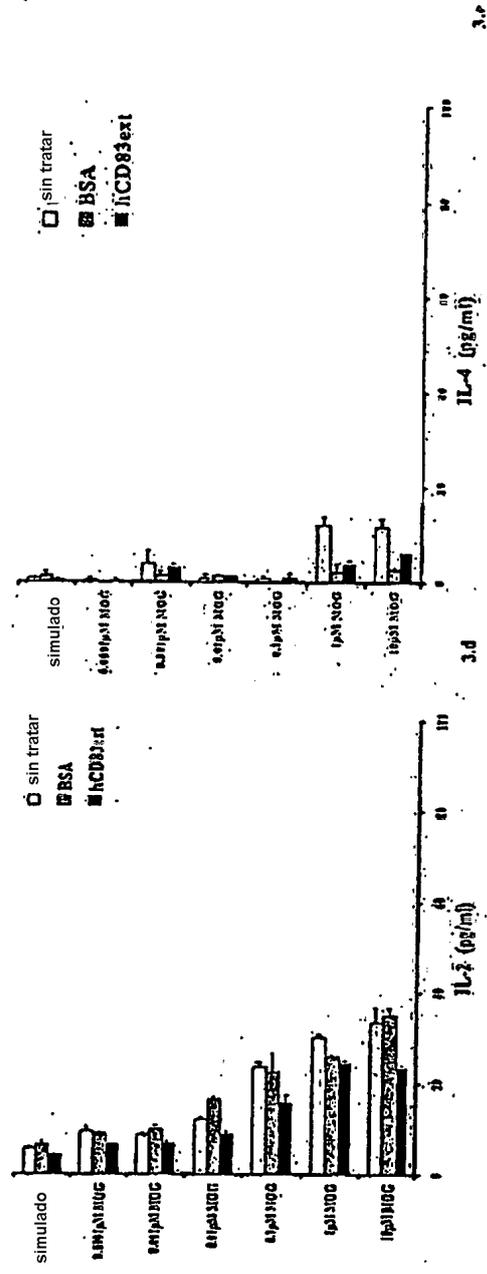


Fig. 1.1A IV

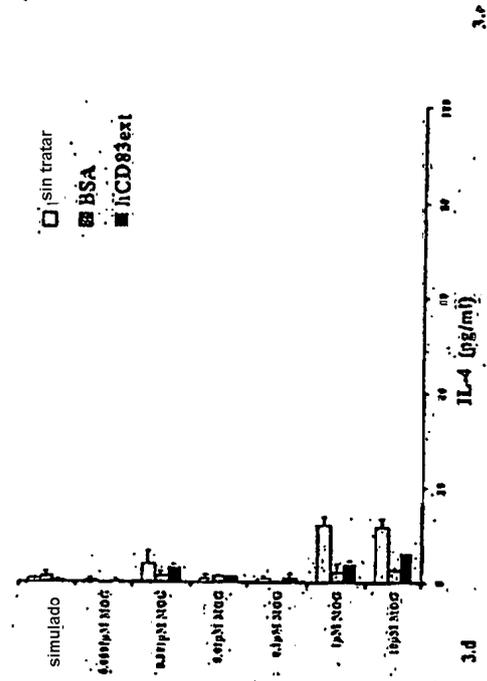


Fig.1.1B I

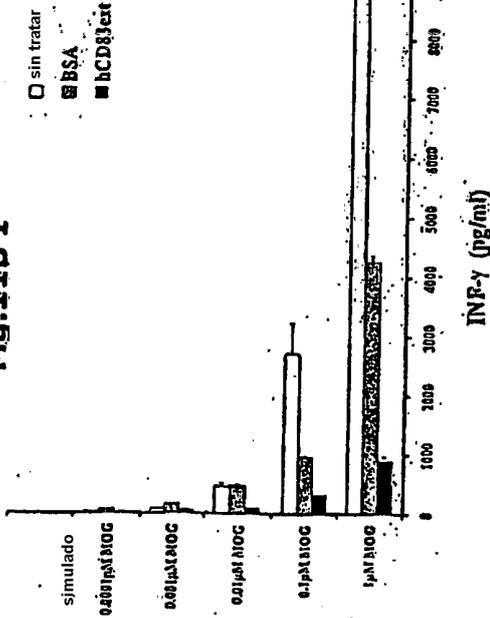


Fig.1.1B II

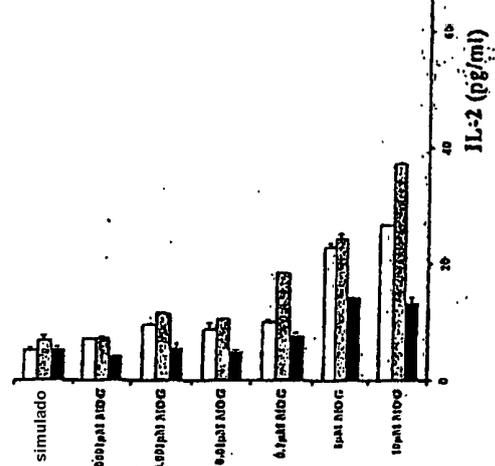
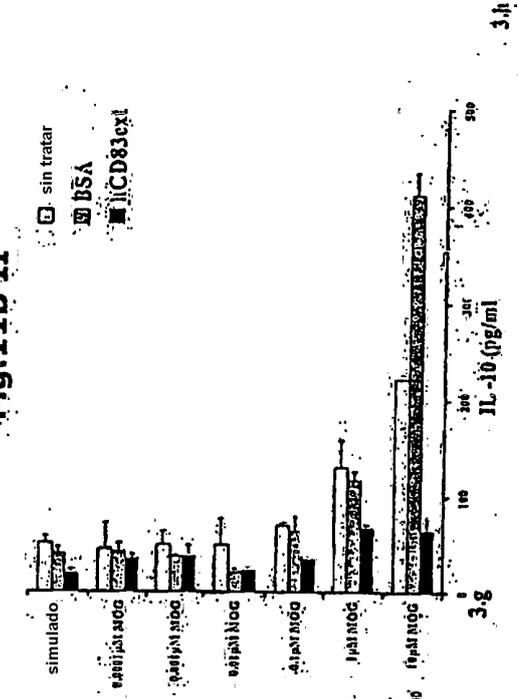


Fig.1.1B III

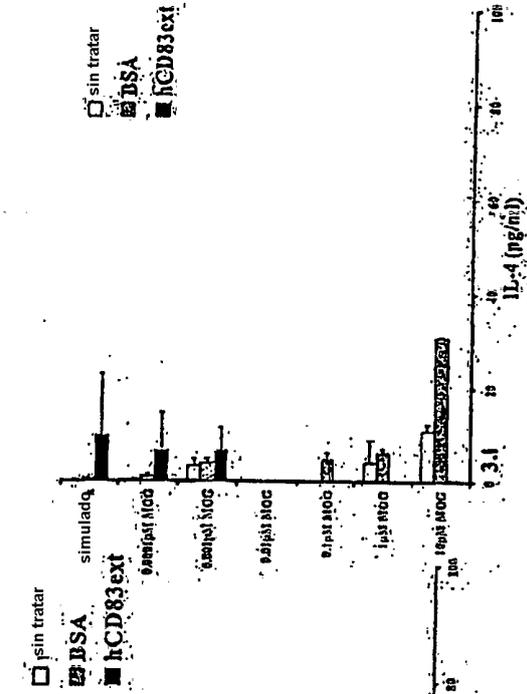


Fig.1.1B IV