

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-526685  
(P2004-526685A)

(43) 公表日 平成16年9月2日(2004.9.2)

|                            |                                   |             |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I                               | テーマコード (参考) |
| <b>C 07 K 16/28</b>        | C O 7 K 16/28 Z N A               | 4 B O 6 5   |
| <b>A 6 1 K 39/00</b>       | A 6 1 K 39/00 H                   | 4 C O 8 4   |
| <b>A 6 1 K 39/02</b>       | A 6 1 K 39/02                     | 4 C O 8 5   |
| <b>A 6 1 K 39/395</b>      | A 6 1 K 39/395 D                  | 4 H O 4 5   |
| <b>A 6 1 K 45/00</b>       | A 6 1 K 39/395 N                  |             |
|                            | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁) 最終頁に続く |             |

(21) 出願番号 特願2002-552012 (P2002-552012)  
 (86) (22) 出願日 平成13年12月21日 (2001.12.21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年6月20日 (2003.6.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/015392  
 (87) 国際公開番号 W02002/050119  
 (87) 国際公開日 平成14年6月27日 (2002.6.27)  
 (31) 優先権主張番号 00128143.5  
 (32) 優先日 平成12年12月21日 (2000.12.21)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 01200944.5  
 (32) 優先日 平成13年3月13日 (2001.3.13)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

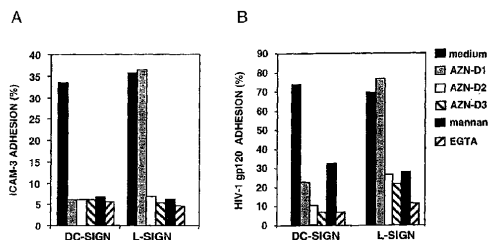
(71) 出願人 503224769  
 スチヒティング カソリーケ ユニバーシ  
 テット  
 オランダ国 ネイメヘン 6500 ハー  
 ベー ヘルト フローテプライン 10  
 ペー. オー. ボックス 9101  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓およびリンパ節中の類洞内皮細胞上において、新規な ICAM-3 結合レセプターの結合活性を調節するための方法

(57) 【要約】

本発明は、調節（動物（特に、ヒトまたは別の哺乳動物）における免疫応答の減少）のための組成物の調製において、洞様内皮層の表面上の C 型レクチンに結合する化合物の使用に関する。この洞様内皮層は、肝臓洞様内皮細胞 (LSEC) から構成されてもよいし、リンパ節洞様域から構成されてもよい。本発明の組成物は、洞様毛細血管内皮層の細胞（特に LSEC）と ICAM-2 および/または ICAM-3 を発現する細胞（特に T 細胞）との間の 1 つ以上の相互作用を調節する（特に減少させる）ために使用され得る。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

化合物の使用であって、該化合物は、動物（特にヒトまたは別の哺乳動物）における免疫応答を調節、特に減少させるための組成物の調製において、洞様内皮層の表面上でC型レクチンに結合する、使用。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の使用であって、前記洞様内皮層が肝臓洞様内皮細胞（LSEC）によって構成される、使用。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の使用であって、前記洞様内皮層がリンパ節洞様域によって構成される、使用。 10

## 【請求項 4】

請求項 1 および / または請求項 2 に記載の使用であって、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）と、ICAM-2 または ICAM-3 を発現する細胞（特にT細胞）との間の1種類以上の相互作用を調節、特に減少させるための組成物の調製における、使用。

## 【請求項 5】

請求項 1 および / または請求項 2 および / または請求項 4 に記載の使用であって、洞様内皮層の細胞（特にLSEC）と、ICAM-2 または ICAM-3 を発現する細胞（特にT細胞）との間の接着、特に、LSECの表面上のC型レクチンと、ICAM-2 または ICAM-3 を発現させる細胞（特にT細胞）の表面上のICAMレセプター（特に、T細胞の表面上のICAM-2 または ICAM-3 レセプター）との間の接着を調節、特に減少させるための組成物の調製における、使用。 20

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 請求項 5 のいずれか 1 項に記載の使用であって、耐性の誘導、免疫治療、免疫抑制、自己免疫性疾患の処置、および / またはアレルギーの処置のための、特定の抗原に対する免疫応答を防止または阻害するための組成物の調製における、使用。

## 【請求項 7】

化合物の使用であって、該化合物は、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合するかまたは結合し得、該使用は、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）のHIV感染を阻害するため、特に、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面へのHIV表面タンパク質（例えば、gp120）の接着を阻害し、それによって該細胞へのHIVの進入を阻害するための組成物の調製における、使用。 30

## 【請求項 8】

化合物の使用であって、該化合物は、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合するかまたは結合し得、該使用は、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）から非感染T細胞へのHIVの移動を阻害するための組成物の調製における、使用。

## 【請求項 9】

併用の使用であって、該併用は、1) 洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合し、そしてC型レクチンに付着する化合物、および2) 抗原あるいはフラグメントまたはそれらの一部の併用であり、該使用は、動物（特に、ヒトまたは他の哺乳動物）における、該抗原に対する免疫応答を調節、特に発生、増大および / または促進するための組成物の調製における、使用。 40

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の使用であって、前記抗原が、前記C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されているか、または縮合されている、使用。

## 【請求項 11】

請求項 9 または請求項 10 に記載の使用であって、前記抗原が癌抗原から選択され、該抗原は、該抗原を含有するかまたは発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を発生するために用いられ得るか、または感染症に対するワクチンにおいて用いられる抗原である、使用。

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 請求項 1 1 のいずれか 1 項に記載の使用であって、前記化合物が、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上の C 型レクチンに結合し得、該化合物は、マンノース炭水化物（例えば、マンナン、D - マンノース）、フコース炭水化物（例えば、L - フコース）、植物レクチン（例えば、コンカナバリン A）、抗生物質（例えば、プラディマイシン A）、糖（例えば、N - アセチル - D - グルコサミンおよびガラクトース）、タンパク質（例えば、g p 1 2 0 およびそれらのアナログまたはフラグメント）、ならびに、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上において発現されるような C 型レクチンに対して指向される抗体、あるいはその一部、フラグメントまたはエピトープからなる群より選択される、使用。

【請求項 1 3】

10

請求項 1 ~ 請求項 1 1 のいずれか 1 項に記載の使用であって、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上の前記 C 型レクチンが、図 7 のアミノ酸配列を有するタンパク質、あるいはその天然改変体または等価物である、使用。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 または請求項 1 3 に記載の使用であって、前記化合物が、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上の C 型レクチンに結合し得、該化合物は、モノクローナル抗体（好ましくは、図 7 のアミノ酸配列を有する C 型レクチンに対して指向されるモノクローナル抗体またはその天然改変体もしくは等価物）、ならびに / あるいはその一部、フラグメントまたはエピトープである、使用。

【請求項 1 5】

20

図 7 のアミノ酸配列を有する C 型レクチンに対して指向される、抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）またはその天然改変体もしくは等価物、および / あるいはその一部、フラグメントまたはエピトープ。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の抗体であって、A Z N - D 3 である、抗体。

【請求項 1 7】

薬学的組成物であって、該組成物は、請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の少なくとも 1 つの抗体、ならびに少なくとも 1 つのキャリア、賦形剤、アジュバント、および / または処方剤を含有する、組成物。

【請求項 1 8】

30

併用であって、1) 洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上の C 型レクチンに結合し、そして C 型レクチンに付着する化合物、および 2) 抗原あるいはそのフラグメントまたは一部、の併用。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の併用であって、前記抗原が、前記 C 型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されているか、または縮合されている、併用。

【請求項 2 0】

請求項 1 8 または請求項 1 9 に記載の併用であって、前記抗原が癌抗原から選択され、該癌抗原が、該抗原を含有もしくは発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を発生するために用いられ得るか、または感染症に対するワクチンにおいて用いられるような抗原である、併用。

40

【請求項 2 1】

請求項 1 8 ~ 請求項 2 0 のいずれか 1 項に記載の併用であって、前記化合物が、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上の C 型レクチンに結合し得、該化合物は、マンノース炭水化物（例えば、マンナンおよび D - マンノース）、フコース炭水化物（例えば、L - フコース）、植物レクチン（例えば、コンカナバリン A）、抗生物質（例えば、プラディマイシン A）、糖（例えば、N - アセチル - D - グルコサミンおよびガラクトース）、タンパク質（例えば、g p 1 2 0 およびそのアナログまたはフラグメント）、ならびに、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上において発現されるような C 型レクチンに対して指向された抗生物質、あるいはその一部、フラグメント、またはエピトープからな

50

る群より選択される、併用。

【請求項 2 2】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の抗体の使用であって、生物学的サンプルにおける、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の検出における、使用。

【請求項 2 3】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の抗体の使用であって、生物学的サンプルあるいは培養培地に由来する、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の単離、調製および/または精製における、使用。

【請求項 2 4】

請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の抗体の使用であって、生物学的サンプルにおける C 型レクチン（特に、図 6 のアミノ酸配列を有する C 型レクチンまたはその天然改変体もしくは等価物）、ならびに/あるいはその一部、フラグメントまたはエピトープの、存在および/または発現を決定するためのアッセイにおける、使用。 10

【請求項 2 5】

生物学的サンプルまたは培養培地に由来する、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）を複製、単離および/または精製する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 該細胞を含有する生物学的サンプルまたは培養培地を、請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の抗体と接触させる工程；

b) 該抗体に結合しない細胞から、そして必要に応じて、該サンプルまたは該培地のさらなる任意の成分から、該抗体に結合する細胞を分離する工程； 20

を包含しそして必要に応じて、以下の工程：

c) 該抗体から、該抗体に結合する細胞を分離する工程、をさらに包含する、方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の方法であって、該抗体がカラムまたはマトリクス、（パラ）磁性ビーズあるいは類似の固形支持体に付着している、方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 5 または請求項 2 6 に記載の方法であって、前記生物学的サンプルが、生物学的流体（例えば、血液、血漿またはリンパ液）である、方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 5 または請求項 2 6 の方法によって得られる、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物における免疫応答を調節するために、肝臓およびリンパ節中の類洞内皮細胞の表面に位置する C 型レクチンに結合する化合物の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

分子 DC - S I G N は、近年、I C A M - 3 への高親和性結合を介して DC と休止 T 細胞との間の相互作用を媒介し、その結果、一次免疫応答の開始を促進する、DC 特異的接着レセプターとして同定された。DC - S I G N は、以前に報告された I I 型膜関連 C 型レクチンと同一であると示され (G e i j t e n b e e k , T . B . ら、2000、C e l l 100 : 575 ~ 585)、この I I 型膜関連 C 型レクチンは、CD4 非依存的様式で H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 120 に結合する。DC - S I G N の親和性は、H I V - 1 g p 120 に対する CD4 の親和性を超え (C u r t i s , B . M . ら、1992、P r o c N a t l A c a d S c i U S A 89 : 8356 - 8360)、そして、H I V - 1 の捕捉に関して、DC - S I G N は DC 自身へのウイルス侵入を促進しそうではなく、むしろ t r a n s での T 細胞の感染を増強する (G e i j t e n b e e k , T . B . ら、2000、C e l l 100 : 587 - 597)。DC - S I G N 関連 H I V - 1 は、恐らく、DC による末梢からリンパ器官への H I V - 1 の輸送の間 40 50

、ウイルスの感染潜在力に寄与して、長期間わたって感染を残存させる。

【0003】

Yokoyama - Kobayashiら(1999、Gene 228:161-167)による、II型膜タンパク質をコードするcDNAクローンについての以前の研究の結果としては、現在はDC-SIGNとして既知の分子をコードするcDNAと相同であるが同一ではない部分的クローンの同定を示した。推定タンパク質生成物は、細胞質ドメイン中に28アミノ酸の欠失を含み、そして、DC-SIGNをコードするcDNAに関するC型レクチンドメインの全体が欠如していた。

【0004】

さらに最近、Soilleuxら、(2000、J Immunol 165:2937-2942)は、関連する遺伝子の全長cDNA配列について記述し、これをSoilleuxらはDC-DIGNRと呼んだ。DC-SIGNおよびDC-DIGNRのゲノム構成が比較され、これは、高度の類似性を示した。胎盤、子宮内膜および刺激されたKG1細胞(骨髄系DCと表現型的に類似する細胞株)における2つの遺伝子の同時発現は、DC-DIGNRの発現が子宮内膜および刺激されたKG1細胞の両方において非常に低度ではあるが、観察された。

【0005】

本発明を導いた研究において、DC-DIGNR遺伝子が、単球誘導樹状細胞ではなく、2つの組織(肝臓およびリンパ節)中でのみ顕著に高レベルで発現されるということ、現在見出した。レセプターは「L-SIGN」と名称を変更された、なぜなら、このレセプターは、肝臓/リンパ節特異的ICAM-3捕獲非インテグリンであるからである。

【0006】

相同なヒトC型レクチンDC-SIGNおよびL-SIGNは、新しい遺伝子複製の生成物でありそうである。対応するタンパク質は、完全に同一のリガンド特異性を共有しないとしても、同一のドメイン構成および重複を共有する。この分子の最も多様な領域は、その細胞質の尾部中に生じる。

【0007】

DC-SIGNについての遺伝子とL-SIGNについての遺伝子との間の別の明確な差異は、L-SIGNのエキソン4における反復多型であり、これは、DC-SIGNにおいては保存される(表1)。L-SIGNのネックドメインは、3~9の反復を含み得る一方、DC-SIGNは、試験されたCaucasianの間で常に7個の反復からなる。6つの反復を含むL-SIGN分子または7つの反復を含むL-SIGN分子の間で、リガンド結合においても、HIV-1捕捉および増強実験においても差異は観察されなかった。

【0008】

SIGN遺伝子は、それらの進化的歴史を超えて、配列および機能的類似性を保持するが、それらの組織区分を決定する調節エレメントが特有の経路に沿って進化するということが、現在は、本発明に基づいて、驚くほど見出された。mRNA発現のNorthern分析は、単球誘導DCにおいておよびDCが存在する組織において、DC-SIGNの発現を明らかに示したが、DCにおいてL-SIGNの発現は、検出不可能であった(図2)。さらに、L-SIGNは、L-SIGNに対して特異的な抗体を使用して、単球誘導DC上で検出されなかった(図3C)。従って、リンパ節中の特有の細胞型は、両方のSIGN分子でなく一方のSIGN分子を発現すること：L-SIGNは、肝臓中で存在する場合は、内皮細胞によって発現される一方、DC-SIGNはリンパ節のT細胞領域におけるDCによって発現されるということが見出された。発現パターンにおけるこの差異は、配列相同性に基づいて予測され得なかった。

【0009】

肝臓洞様毛細血管は、内皮内層に接着する在住マクロファージの存在によって特徴付けられる特定の毛細血管である。LSEC白血球の相互作用(これは、細胞表面上での接着分子の発現を必要とする)は、肝臓中の末梢免疫サーベイランスの中心的機構を構成する。

マンノースレセプターならびに他の同時刺激レセプター（MHCクラスII、CD80およびCD86）は、LSEC上で発現されること、およびリンパ器官中においてDCに類似の様式で、循環からの多くの潜在的抗原性タンパク質のクリアランスを媒介することが知られている。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、L-SIGNがLSEC上のレセプターのこの分類に適合するということを確立した、なぜならその組織部位およびリガンド結合特性は、抗原クリアランスにおいて、ならびにLSEC白血球接着において、このレセプターに対する生理学的役割に強く関係しているからである。アポトーシス細胞上のICAM-3の高発現は、これらの細胞が肝臓中でL-SIGN発現細胞によって捕捉され、続いて除去される手段である。

10

【0011】

DC-SIGNのように、L-SIGNは、HIV-1感染を増強する膜関連レクチンである。肝臓洞様毛細血管におけるL-SIGNの発現は、LSEC（通過する白血球と頻りに接触する）が血液からHIV-1を捕獲し、そして、T細胞のtrans感染を促進するというを示す。

【0012】

さらに、LSEC自身は、HIV-1感染に対して感受性であり得る。従って、L-SIGNがこれらの細胞の感染を促進し、その結果、肝臓洞様毛細血管を通過するT白血球を与えるような新しいウイルスの生成のためのレザバーを樹立することが、可能となる。

20

【0013】

上記の知見に基づいて、本発明は、動物（特に、ヒトまたは別の哺乳動物）中の免疫応答を調節する（特に減少させる）ための組成物の調製における、洞様毛細血管内皮層の細胞表面上のC型レクチンに結合する化合物の使用に関する。洞様毛細血管内皮層の細胞表面上のC型レクチンは、特にL-SIGNである。

【0014】

洞様毛細血管内皮層の細胞は、肝臓洞様毛細血管内皮の細胞（LSEC）またはリンパ節の洞様毛細血管領域の細胞のいずれかによって構成される。

【0015】

本発明の組成物は、洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）とICAM-2および/またはICAM-3を発現する細胞（特にT細胞）との間の1つ以上の相互作用を調節する（特に減少させる）ために使用され得る。より特に、この組成物は、洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）とICAM-2および/またはICAM-3を発現する細胞（特にT細胞）との間で、特に、LSECの表面上のC型レクチンとT細胞の表面上のICAMレセプター（特にT細胞の表面上のICAM-2レセプターまたはICAM-3レセプター）との間での接着を調節する（特に減少させる）ために使用される。

30

【0016】

本発明に従って調製される組成物は、耐性誘導、免疫治療、免疫抑制、自己免疫疾患の処置、および/またはアレルギーの処置に関して、特異的抗体に対する免疫応答を予防または阻害するために、適用される。

40

【0017】

さらなるその局面に従って、本発明は、洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）のHIV感染を阻害するため（特に、HIV表面タンパク質（すなわちgp120）の洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）の表面への接着により、HIVの上記細胞への侵入を阻害するため）の、組成物の調製における、洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）の表面上のC型レクチンに結合するか、または結合し得る化合物の使用に関する。

【0018】

本発明はさらに、洞様毛細血管内皮層の細胞（それ自身を感染させ得るかまたはさせ得ない）（特に、LSEC）由来のHIVの非感染T細胞への移動を阻害するための組成物の

50

調製において、洞様毛細血管内皮層細胞（特に、L S E C）の表面上のC型レクチンに結合するか、または結合し得る化合物の使用に関する。

【0019】

あるいは、本発明は、調節するための組成物の調製において、（特に、上記抗原に対する動物（特に、ヒトまたは他の哺乳動物）における免疫応答を生成、増大、および/または促進する際に、）以下の組合せの使用を提供する：1）洞様内皮層細胞（特に、L S E C）の表面上のC型レクチンに結合し、そしてそれに付着する化合物；2）抗原またはそのフラグメントもしくは一部。好ましくは、この抗原は、C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されるか、または、融合され得る。この抗原は、例えば、この抗原もしくは感染症に対するワクチンで使用されるような抗原を含むか、または発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を生成するために使用され得る癌抗原から、選択される。

10

【0020】

洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上のC型レクチンに結合し得る化合物は、好ましくは、以下からなる群から選択される：マンノース炭水化物（例えば、マンナンおよびD-マンノース）；フコース炭水化物（例えば、L-フコース）；植物レクチン（例えば、コンカナバリンA）；抗生物質（例えば、パラジミシンA）；糖（例えば、N-アセチル-D-グルコサミンおよびガラクトース）；タンパク質（例えば、gp120およびそのアナログまたはフラグメント）；および洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面で発現されるようなC型レクチンに対して特異的な抗体、またはその一部、フラグメントもしくはエピトープ。

20

【0021】

洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面のC型レクチンは、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するタンパク質、またはその天然の変異体もしくは等価物である。

【0022】

あるいは、洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面のC型レクチンに結合し得る化合物は、モノクローナル抗体、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンに対して特異的であるモノクローナル抗体、またはその天然の変異体もしくは等価物；および/またはその一部、フラグメントもしくはエピトープである。

【0023】

そのさらなる局面に従って、本発明は、抗体、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンに対して特異的であるモノクローナル抗体、またはその天然の変異体もしくは等価物；および/または、その一部、フラグメントまたはエピトープに関する。この抗体は、好ましくはA Z N - D 3であり、これは、実施例中に記載の方法によって取得可能である。

30

【0024】

本発明はさらに、少なくとも1つのこのような抗体、ならびに少なくとも1つのキャリア、賦形剤、アジュバントおよび/または処方物に関する。

【0025】

本発明の別の局面は、以下の組合せに関する：1）洞様毛細血管内皮層の細胞（特にL S E C）の表面上のC型レクチンに結合し、；そしてそれに付着する化合物；2）抗原またはそのフラグメントもしくは一部。好ましくは、この抗原は、C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されるか、またはこれと融合される。

40

【0026】

本発明に従う組合せにおいて、抗原は、例えば、この抗原、もしくは感染症に対するワクチンで使用されるような抗原を含むか、または発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を生成するために使用され得る癌抗原から、選択される。

【0027】

洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上のC型レクチンに結合し得る化合物は、好ましくは、以下からなる群から選択される：マンノース炭水化物（例えば、マンナンおよびD-マンノース）；フコース炭水化物（例えば、L-フコース）；植物レクチ

50

ン（例えば、コンカナバリン A）；抗生物質（例えば、プラジマイシン A）；糖（例えば、N - アセチル - D - グルコサミンおよびガラクトース）；タンパク質（例えば、gp 120 およびそのアナログまたはフラグメント）；および洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面で発現されるような C 型レクチンに対して特異的な抗体、またはその一部、フラグメントまたはエピトープ。

【0028】

本発明の抗体はさらに、生物学的サンプルにおける洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の検出、ならびに生物学的サンプルまたは培養培地からの洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の単離、調製および/または精製において、使用され得る。

【0029】

あるいは、このような抗体は、C 型レクチン（特に、図 7 のアミノ酸配列を有する C 型レクチンまたはその天然変異体もしくは等価物）；および/または生物学的サンプル中のその一部、フラグメントまたはエピトープの、存在および/または発現を決定するためのアッセイにおける用途を見出し得る。

【0030】

さらに、本発明は、生物学的サンプルまたは培養培地から洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）を生成、単離および/または精製するための方法に関連し、以下の工程：

a) 生物学的サンプルまたは上記細胞を含む培養培地を、本発明に従う抗体と接触させる工程；

b) 上記抗体に結合する細胞を、上記抗体に結合しない細胞、必要に応じて、サンプルまたは培地の任意のさらなる成分から分離する工程；

を包含し、そして、必要に応じて、さらに以下の工程：

c) 上記抗体由来の抗体に結合する細胞を分離する工程、を包含する。

【0031】

好ましくは、この抗体は、カラムもしくはマトリクスに、（常）磁性ビーズに、または同様の固体支持体に連結される。試験される生物学的サンプルは、生物学的流体（例えば、血液、血漿またはリンパ液）であり得る。

【0032】

最後に、本発明は、上記の方法を介して取得される洞様内皮層の細胞（例えば、LSEC）を提供する。

【0033】

本発明はさらに、続く実施例（そしてこれは、以下の図表に対して言及する）において、例示される。

【実施例】

【0034】

（材料および方法）

（1. DC - SIGN cDNA および LD2 cDNA の特徴付け）  
全 DC - SIGN cDNA 配列および L - SIGN cDNA 配列を、それぞれ、登録番号 AF290886 および AF290887 で GenBank に提出した。L - SIGN cDNA 配列は、エキソン 4 中に 6 つの繰り返しを含む改変体を表す。転写物の 5' 末端および 3' 末端（DC - SIGN mRNA の 3' 末端を除く）を、5' RACE（Clontech, Palo Alto, CA）によって決定した。DC - SIGN mRNA の 3' 末端の長さを、ノーザン分析データ（転写物サイズ）、ならびに 1.3 kb の DC - SIGN cDNA 配列（Curtis, B.M. ら, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 8356 ~ 8360）に特異的な順方向プライマーおよび DC - SIGN の断言的な 3' 末端の下流にマッピングされたいくつかの GenBank EST（例えば、AI472111、AA454170）に特異的な逆方向プライマーを用いた RT - PCR データに基づいて見積もられる。L - SIGN の全コード配列（nt 39 ~ 1184、GenBank AF290887）を含む cDNA フラグメントを、ヒト胎盤 mRNA（Clontech）から増幅し、そして発現ベクタ

10

20

30

40

50

— p c D N A 3 . 1 / V 5 - H i s / T O P O ( p c D N A 3 - L - S I G N ) および p C D M 8 ( p C D M 8 - L - S I G N ) 中にクローン化した。

【 0 0 3 5 】

( 2 . 放射性ハイブリッド ( R H ) マッピング )

D C - S I G N 特異的プライマーおよび L - S I G N 特異的プライマーを用いた P C R ベースの R H マッピングを、 Genebridge 4 R H パネル ( Research Genetics , Huntsville , AL ) を用いて実行した。P C R の結果を、Sanger センターの遺伝子マップサーバー ( http : / / www . sanger . ac . uk / Software / Rhserver ) に提出した。遺伝子に連結されるマーカの染色体位置を、Genatlas データベース ( http : / / web . citi 2 . fr / GENATLAS ) および Marshfield Clinic ( Marshfield , WI , http : / / research . marshfieldclinic . org / genetics / ) によって提供されるヒト第 19 染色体の遺伝子マップを検索することによって決定した。 10

【 0 0 3 6 】

( 3 . L - S I G N および D C - S I G N エキソン 4 の遺伝子型分析 )

エキソン 4 中の繰り返し領域を、以下のプライマー対を用いて増幅した :

1 ) L - S I G N について、L 2 8、T G T C C A A G G T C C C C A G C T C C C、および L 3 2、G A A C T C A C C A A A T G C A G T C T T C A A A T C ;

2 ) D C - S I G N について、D L 2 7、T G T C C A A G G T C C C C A G C T C C、および D I 4 R、C C C C G T G T T C T C A T T T C A C A G。 20

サイクルの条件は以下のとおりである : 9 4 で 5 秒間、および 6 8 で 1 分間。対立遺伝子を、アガロースゲル電気泳動およびエチジウムプロミド染色によって区別した。

【 0 0 3 7 】

( 4 . ノーザンプロット分析 )

培養されたヒト未熟 D C 由来の総 R N A ( 以下を参照のこと ) を、Trizol ( Life Technologies , Rochville , MD ) を用いて単離した。10 μ g の単離した R N A を、1 % アガロースゲル上で電気泳動し、記載されるように ( Chomczynski , P . 1992 . Anal Biochem 201 : 134 ~ 139 )、Hybond - XL ( Amersham Pharmacia Biotech , B 30 ackinghamshire , England ) に移し、そして 2 つのヒト多組織ノーザンプロット ( Clontech ) と共にノーザン分析に使用した。3 つのプローブを、経時的にプロットにハイブリダイズさせた :

1 ) L - S I G N 特異的プローブ ( nt 100 ~ 183、GenBank AF290887 )、

2 ) D C - S I G N および L - S I G N の両方を認識するプローブ ( nt 1 ~ 1233、GenBank AF290886 )、ならびに

3 ) アクチンコントロールプローブ ( Clontech )。

【 0 0 3 8 】

ハイブリダイゼーション手順を、製造者の仕様書 ( Clontech ) に沿って実行した。 40

【 0 0 3 9 】

( 5 . 抗体 )

抗 D C - S I G N m A b A Z N - D 1 および A Z N - D 2 を、前述した ( Geijtenbeek , T . B . ら、2000b、Cell 100 : 575 ~ 585 )。m A b

A Z N - D 3 を、D C - S I G N および L - S I G N の両方を染色する能力について、

T H P - 1 - D C - S I G N 細胞 ( Geijtenbeek , T . B . ら、2000a、Cell 100 : 587 ~ 597 ) で、免疫化した B A L B / c マウスのハイブリドマ

の上清をスクリーニングすることによって得た。抗 D C - S I G N m A b A Z N - D 2 はまた、K 5 6 2 - L - S I G N 細胞の染色によって最初に測定されたように ( デー 50

タは示されていない)、L-SIGNと交差反応する。抗L-SIGNウサギ抗血清を、2つのL-SIGN特異的ペプチド、PTTSGIRLFPRDおよびWNDNRCDVDNYWを用いて免疫化することによって作製した(Veritas, Inc. Laboratories, Rockville, MD)。

【0040】

(6.細胞)

DCを、500U/ml IL4および800U/ml GM-CSF(Scherin g-Plough, Brussels, Belgium)の存在下で単球から培養した(Sallusto, F., およびA. Lanzavecchia, 1994, J Exp Med 179:1109~1118; Romani, N.ら, 1994, J Exp Med 180:83~93)。7日目に、細胞は、高レベルのMHCクラスIおよびII、M2(CD11b)、X2(CD11c)、DC-SIGNおよびICAM-1、中低度のレベルのLFA-1およびCD86、ならびに低レベルのCD14、を、フローサイトメトリーによって測定されるように発現した。L-SIGNを発現する適切なK562トランスフェクト体(K562-L-SIGN)を、電気穿孔法によるpCDM8-L-SIGNプラスミドおよびpGK-neoベクターとのK562の同時トランスフェクトによって作製した(Lub, M.ら, 1997, Mol Biol Cell 8:719~728)。適切なK562-DC-SIGNトランスフェクト体を、pRc/CMV-DC-SIGN(2)を用いて同様の様式で作製した。THP-1-DC-SIGN細胞を、前述した(Geijtenbeek, T. B.ら, 2000b, Cell 100:575~585)。

【0041】

適切なTHP-1-L-SIGNトランスフェクト体を、pcDNA3-L-SIGNを用いたTHP-1細胞の電気穿孔法、G418耐性についての選択、およびmAb AZN-D3を用いたL-SIGN発現についての陽性選別によって作製した。全ての細胞株を、示されたような特異的サイトカインまたは抗生物質要求物に加えて10%ウシ胎児血清を補充されたRPMI培地中で維持した。K562およびTHP-1は、単球細胞株である。

【0042】

HEK293Tは、SV-40大T抗原の単一の温度感受性対立遺伝子を含むヒト胚性腎臓細胞である。GHOST細胞は、ヒト骨肉腫細胞由来のHIV-指示細胞である(Cecilia, D.ら, 1998, J Virol 72:6988~6996)。Hut/CCR5細胞は、CCR5で安定に形質導入される形質転換されたヒトT細胞株Hut78である。

(7.蛍光ビーズ接着アッセイ)

カルボキシレート修飾TransFluorSpheres(488/645nm、1.0µm; Molecular Probes, Eugene, OR)を、ICAM-1について前述したように、ICAM-3でコートした(Geijtenbeek, T. B.ら, 1999, Blood 94:754~764)。蛍光ビーズを、以下のようにM向性HIV-1<sub>MN</sub>エンベロープ糖タンパク質gp120でコートした: ストレプトアビジンでコートした蛍光ビーズを、ビオチン化F(ab')<sub>2</sub>フラグメントウサギ抗ヒツジIgG(6µg/ml; Jackson Immunoresearch)でインキュベートし、続いてヒツジ抗gp120抗体D7324(Aalto Bio Reagents Ltd, Dublin, Ireland)と共に4で一晚インキュベートした。このビーズを洗浄し、そして250ng/mlの精製したHIV-1 gp120(NIH AIDS Research and Reference Reagent Programを介してImmunodiagnos tics, Incによって提供される)と共に4で一晚インキュベートした。

【0043】

蛍光ビーズ接着アッセイを、Geijtenbeekら(1999, 前出)によって記載

されるように実行した。手短には、細胞を、 $5 \times 10^6$  細胞/mlの最終濃度で接着緩衝液(20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM  $CaCl_2$ 、2 mM  $MgCl_2$ 、0.5% BSA)に再懸濁した。50,000の細胞を、mAb(20  $\mu$ g/ml)と共に室温で10分間プレインキュベートした。リガンドでコーティングした蛍光ビーズ(20ビーズ/細胞)を添加し、そしてその懸濁物を、37で30分間インキュベートした。接着を、FACSscan(Becton Dickinson, Oxnard, CA)上でフローサイトメトリーを用いて、蛍光ビーズに結合した細胞のパーセントを測定することによって、決定した。

#### 【0044】

(8. 1次ヒト肝臓洞様毛細血管内皮細胞(LSEC)におけるL-SIGNの検出) 10  
肝臓組織を、書面による同意を受けた後に、肝臓手術を受けた患者から入手した。1次ヒト肝臓細胞の単離を、前述のように行った(Hegenbarth, S.ら、2000, Hum Gene Ther 11:481~486)。細胞を、Williams E培地を補充されたコラーゲンI型コーティング組織培養プレート上で培養した(Hild, M.ら、1998, J Virol 72:2600~2606)。単離の後日、肝臓細胞を、Texas-Red標識オボアルブミン(10  $\mu$ g/ml)(Molecular Probes, Leiden, Netherlands)と共に2時間インキュベートし、そして穏やかなトリプシン処理によってマトリクスから分離した。細胞を、ウサギ抗-L-SIGN抗血清、続いてヤギ-抗ウサギIg FITC(Dianova, Hamburg, Germany)で染色し、そしてCellQuestソフトウェアを用いて 20  
FACSscan(Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)で分析した。オボアルブミン摂取は、共焦点顕微鏡を用いた、内皮細胞特異的マーカー(アセチル化LDL)とオボアルブミン陽性細胞との共染色によって立証されるように、LSECのみの特徴であり、Kupffer細胞の特徴ではない。

#### 【0045】

(9. HIV-1 感染アッセイ)  
感染アッセイを、以前に記載されるように(Geijtenbeek, 2000a、前出; Geijtenbeek 2000b、前出)行った。偽型HIV-1ストックを、ホタルシフェラーゼリポーター遺伝子を含むプロウイルスベクタープラスミドNL-Luc-E<sup>-</sup>R<sup>-</sup>(Connor, R.I.ら、1995, Virology 206: 30  
935-944)、および、ADAまたはJRF1いずれかのgp160エンベロープについての発現プラスミドを有する、HEK293T細胞のカルシウム-リン酸トランスフェクションによって産生した。ウイルス性ストックを、GHOST CXCR4/CCR5細胞および293T-CD4-CCR5細胞に対する限界希釈によって評価した。

#### 【0046】

HIV-1細胞捕捉アッセイにおいて、THP-1トランスフェクト体(250,000細胞)を発現するDC-SIGNまたはL-SIGNを、偽型HIV-1(標的細胞濃度に関して約0.1の感染多重度)とともに、0.5 mlの総体積で3時間プレインキュベートして、ウイルスを細胞吸収させた。3時間のインキュベーションの後、2容積のPBSで細胞を洗浄し、そして、1 mlの細胞培養培地中の10  $\mu$ g/mlのポリブレンの存在下で、Hut/CCR5標的(100,000細胞)とともにTHP-1トランスフェクト体を共培養した。3日後に細胞溶解物を得、そしてルシフェラーゼ活性について分析した。 40

#### 【0047】

対照的に、最適以下のウイルス濃度(代表的には、0.05 m.o.i.未満)を用いて、洗浄工程なしでHIV-1増強アッセイを行った。簡単に述べると、DC-SIGNまたはL-SIGNトランスフェクト体(50,000細胞)を、同一のウイルス濃度(偽型HIV-1または複製コンピテントM指向性株HIV-1<sub>JR-CSF</sub>)でインキュベートし、そして2時間後、活性化されたT細胞(100,000細胞)を添加した。数日後に細胞溶解物を得、そしてルシフェラーゼ活性またはp24抗原レベルのいずれかにつ 50

いて分析した。IL-2 (10 U/ml) および PHA (10 µg/ml) の存在下で 2 日間、T 細胞を培養することによって、T 細胞を活性化した。

#### 【0048】

(10. 免疫組織化学的分析)

以前に記載されたように (Geijtenbeek, 2000b, 前出)、組織凍結切片の染色を行った。組織の凍結切片 (8 µ) を、100% アセトン中で固定し (10 分間)、PBS で洗浄し、そして 1 次抗体 (10 µg/ml) とともに 37 °C で 60 分間インキュベートした。洗浄後、ABC-PO/ABC-AP Vectastain キット (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて、製造業者のプロトコルに従って最終的な染色を行った。ヘマトキシリンを用いて、核の染色を行った。

10

#### 【0049】

(結果)

(1. DC-SIGN および L-SIGN のゲノムマップ)

ヒト BAC クローン CTD-2102F19 配列 (現在、GenBank (AC008812) において利用可能である) (図 1) からの情報を用いて、DC-SIGN/L-SIGN 遺伝子座の細密なマップを決定した。DC-SIGN および L-SIGN は、15.7 kb 離れて、ヘッドを向かい合わせた (head to head) 方向で位置付けられる。RH マッピングは、DC-SIGN および L-SIGN が、よりテロメア方向に位置付けられた DC-SIGN を有するマーカー D19S912 (11.1 を超えるロッドスコア値) の近くの染色体 19p13.2-3 に位置付けられていることを示した。RH データと一致して、D19S912 マーカーは、BAC 配列における L-SIGN に対して、約 37 kb 動原体方向の距離で見出される。

20

#### 【0050】

(2. L-SIGN のエキソン 4 における多型性)

DC-SIGN および L-SIGN の両方のエキソン 4 は、23 アミノ酸の繰り返し単位をコードする 69 bp の反復を含有する。これらの反復は、糖質認識ドメインと SIGN 分子の膜貫通ドメインとの間にネックを形成する。胎盤 mRNA から単離された L-SIGN cDNA クローンは、遺伝子のコード領域全体を含有したが、Soilleux ら (2000, 前出) によって報告された cDNA において同定された 7 つの総反復と対照的に、エキソン 4 に対応する配列において 6 つのみの総反復しか存在しなかった。このことは、L-SIGN の反復領域が多型性であることを示した。350 人の白人個体におけるエキソン 4 の分析は、反復の数 (3 ~ 9 の範囲にわたる) に基づく 7 つの対立遺伝子の存在が示し、これらの対立遺伝子のうちの最も共通するものは、7 つの反復 (表 1) を含有する対立遺伝子であった。150 人の白人における DC-SIGN エキソン 4 の分析からは、いかなる変動も示さなかった。

30

#### 【0051】

(3. DC-SIGN および L-SIGN のノーザン分析)

L-SIGN mRNA は、コード領域全体にわたって、DC-SIGN mRNA に対して約 90% の類似性を示すが、これらの遺伝子のエキソン 2 配列の間には 53% のみの類似性しか存在しない。従って、エキソン 2 配列を用いて、ノーザン分析において L-SIGN 特異性であったプローブ (84 nt) を産生した。このプローブは、肝臓およびリンパ節において、約 1.9 kb、2.6 kb および 4.2 kb のサイズの mRNA にハイブリダイズし、そして胸腺において、弱い 1.9 kb のバンドが検出された (図 2A)。この 1.9 kb のバンドは、リンパ節および胎児肝臓において顕著であり、L-SIGN の予測サイズに対応する。上側のバンド (このうちの 1 つ (2.6 kb) は、成体肝臓において顕著である) は、選択的転写であるようであるが、RACE 技術および RT-PCR 技術は、長さが変化する非翻訳領域の存在も、選択的スプライス改変体の存在も示していない。

40

#### 【0052】

50

DC-SIGNのコード領域全体を含有する1.2 kbのフラグメント(このフラグメントは、DC-SIGN mRNAとL-SIGN mRNAとの両方を、それらの高い類似性に起因して認識する)を用いて、ノーザンプロットを再プローブした(図2B)。再び、肝臓、リンパ節および胎児肝臓において、L-SIGN転写を表すバンドが観察された。さらに、DC-SIGNを表す4.3 kbの転写物を、単球由来DCおよびリンパ節において検出し、胎盤、脾臓、胸腺、およびおそらく肝臓において、より低い量で検出した。

#### 【0053】

L-SIGN mRNAはまた、より高感度のRT-PCR技術を用いて、胎盤およびDCにおいて検出されたが、これらの組織における発現レベルはあまりにも低すぎて、ノーザンハイブリダイゼーションにより検出できない。同じ程度の感度で、DC-SIGN転写物とL-SIGN転写物の両方を認識するプローブは、明らかに、2つの遺伝子産物の示差的組織分布を示した：L-SIGNは主に肝臓およびリンパ節において転写され、それに対しDC-SIGNは、DCおよびDCに適應する組織において特異的に発現される(図2)。L-SIGN mRNAは、DC、末梢血リンパ球、または脾臓のいずれにおけるノーザン分析によっても検出されない(図2)。

10

#### 【0054】

(4. L-SIGNは、ヒトLSECによって発現され、そしてDCによっては発現されない)

インビボでL-SIGN分子を発現する細胞を同定するために、1対の抗DC-SIGN mAb(このうちの一方(AZN-D3)はL-SIGNと交差反応し、それに対して他方(AZN-D1)は、DC-SIGN特異的であった)を用いて免疫組織化学的分析を行った(図3A)。ノーザン分析から推測されるように、肝臓組織の弱い染色が、DC-SIGN特異的mAb AZN-D1を用いて観察され(図3B)、そしてこの抗体を用いて検出される希な細胞は、おそらく肝臓に存在するDCである。対照的に、mAb AZN-D3は、肝臓の類洞に沿った細胞を明るく染色した(図3B)。

20

#### 【0055】

内皮細胞特異的マーカーCD31に対するモノクローナル抗体は、肝臓の連続切片において類似の染色パターンを呈し(データは示さず)、L-SIGNがLSECによって発現されることを示した。この考察を支持するために、一次ヒトLSECを、オブアルブミンの取り込み(これは、LSECに特有の性質である)によって他の肝臓細胞と区別し、そしてL-SIGNの発現について直接試験した。ポリクローナル抗L-SIGN抗体でのLSECの染色は、L-SIGNが、肝臓内のこれらの細胞によって排他的に発現されることを示した(図3C)。

30

#### 【0056】

AZN-D1およびAZN-D3はともに、リンパ節を同程度によく染色した(データは示さず)。しかし本発明者らは、L-SIGN特異的ポリクローナル抗体を用いて、L-SIGNが単球由来のDCによっては発現されないことを見出した(図3D)。このことは、ノーザン分析からの結論を支持する。DC-SIGNおよびL-SIGNは、リンパ節において、異なる型の細胞によって発現される。

40

#### 【0057】

(5. L-SIGNは、ICAM-3およびHIV-1 gp120を結合させる)  
ICAM-3およびHIV-1<sub>MN</sub> gp120はともに、Ca<sup>2+</sup>依存様式で、高い親和性でDC-SIGNに結合することが示されている。フローサイトメトリーベースの接着アッセイ(Gei j t e n b e e k, 1999、前出)を用いて、L-SIGNを用いてトランスフェクトされたK562細胞は、高い親和性でICAM-3に結合することを示した(図4A)。このL-SIGN媒介結合は、DC-SIGN/L-SIGN特異的mAb(AZN-D2およびAZN-D3)、マンナン、またはEGTAによって阻害されたが、DC-SIGN特異的mAb(AZN-D1)によっては阻害されなかった。このことは、L-SIGNがICAM-3に対して高い親和性を有する、マンノース結合C

50

型レクチンとして機能することを実証する。L-SIGNはまた、HIV-1<sub>MN</sub> gp120にも結合し得た(図4B)。偽性トランスフェクト細胞は、ICAM-3にもHIV-1<sub>MN</sub> gp-120にも結合しなかった(データは示さず)。

【0058】

(6. L-SIGNはHIV-1感染を増強する)

HIV-1 gp120への、L-SIGNの高親和性結合は、L-SIGNが感染性HIV-1と結合し得、そしてイントランスでの標的細胞の感染を増強し得る可能性を挙げた。HIV-1感染におけるトランスレセプターとしてのL-SIGNの役割を試験するために、DC-SIGNまたはL-SIGNのいずれかを発現するTHP-1細胞を、M指向性HIV-1<sub>JRFL</sub>エンベロープ糖タンパク質で偽型化された、単回感染性HIV-1ルシフェラーゼを用いてパルスし、洗浄して未結合のウイルスを除去し、そしてHIV-1感染に対して許容的である標的細胞とともにインキュベートした。3日後に、感染を評価した。L-SIGNトランスフェクト化THP-1細胞およびDC-SIGNトランスフェクト化THP-1細胞はともに、感染性HIV-1を捕捉し、そしてウイルスを標的細胞に透過させたが、偽性トランスフェクト化THP-1細胞は透過させなかった(図5A)。

10

【0059】

次に、L-SIGNが限界濃度のHIV-1を補足し得るか否か、および、感染を促進する許容細胞に対してウイルスが有効に存在するか否かを調査した。DC-SIGNあるいはL-SIGN、または偽性トランスフェクト化細胞を発現するHEK293T細胞を、HIV-1<sub>ADA</sub>エンベロープ糖タンパク質を用いて偽型化された、低力価のHIV-1ルシフェラーゼとともにインキュベートした。次いで、未洗浄の細胞を、活性化T細胞とともに共培養した。HIV-1でパルスされた、偽性トランスフェクト化HEK293T細胞から、標的細胞の最小感染を観察した(図5B)。しかし、L-SIGNを用いてトランスフェクトされたHEK293T細胞は、イントランスでのT細胞のHIV-1感染を増強した(図5B)。DC-SIGN媒介増強は、交差反応性AZN-D2抗体で阻害されたが、L-SIGNについては部分的な阻害が観察された。マンナンは、両方のSIGN分子による増強を有効に阻害した。

20

【0060】

T細胞のHIV-1感染を増強するL-SIGNの能力を評価するための類似の実験を、複製コンピテントウイルスを用いて行った。L-SIGN、DC-SIGNおよび空のベクターを用いてトランスフェクトされたK562細胞を、M指向性HIV-1<sub>JR-CSF</sub>株とともに、低ウイルス濃度で2時間インキュベートし、次いで、活性化T細胞とともに共培養した(図5C)。ウイルス複製は、偽性トランスフェクト化K562細胞を用いて、観察されなかったが、L-SIGNトランスフェクト体は、HIV-1を標的細胞に透過させ、ウイルス複製を生じた。DC-SIGN/L-SIGN特異的抗体であるAZN-D2を用いるHIV-1複製の殆ど完全な阻害は、HIV-1感染を増強するこれらのレセプターの特異性を示した。従って、肝臓内で、おそらくリンパ節内でも、L-SIGNを発現する非DC系列細胞はまた、HIV-1を捕捉し、リンパ球に透過させる能力を有する。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】DC-SIGN/L-SIGN遺伝子マップの略図。物理学的距離および遺伝子配向は、BACクローンCTD-2102F19(GenBank AC008812)から提供される配列に基づく。

【図2】DC-SIGNおよびL-SIGNのノーザンプロット分析。4.3kb(黒いヘッドを有する矢印)および1.9kb(白ぬきのヘッドを有する矢印)のサイズの位置は、左に記される。(A)L-SIGN特異的プローブとのハイブリダイゼーションは、肝臓、リンパ節における遺伝子の発現、および胸腺における遺伝子の弱い発現を示す。(B)両方の遺伝子を認識するプローブとのハイブリダイゼーション。4.3kbのバンド

50

は、DC-SIGN mRNAを表す。L-SIGN特異的プローブ(図3A)を用いる肝臓およびリンパ節において明白な明るい上部のバンド(約4.2 kb)は、プローブの特異性、強度パターン、およびサイズにおけるわずかな差異に起因してDC-SIGN mRNA(4.3 kb)と異なる。(C) - アクチンcDNAコントロールプローブを用いたプロットの再プローブ化。

【図3A】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(A)抗体AZN-D1は、DC-SIGN特異的であるが、AZN-D3は、L-SIGNと交差反応する。適切なDC-SIGNおよびL-SIGN K562トランスフェクト体を、AZN-D1またはAZN-D3のいずれかで染色した。

【図3B】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(B)ヒト肝臓におけるDC-SIGNおよびL-SIGN発現の免疫組織化学的分析。一連の区分を、AZN-D1(DC-SIGN特異的)またはAZN-D3(DC-SIGNおよびL-SIGNの両方を検出する)のいずれかを用いて染色した。AZN-D1は、DC(矢印)であり得る細胞を余り染色しないが、AZN-D3は、シヌソイドを描く細胞を染色する。

【図3C】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(C)肝臓中のL-SIGNの発現は、LSECに制限される。単離の1日後、1次ヒト肝臓細胞を、蛍光色素標識オボアルブミンと共にインキュベートした。L-SIGN発現を、L-SIGN特異的ポリクローナル抗体を用いて間接的な免疫蛍光によって決定した。オボアルブミンを摂取した細胞(LSEC)およびオボアルブミンを摂取しなかった細胞(肝細胞および他のレジデント肝細胞)は、それぞれ実線および破線によって表され、それぞれの細胞集団にゲーティングすることによって表される。 $2 \times 10^5$ 細胞を分析した。

【図3D】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(D)L-SIGNは、単球由来のDCによって発現されない。GM-CSFおよびIL-4の存在下で単球から培養された、未熟DCは、FACSscan分析によって決定されるように、抗L-SIGNポリクローナル抗体で染色されない。実線は、抗L-SIGNポリクローナル血清を用いた染色を示すが、点線(実線の下に隠れる)は、ウサギ前免疫血清を用いた染色を表す。

【図4】L-SIGNは、ICAM-3(A)およびHIV-1 gp120(B)に結合する。K562-L-SIGN細胞およびK562-DC-SIGN細胞へのICAM-3およびgp120の接着を、蛍光ビーズ接着アッセイ(Geijtenbeek, T. B.ら、1999, Blood 94:754~764)を用いて測定した。y軸は、リガンドでコーティングされた蛍光ビーズと結合する細胞のパーセントを表す。L-SIGN交差反応mAb AZN-D2(20  $\mu$ g/ml)およびAZN-D3(20  $\mu$ g/ml)は、DC-SIGN特異的mAb AZN-D1(20  $\mu$ g/ml)と対照的に、L-SIGNに対するICAM-3およびgp120の接着を阻害する。K562トランスフェクト体に対するICAM-3およびgp120両方の接着はまた、マンナン(20  $\mu$ g/ml)またはEGTA(5 mM)のいずれかによって阻害される。mockトランスフェクト体に対する両方のリガンドの接着は、5%未満であった。3つのうち1つの代表的な実験が示される(SD < 5%)。

【図5A】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(A)L-SIGNは、HIV-1を捕獲し、そしてこれを標的細胞へ伝達する。適切なDC-SIGNまたはL-SIGN発現THP-1トランスフェクト体を、HIV-1 luc/JRFLシュードビリオンと共にブレインキュベートして、ウイルスの捕獲を可能にした。細胞を洗浄し、そしてTHP-1トランスフェクト体を、Hut/CCR5標的細胞と共に同時培養した。細胞溶解物を、3日後に入手し、そしてルシフェラーゼ活性について分析した。用いられた各同時培養条件について、mock感染コントロールは、活性において一様に100計測数/秒未満であった。各データセットは、感染細胞の4つの別々のウェルの平均を表す。2つのうち1つの代表的な実験が示される。

【図5B】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(B)L-SIGNは、シュード型のHIV-1によってT細胞の感染を増強する。HEK293T細胞を、cDNAをコードするDC-SIGN、L-SIGNまたは空のベクターで過渡的にトランスフェクトした。コントロール細胞を、AZN-D2(20µg/ml)またはマンナン(20µg/ml)と共にプレインキュベートした。少量のシュード型HIV-1<sub>ADA</sub>を、前記のような活性化T細胞と一緒に添加した(Geijtenbeek, T.B.ら、2000, Cell 100:587~597)。感染性を、ルシフェラーゼ活性を測定することによって2日後に決定した。実行された2つのうち1つの代表的な実験が示される。各実験を、3連のウェルで実行した。

【図5C】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(C)L-SIGNは、複製コンピテントHIV-1によってT細胞の感染を増強する。L-SIGNおよびDC-SIGN両方の適切なK562トランスフェクト体を、低ウイルス濃度の複製コンピテントM向性株HIV-1<sub>JR-CSF</sub>(TCID<sub>50</sub> 100/ml)と共にインキュベートした。特異性を決定するために、細胞を、AZN-D2(20µg/ml)と共にプレインキュベートした。2時間後、活性化T細胞を、上記のように添加した(Geijtenbeek, T.B.ら、2000, Cell 100:575~585)。培養上清を、K562-T細胞同時培養の14日後に収集し、そしてHIV-1産生性をELISAを用いて測定してp24抗原レベルを決定した。コントロール実験において、同じ量のウイルスを、T細胞に直接添加した。3つのうち1つの代表的な実験が示される。各データセットは、感染細胞の3つの別々のウェルの平均を表す。

【図6】L-SIGNのコードDNA配列。

【図7】L-SIGNのアミノ酸配列。

【図2】

【図3A】

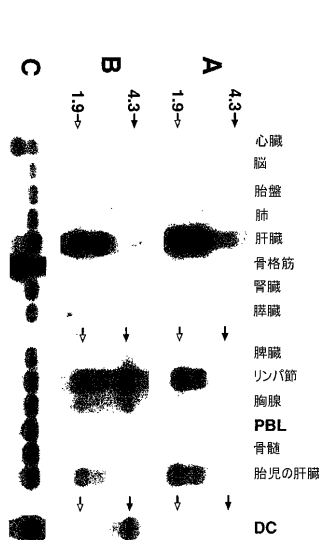


Fig.2

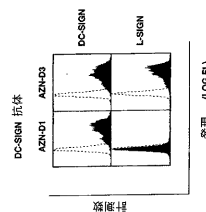


Fig.3A

【 図 3 C 】

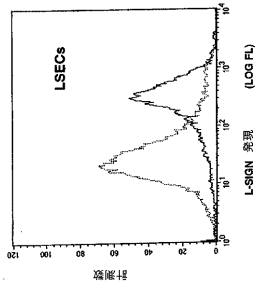


Fig.3C

【 図 3 D 】

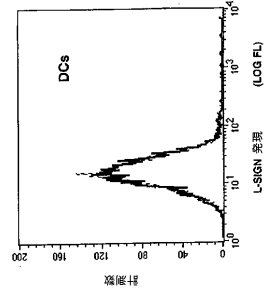


Fig. 3D

【 図 4 】

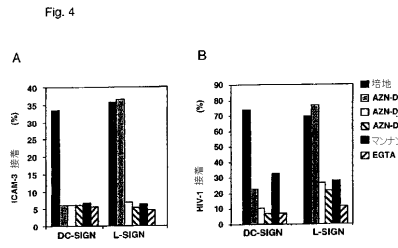
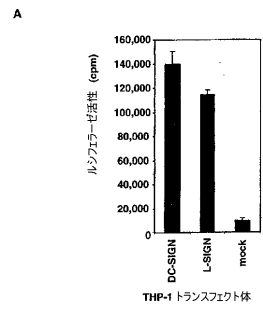


Fig. 4

【 図 5 A 】

Fig. 5A



A

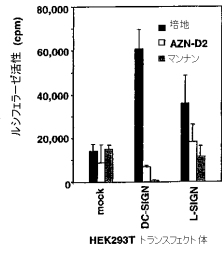
【 図 5 B 】

【 図 5 C 】

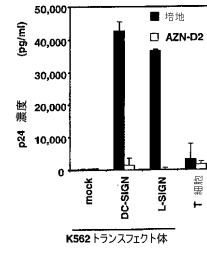
Fig. 5B

Fig. 5C

B



C



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 June 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/50119 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 16/00
- (21) International Application Number: PCT/EP01/15392
- (22) International Filing Date:  
21 December 2001 (21.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
00128143.5 21 December 2000 (21.12.2000) EP  
01200944.5 13 March 2001 (13.03.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT [NL/NL]; Geert Groteplein 9, NL-6525 EZ Nijmegen (NL).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): FIGDOR, Carl, Gustav [NL/NL]; Westwal 54, NL-5211 DD Den Bosch (NL). GELTENBEEK, Teunis, Bernard, Herman [NL/NL]; Weezenhof 3471, NL-6536 GR Nijmegen (NL). VAN KOOYK, Yvette [NL/NL]; Poggenbeekstraat 5, NL-6813 KD Arnhem (NL). TORENSMA, Ruurd [NL/NL]; Neushoornstraat 6, NL-6531 RP Nijmegen (NL).
- (74) Agent: VAN SOMEREN, Petronella, Francisca, Hendrika, Maria; Arnold & Siedsma, Sweelinckplein 1, NL-2517 GK The Hague (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/50119 A2

(54) Title: METHOD FOR MODULATING THE BINDING ACTIVITY OF A NOVEL ICAM-3 BINDING RECEPTOR ON SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS IN LIVER AND LYMPH NODES

(57) Abstract: The invention relates to the use of a compound that binds to a C-type lectin on the surface of a sinusoid endothelial layer, in the preparation of a composition for modulating, in particular reducing, the immune response in animal, in particular a human or another mammal. The sinusoid endothelial layer may be either constituted by liver sinusoid endothelial cells (LSEC) or by the lymph node sinusoid zone.

METHOD FOR MODULATING THE BINDING ACTIVITY OF A NOVEL  
ICAM-3 BINDING RECEPTOR ON SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS  
IN LIVER AND LYMPH NODES

5           The present invention relates to the use of a  
compound binding to a C-type lectin located on the  
surface of sinusoid endothelial cells in liver and lymph  
nodes for modulating the immune response in animals.

          The molecule DC-SIGN has recently been  
10 identified as a DC-specific adhesion receptor that  
mediates the interaction between DCs and resting T cells  
through high affinity binding to ICAM-3, thereby  
facilitating the initiation of primary immune responses.  
DC-SIGN was shown to be identical to the previously  
15 reported type II membrane-associated C-type lectin  
(Geijtenbeek, T.B. et al., 2000, Cell 100:575-585) that  
binds HIV-1 envelope glycoprotein gp120 in a CD4-  
independent manner. The affinity of DC-SIGN exceeds that  
of CD4 for HIV-1 gp120 (Curtis, B.M. et al., 1992, Proc  
20 Natl Acad Sci USA 89:8356-8360), and upon capture of HIV-  
1, DC-SIGN does not appear to promote viral entry into  
the DC itself, but rather enhances infection of T cells  
in trans (Geijtenbeek, T.B. et al., 2000, Cell 100:587-  
597). DC-SIGN-associated HIV-1 remains infectious over a  
25 prolonged period of time, perhaps contributing to the  
infectious potential of the virus during its transport by  
DCs from the periphery to lymphoid organs.

          A previous search by Yokoyama-Kobayashi et al.  
(1999, Gene 228:161-167) for cDNA clones encoding type II  
30 membrane proteins resulted in the identification of a  
partial clone that was homologous, but not identical to  
the cDNA encoding the molecule now known as DC-SIGN. The  
putative protein product contained a deletion of 28 amino  
acids in the cytoplasmic domain and was lacking the  
35 entire C-type lectin domain relative to the cDNA encoding  
DC-SIGN.

          More recently, Soilleux et al. (2000, J Immunol  
165:2937-2942) described the full length cDNA sequence of

CONFIRMATION COPY

WO 02/50119

2

PCT/EP01/15392

the related gene, which they called DC-SIGNR. The genomic organization of DC-SIGN and DC-SIGNR was compared, indicating a high degree of similarity. Concomitant expression of the two genes in placenta, endometrium, and 5 stimulated KG1 cells (a cell line that phenotypically resembles myeloid DCs) was observed, although the expression of DC-SIGNR was very low in both endometrium and stimulated KG1 cells.

In the research that led to the present 10 invention it was now found that the DC-SIGNR gene is expressed at considerably high levels in only two tissues, liver and lymph node, but not in monocyte derived dendritic cells. The receptor was renamed "L-SIGN" because it is a liver/lymph node-specific ICAM-3 15 grabbing nonintegrin.

The homologous human C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN appear to be the products of a recent gene duplication. The corresponding proteins share the same domain organization and overlapping, if not completely 20 identical, ligand specificity. The most diverse region of these molecules occurs in their cytoplasmic tails.

Another obvious difference between the genes for DC-SIGN and L-SIGN is the repeat polymorphism in exon 4 of L-SIGN, which is conserved in DC-SIGN (Table 1). The 25 neck domain of L-SIGN may contain from three to nine repeats while DC-SIGN always consisted of seven repeats among the Caucasians tested. No difference was observed between L-SIGN molecules containing six or L-SIGN molecules containing seven repeats in ligand binding, nor 30 HIV-1 capture and enhancement experiments.

Although the SIGN genes have maintained sequence and functional similarity over their evolutionary history, it was now surprisingly found according to the invention that regulatory elements 35 determining their tissue distribution have evolved along unique paths. Northern analysis of mRNA expression clearly indicated expression of DC-SIGN in monocyte-derived DCs and in tissues where DCs reside, whereas

WO 02/50119

3

PCT/EP01/15392

expression of L-SIGN in DCs was undetectable (Fig. 2). Further, L-SIGN was not detected on monocyte-derived DCs using antibodies specific to L-SIGN (Fig. 3C). Thus, it was found that unique cell types in the lymph node  
5 express one, but not both SIGN molecules: L-SIGN is expressed by endothelial cells, as it is in liver, while DC-SIGN is expressed by DCs in T cell area of lymph node. This difference in expression pattern could not be expected based on the sequence homology.

10 Liver sinusoids are specialized capillary vessels characterized by the presence of resident macrophages adhering to the endothelial lining. The LSEC-leukocyte interactions, which require expression of adhesion molecules on the cell surfaces, constitute a  
15 central mechanism of peripheral immune surveillance in the liver. The mannose receptor as well as other costimulatory receptors such as MHC class II, CD80, and CD86 are known to be expressed on LSECs and to mediate the clearance of many potentially antigenic proteins from  
20 the circulation in a manner similar to DCs in lymphoid organs.

The inventors established that L-SIGN fits in this category of receptors on LSECs, as its tissue location and ligand binding properties strongly implicate  
25 a physiologic role for this receptor in antigen clearance, as well as in LSEC-leukocyte adhesion. The high expression of ICAM-3 on apoptotic cells are the means by which these cells are trapped by L-SIGN-expressing cells in the liver and subsequently cleared.

30 Like DC-SIGN, L-SIGN is a membrane-associated lectin that enhances HIV-1 infection. The expression of L-SIGN in liver sinusoids indicates that LSECs, which are in continual contact with passing leukocytes, capture HIV-1 from the blood and promote trans-infection of T  
35 cells.

In addition, LSECs themselves may be susceptible to HIV-1 infection. Thus, it is possible that L-SIGN promotes infection of these cells thereby

establishing a reservoir for production of new virus to pass on to T lymphocytes trafficking through the liver sinusoid.

Based on the above observations, the present invention relates to the use of a compound that binds to a C-type lectin on the surface of cells of a sinusoid endothelial layer, in the preparation of a composition for modulating, in particular reducing, the immune response in a animal, in particular a human or another mammal. The C-type lectin on the surface of cells of a sinusoid endothelial layer is in particular L-SIGN.

The cells of the sinusoid endothelial layer may either be constituted by liver sinusoid endothelial cells (LSEC) or cells of the lymph node sinusoidal zone.

The composition of the invention may be used for modulating, in particular reducing, one or more interactions between a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, and a cell expressing ICAM-2 and/or ICAM-3, in particular a T cell. More in particular, the composition is used for modulating, in particular reducing, the adhesion between a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, and a cell expressing ICAM-2 and/or ICAM-3, in particular a T cell, in particular between a C-type lectin on the surface of a LSEC and an ICAM receptor on the surface of a T cell, in particular an ICAM-2 or ICAM-3 receptor on the surface of a T cell.

The composition prepared according to the invention is applied for preventing or inhibiting immune responses to specific antigens, for inducing tolerance, for immunotherapy, for immunosuppression, for the treatment of autoimmune diseases, and/or for the treatment of allergy.

According to a further aspect thereof, the invention relates to the use of a compound that binds or can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of the sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, in the preparation of a composition for inhibiting the HIV

infection of cells of a sinusoid endothelial layer, in particular LSECs, in particular for inhibiting the adhesion of HIV surface protein (i.e gp120) to the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC and thereby the entry of HIV into said cell.

The invention furthermore relates to the use of a compound that binds or can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, in the preparation of a composition for inhibiting the transfer of HIV from cells of a sinusoid endothelial layer (that may or may not be infected themselves), in particular a LSEC, to non-infected T cells.

Alternatively, the invention provides the use of a combination of: 1) a compound that binds to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in a particular a LSEC; and attached thereto: 2) an antigen or a fragment or part thereof; in the preparation of a composition for modulating, in particular generating, increasing and/or promoting, an immune response in an animal, in particular a human or other mammal, against said antigen. Preferably, the antigen is covalently bonded to or fused with the compound that can bind to the C-type lectin. The antigen is for example chosen from cancer antigens which can be used to generate an immune response against tumor cells that contain or express said antigen, or antigens as used in vaccines against infectious diseases.

The compound that can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, is preferably chosen from the group consisting of mannose carbohydrates, such as mannan and D-mannose; fucose carbohydrates, such as L-fucose; plant lectins such as concanavalin A; antibiotics, such as pradimicin A; sugars such as N-acetyl-D-glucosamine and galactose; proteins such as gp120 and analogs or fragments thereof; and antibodies directed against a C-

WO 02/50119

6

PCT/EP01/15392

type lectin as expressed on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, or a part, fragment or epitope thereof.

The C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, is preferably a protein with the amino acid sequence of Figure 7, or a natural variant or equivalent thereof.

Alternatively, the compound that can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, is a monoclonal antibody, preferably a monoclonal antibody directed against a C-type lectin with the amino acid sequence of Figure 7 or a natural variant or equivalent thereof; and/or a part, fragment or epitope thereof.

According to a further aspect thereof the invention relates to an antibody, preferably monoclonal antibody, directed against a C-type lectin with the amino acid sequence of Figure 7 or a natural variant or equivalent thereof; and/or a part, fragment or epitope thereof. This antibody is preferably AZN-D3, which is obtainable by a method as described in the examples.

The invention further relates to a pharmaceutical composition, containing at least one such antibody and at least one carrier, excipient, adjuvant and/or formulant.

Another aspect of the present invention relates to a combination of: 1) a compound that binds to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC; and attached thereto: 2) an antigen or a fragment or part thereof. Preferably, the antigen is covalently bonded to or fused with the compound that can bind to the C-type lectin.

In a combination according to the invention the antigen is for example chosen from cancer antigens which can be used to generate an immune response against tumor cells that contain or express said antigen, or antigens as used in vaccines against infectious diseases.

WO 02/50119

7

PCT/EP01/15392

The compound that can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, is preferably chosen from the group consisting of mannose carbohydrates, such as mannan and 5 D-mannose; fucose carbohydrates, such as L-fucose; plant lectins such as concanavalin A; antibiotics, such as pradimicin A; sugars such as N-acetyl-D-glucosamine and galactose; proteins such as gp120 and analogs or fragments thereof; and antibodies directed against a C-  
10 type lectin as expressed on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, or a part, fragment or epitope thereof.

The antibodies of the invention can furthermore be used in the detection of cells of a sinusoid  
15 endothelial layer, in particular LSECs, in a biological sample and in the isolation, preparation and/or purification of cells of a sinusoid endothelial layer, in particular LSECs, from a biological sample or a culture medium.

20 Alternatively, such antibody can find an application in an assay for determining the presence and/or the expression of C-type lectins, in particular a C-type lectin with the amino acid sequence of Figure 7 or a natural variant or equivalent thereof; and/or a part,  
25 fragment or epitope thereof, in a biological sample.

Furthermore, the invention relates to a method for producing, isolating and/or purifying cells of a sinusoid endothelial layer, in particular LSECs, from a biological sample or a culture medium, comprising the  
30 steps of:

- a) contacting a biological sample or a culture medium that contains said cells with an antibody according to the invention;
  - b) separating the cells that bind to said  
35 antibody from cells that do not bind to said antibody, and optionally from any further constituents of the sample or medium;
- and optionally further comprises the step of:

c) separating the cells that bind to the antibody from said antibody.

Preferably, the antibody is attached to a column or matrix, to (para)magnetic beads or to a similar solid support. Biological samples to be tested may be biological fluids such as blood, plasma or lymph fluid.

Finally, the invention provides cells of a sinusoid endothelial layer, in particular LSECs, obtained via the method described above.

10 The present invention is further illustrated in the example that follows and in which reference is made to the following figures:

**Figure 1.** Schematic representation of the DC-SIGN / L-SIGN genetic map. Physical distances and gene  
15 orientation are based on the sequence provided from BAC clone CTD -2102F19 (GenBank AC008812).

**Figure 2.** Northern blot analysis of DC-SIGN and L-SIGN. Positions of the 4.3 kb (arrows with solid heads) and 1.9 kb (arrows with open heads) sizes are marked on  
20 the left. (A) Hybridization with the L-SIGN-specific probe indicating expression of the gene in liver, lymph node, and weakly in thymus. (B) Hybridization with the probe recognizing both genes. 4.3 kb bands represent DC-SIGN mRNA. The light upper band (~ 4.2 kb) evident in  
25 liver and lymph node using the L-SIGN-specific probe (Fig. 3A) is distinct from DC-SIGN mRNA (4.3 kb) due to the specificity of the probe, intensity patterns, and slight differences in size. (C) Reprobing of the blots with the  $\beta$ -actin cDNA control probe.

30 **Figure 3.** L-SIGN is expressed on LSECs and not on monocyte-derived DCs. (A) The antibody AZN-D1 is DC-SIGN-specific whereas AZN-D3 cross-reacts with L-SIGN. Stable DC-SIGN and L-SIGN K562 transfectants were stained with either AZN-D1 or AZN-D3. (B) Immunohistochemical  
35 analysis of DC-SIGN and L-SIGN expression in the human liver. Serial sections were stained with either AZN-D1 (DC-SIGN-specific) or with AZN-D3 (detects both DC-SIGN and L-SIGN). AZN-D1 stains infrequent cells that may be

WO 02/50119

9

PCT/EP01/15392

DCs (arrows), whereas AZN-D3 stains cells lining sinusoids. (C) Expression of L-SIGN in liver is restricted to LSECs. One day after isolation, primary human liver cells were incubated with fluorochrome labeled ovalbumin. L-SIGN expression was determined by indirect immunofluorescence using an L-SIGN-specific polyclonal antibody. Cells that have taken up ovalbumin (LSECs) and those that did not take up ovalbumin (hepatocytes and other resident hepatic cells) are represented by solid and broken lines, respectively, by gating on the respective cell populations.  $2 \times 10^5$  cells were analyzed. (D) L-SIGN is not expressed by monocyte-derived DCs. Immature DCs, cultured from monocytes in the presence of GM-CSF and IL-4, do not stain with anti-L-SIGN polyclonal antibody, as determined by FACScan analysis. Solid line indicates staining with anti-L-SIGN polyclonal serum, whereas stippled line (hidden under solid lane) represents staining with rabbit pre-immune serum.

**Figure 4.** L-SIGN binds ICAM-3 (A) and HIV-1 gp120 (B). Adhesion of ICAM-3 and gp120 to the K562-L-SIGN and K562-DC-SIGN cells was measured with the fluorescent bead adhesion assay (Geijtenbeek, T.B. et al., 1999, Blood 94:754-764). The y-axis represents the percent cells binding ligand-coated fluorescent beads. The L-SIGN-cross-reacting mAb AZN-D2 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) and AZN-D3 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibit the adhesion of ICAM-3 and gp120 to L-SIGN, in contrast to the DC-SIGN-specific mAb AZN-D1 (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Adhesion of both ICAM-3 and gp120 to the K562 transfectants is also inhibited by either mannan (20  $\mu\text{g/ml}$ ) or EGTA (5mM). Adhesion of both ligands to mock transfectants was less than 5%. One representative experiment out of three is shown (SD<5%).

**Figure 5.** L-SIGN captures and enhances infection of T cells with HIV-1 *in trans*. (A) L-SIGN captures HIV-1 and transmits it to target cells. Stable DC-SIGN or L-SIGN expressing THP-1 transfectants were pre-incubated with HIV-luc/JRFL pseudovirions to allow

capture of the virus. Cells were washed and THP-1 transfectants were co-cultured with Hut/CCR5 target cells. Cell lysates were obtained after 3 days and analyzed for luciferase activity. For each of the co-culture conditions employed, mock infected controls were uniformly less than 100 counts per second in activity. Each data set represents the mean of four separate wells of infected cells. One representative experiment out of two is shown. (B) L-SIGN enhances infection of T cells by pseudotyped HIV-1. HEK293T cells were transiently transfected with cDNA encoding DC-SIGN, L-SIGN or empty vector. Control cells were preincubated with AZN-D2 (20  $\mu$ g/ml) or mannan (20  $\mu$ g/ml). Low amounts of pseudotyped HIV-1<sub>ADA</sub> were added together with activated T cells as described previously (Geijtenbeek, T.B. et al., 2000, Cell 100: 587-597). Infectivity was determined after two days by measuring luciferase activity. One representative experiment of two performed is shown. Each experiment was done in triplicate wells. (C) L-SIGN enhances infection of T cells by replication competent HIV-1. Stable K562 transfectants of both L-SIGN and DC-SIGN were incubated with low virus concentrations of replication-competent M-tropic strain HIV-1<sub>JR-CSF</sub> (TCID<sub>50</sub> 100/ml). To determine the specificity, cells were preincubated with AZN-D2 (20  $\mu$ g/ml). After two hours, activated T cells were added as described previously (Geijtenbeek, T.B. et al., 2000, Cell 100:575-585). Culture supernatants were collected at day 14 after K562-T cell co-culture and HIV-1 production was measured using ELISA to determine p24 antigen levels. In control experiments, the same amount of virus was added directly to T cells. One representative experiment out of three is shown. Each data set represents the mean of three separate wells of infected cells.

Figure 6. Coding DNA sequence of L-SIGN

Figure 7. Amino acid sequence of L-SIGN.

**EXAMPLE****MATERIALS AND METHODS**1. Characterization of DC-SIGN and LD2 cDNA

The full DC-SIGN and L-SIGN cDNA sequences were submitted to GenBank under accession numbers AF290886 and AF290887, respectively. The L-SIGN cDNA sequence represents a variant containing 6 repeats in exon 4. The 5' and 3' ends of the transcripts (except 3' end of the DC-SIGN mRNA) were determined by 5'RACE (Clontech, Palo Alto, CA). The length of the 3' end of the DC-SIGN mRNA was estimated based on Northern analysis data (transcript size), and RT-PCR data using forward primers specific for the 1.3 kb DC-SIGN cDNA sequence (Curtis, B.M. et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:8356-8360) and reverse primers specific for several GenBank ESTs (e.g. AI472111, AA454170) mapping downstream of alleged 3' end of DC-SIGN. A cDNA fragment containing the full coding sequence of L-SIGN (nt 39 to 1184, GenBank AF290887) was amplified from human placental mRNA (Clontech) and cloned into the expression vectors pcDNA3.1/V5-His/TOPO (pcDNA3-L-SIGN) and pCDM8 (pCDM8-L-SIGN).

2. Radiation hybrid (RH) mapping

PCR-based RH mapping with DC-SIGN- and L-SIGN-specific primers was performed using the Genebridge 4 RH panel (Research Genetics, Huntsville, AL). The PCR results were submitted to the Gene Map server at the Sanger Center (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rhserver>). The chromosomal position of markers linked to the genes was determined searching the GenAtlas database (<http://web.cit12.fr/GENATLAS>) and the genetic map of human chromosome 19 provided by the Marshfield Clinic (Marshfield, WI, <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>).

3. Genotype analysis of L-SIGN and DC-SIGN exon 4

The repeat region in exon 4 was amplified with the following pairs of primers:

WO 02/50119

12

PCT/EP01/15392

1) L28, TGTCCAAGGTCCCCAGCTCCC, and L32, GAACTCACCAAAATGCAGTCTTCAAATC, for L-SIGN;  
2) DL27, TGTCCAAGGTCCCCAGCTCC, and DI4R, CCCC GTTCTCATTTCACAG, for DC-SIGN. The cycle conditions were as follows: 94°C for 5 sec and 68°C for 1 min. Alleles were distinguished by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

#### 4. Northern blot analysis

10 Total RNA from cultured human immature DCs (see below) was isolated using Trizol (Life Technologies, Rockville, MD). Ten µg of the isolated RNA were electrophoresed on a 1% agarose gel, transferred to Hybond-XL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) as described (Chomczynski, P. 1992. Anal Biochem 201:134-139), and used for Northern analysis along with two human multiple tissue Northern blots (Clontech). Three probes were subsequently hybridized to the blots:  
1) an L-SIGN-specific probe (nt 100 to 183, GenBank AF290887),  
2) a probe recognizing both DC-SIGN and L-SIGN (nt 1 to 1233, GenBank AF290886) and  
3) an actin control probe (Clontech).  
Hybridization procedures were performed according to manufacturer specifications (Clontech).

#### 5. Antibodies

Anti-DC-SIGN mAb AZN-D1 and AZN-D2 were described previously (Geijtenbeek, T.B. et al., 2000b, Cell 100:575-585). mAb AZN-D3 was obtained by screening hybridoma supernatants of BALB/c mice immunized with THP-1-DC-SIGN cells (Geijtenbeek, T.B. et al., 2000a, Cell 100:587-597) for the ability to stain both DC-SIGN and L-SIGN. Anti-DC-SIGN mAb AZN-D2 also cross-reacts with L-SIGN, as was initially determined by staining of K562-L-SIGN cells (data not shown). Anti-L-SIGN rabbit antiserum was generated by immunization with two L-SIGN-specific

peptides, PTTSGIRLFPRD and WNDNRCDVDNYW (Veritas, Inc. Laboratories, Rockville, MD).

#### 6. Cells

5 DCs were cultured from monocytes in the presence of 500 U/ml IL4 and 800 U/ml GM-CSF (Schering-Plough, Brussels, Belgium) (Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. J Exp Med 179:1109-1118; Romani, N. et al., 1994, J Exp Med 180:83-93). At day 7 the cells  
10 expressed high levels of MHC class I and II,  $\alpha$ ME2 (CD11b),  $\alpha$ XE2 (CD11c), DC-SIGN and ICAM-1, moderate levels of LFA-1 and CD86, and low levels of CD14, as measured by flow cytometry. Stable K562 transfectants  
15 expressing L-SIGN (K562-L-SIGN) were generated by co-transfection of K562 with the pCDM8-L-SIGN plasmid and the pGK-neo vector by electroporation (Lub, M. et al., 1997, Mol Biol Cell 8:719-728). Stable K562-DC-SIGN  
transfectants were generated in a similar manner using pRc/CMV-DC-SIGN (2). THP-1-DC-SIGN cells were described  
20 previously (Geijtenbeek, T.B. et al., 2000b, Cell 100:575-585).

Stable THP-1-L-SIGN transfectants were generated by electroporation of THP-1 cells with pcDNA3-L-SIGN, selection for G418-resistance, and positive  
25 sorting for L-SIGN expression using mAb AZN-D3. All cell lines were maintained in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum in addition to specific cytokine or antibiotic requirements as indicated. K562 and THP-1 are monocytic cell lines.

30 HEK293T are human embryonic kidney cells containing a single temperature-sensitive allele of SV-40 large T antigen. GHOST cells are HIV-indicator cells derived from human osteosarcoma cells (Cecilia, D. et al., 1998, J Virol 72:6988-6996). Hut/CCR5 cells are the  
35 transformed human T cell line Hut78 stably transduced with CCR5.

7. Fluorescent beads adhesion assay

Carboxylate-modified TransFluorSpheres (488/645 nm, 1.0 $\mu$ m; Molecular Probes, Eugene, OR) were coated with ICAM-3 as was previously described for ICAM-1 (Geijtenbeek, T.B. et al., 1999, Blood 94:754-764). Fluorescent beads were coated with M-tropic HIV-1<sub>env</sub> envelope glycoprotein gp120 as follows: Streptavidin-coated fluorescent beads were incubated with biotinylated F(ab')<sub>2</sub> fragment rabbit anti-sheep IgG (6  $\mu$ g/ml; Jackson Immunoresearch) followed by an overnight incubation with sheep-anti-gp120 antibody D7324 (Aalto Bio Reagents Ltd, Dublin, Ireland) at 4°C. The beads were washed and incubated with 250 ng/ml purified HIV-1 gp120 (provided by Immunodiagnosics, Inc through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) overnight at 4°C.

The fluorescent beads adhesion assay was performed as described by Geijtenbeek et al. (1999, supra). Briefly, cells were resuspended in adhesion buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% BSA) at a final concentration of 5x10<sup>6</sup> cells/ml. 50,000 cells were pre-incubated with mAb (20  $\mu$ g/ml) for 10 min at room temperature. Ligand-coated fluorescent beads (20 beads/cell) were added and the suspension was incubated for 30 min at 37°C. Adhesion was determined by measuring the percentage of cells that bound fluorescent beads using flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson, Oxnard, CA).

8. Detection of L-SIGN on primary human liver sinusoidal endothelial cells (LSECs)

Liver tissue was obtained from a patient undergoing liver surgery after having received written consent. Isolation of primary human liver cells was performed as previously described (Hegenbarth, S. et al., 2000, Hum Gene Ther 11:481-486). Cells were cultured on collagen type I coated tissue culture plates in supplemented Williams E Medium (Hild, M. et al., 1998, J Virol 72:2600-2606). The day after isolation, liver

cells were incubated with Texas-Red labelled ovalbumin (10 µg/ml) (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) for two hours and detached from the matrix by gentle trypsin treatment. Cells were stained with rabbit anti-L-SIGN 5 antiserum followed by goat-anti-rabbit-Ig FITC (Dianova, Hamburg, Germany) and analyzed with a FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) using CellQuest software. Ovalbumin uptake was characteristic of LSECs only and not Kupffer cells, as verified by co-staining of ovalbumin-10 positive cells with an endothelial cell-specific marker, acetylated LDL, using confocal microscopy.

#### 9. HIV-1 infection assays

The infection assays were performed as 15 described previously (Geijtenbeek, 2000a, supra; Geijtenbeek 2000b, supra). Pseudotyped HIV-1 stocks were generated by calcium-phosphate transfections of HEK293T cells with the proviral vector plasmid NL-Luc-ER containing a firefly luciferase reporter gene (Connor, 20 R.I. et al., 1995, Virology 206:935-944) and expression plasmids for either ADA or JRFL gp160 envelopes. Viral stocks were evaluated by limiting dilution on GHOST CXCR4/CCR5 and 293T-CD4-CCR5 cells.

In HIV-1 cell capture assays, DC-SIGN or L-SIGN 25 expressing THP-1 transfectants (250,000 cells) were pre-incubated with pseudotyped HIV-1 (multiplicity of infection ~0.1 with regard to target cell concentration) in a total volume of 0.5 ml for 3 hr to allow cellular adsorption of the virus. After the 3 hr incubation, cells 30 were washed with 2 volumes PBS and the THP-1 transfectants were co-cultured with Hut/CCR5 targets (100,000 cells) in the presence of 10 µg/ml polybrene in 1 ml cell culture medium. Cell lysates were obtained after 3 days and analyzed for luciferase activity.

35 In contrast, HIV-1 enhancement assays utilized suboptimal concentrations of virus (typically <0.05 m.o.i.) without a wash step. Briefly, DC-SIGN or L-SIGN transfectants (50,000 cells) were incubated with

WO 02/50119

16

PCT/EP01/15392

identical virus concentrations (either pseudotyped HIV-1 or replication-competent M-tropic strain HIV-1<sub>JR-CSF</sub>), and after 2 hr activated T cells (100,000 cells) were added. Cell lysates were obtained after several days and  
5 analyzed for either luciferase activity or p24 antigen levels. T cells were activated by culturing them in the presence of IL-2 (10 U/ml) and PHA (10 µg/ml) for 2 days.

#### 10. Immunohistochemical analysis

10 Staining of the tissue cryosections was performed as described previously (Geijtenbeek, 2000b, supra). Cryosections (8 µ) of the tissues were fixed in 100% acetone (10 min), washed with PBS and incubated with the first antibody (10 µg/ml) for 60 min at 37°C. After  
15 washing, the final staining was performed with the ABC-PO/ABC-AP Vectastain kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to the manufacturer's protocol. Nuclear staining was performed with hematoxylin.

### 20 RESULTS

#### 1. Genomic map of DC-SIGN and L-SIGN

A fine map of the DC-SIGN/L-SIGN gene locus was determined using information from the human BAC clone CTD-2102F19 sequence, which is now available in GenBank  
25 (AC008812) (Fig. 1). DC-SIGN and L-SIGN are positioned in a head-to-head orientation 15.7 kb apart. RH mapping indicated that DC-SIGN and L-SIGN are located on chromosome 19p13.2-3 near the marker D19S912 (lod score values >11.1) with DC-SIGN positioned more telomeric. In  
30 agreement with the RH data, the D19S912 marker is found at a distance of about 37 kb centromeric to L-SIGN on the BAC sequence.

#### 2. Polymorphism in exon 4 of L-SIGN

35 Exon 4 of both DC-SIGN and L-SIGN contain repeats of 69 bp that encode repeating units of 23 amino acids. These repeats form a neck between the carbohydrate recognition domain and the transmembrane domain of the

SIGN molecules. The L-SIGN cDNA clone isolated from placental mRNA contained the entire coding region of the gene, but only 6 full repeats were present in the sequence corresponding to exon 4, in contrast to 7 full repeats identified in the cDNA reported by Soilleux et al. (2000, *supra*). This indicated that the repeat region of L-SIGN is polymorphic. Analysis of exon 4 in 350 Caucasian individuals showed the presence of seven alleles based on number of repeats (ranging from 3 to 9), the most common of which was the allele containing 7 repeats (Table 1). Analysis of DC-SIGN exon 4 in 150 Caucasians did not reveal any variability.

### 3. Northern analysis of DC-SIGN and L-SIGN

15 L-SIGN mRNA exhibits about 90% similarity to DC-SIGN mRNA over the entire coding region, but there is only 53% similarity between exons 2 of the genes. Therefore, exon 2 sequence was used to generate a probe (84 nt) that was L-SIGN specific in Northern analysis. 20 The probe hybridized to mRNA of about 1.9, 2.6 and 4.2 kb in size in liver and lymph node, and a weak 1.9 kb band was detected in thymus (Fig. 2A). The 1.9 kb band, which is prominent in lymph node and fetal liver, corresponds to the predicted size of L-SIGN. The upper bands (one of 25 which, 2.6 kb, is substantial in adult liver) are likely to be alternative transcripts, but RACE and RT-PCR techniques have not indicated the presence of untranslated regions varying in length nor alternative splice variants.

30 Northern blots were reprobed with a 1.2 kb fragment containing the entire coding sequence of DC-SIGN, which recognizes both DC- and L-SIGN mRNA due to their high sequence similarity (Fig. 2B). Once again, the bands representing L-SIGN transcripts were observed in 35 liver, lymph node and fetal liver. Additionally, a 4.3 kb transcript representing DC-SIGN was detected in monocyte-derived DCs and lymph node, and to a lesser extent in placenta, spleen, thymus, and possibly, liver.

L-SIGN mRNA was also detected in placenta and DCs using a more sensitive RT-PCR technique, but the level of expression in these tissues is too low to be detected by Northern hybridization. The probe which recognizes both DC-SIGN and L-SIGN transcripts with nearly equal sensitivity clearly indicated differential tissue distribution of the two gene products: L-SIGN is primarily transcribed in liver and lymph node, whereas DC-SIGN is specifically expressed in DCs and in tissues that accommodate DCs (Fig. 2). L-SIGN mRNA is not detected by Northern analysis in DCs, peripheral blood lymphocytes, nor spleen (Fig. 2).

4. L-SIGN is expressed by human LSECs and not by DCs

To identify the cells expressing L-SIGN molecules *in vivo*, immunohistochemical analysis was performed using a pair of anti-DC-SIGN mAbs, one of which, AZN-D3, cross-reacted with L-SIGN, whereas another, AZN-D1, was DC-SIGN-specific (Fig. 3A). As expected from the Northern analysis, poor staining of liver tissue was observed using the DC-SIGN-specific mAb AZN-D1 (Fig. 3B) and the rare cells detected with this antibody are probably DCs residing in liver. In contrast, the mAb AZN-D3 brightly stained cells lining the sinusoids of the liver (Fig. 3B).

Monoclonal antibodies against the endothelial cell-specific marker CD31 gave a similar staining pattern on serial liver sections (data not shown), showing that L-SIGN is expressed by LSECs. To support this idea, primary human LSECs were distinguished from the other hepatic cells by uptake of ovalbumin, which is a unique characteristic of LSECs, and were tested for expression of L-SIGN directly. Staining of LSECs with polyclonal anti-L-SIGN antibodies indicated that L-SIGN is expressed exclusively by these cells in liver (Fig. 3C).

Both AZN-D1 and AZN-D3 stained lymph node equally well (data not shown). However, using L-SIGN-specific polyclonal antibodies, we found that L-SIGN is

not expressed by monocyte-derived DCs (Fig. 3D), which supports conclusions from the Northern analysis. DC-SIGN and L-SIGN are expressed by different types of cells in the lymph node.

5

5. L-SIGN binds ICAM-3 and HIV-1 gp120

Both ICAM-3 and HIV-1<sub>gp120</sub> have been shown to bind with high affinity to DC-SIGN in a Ca<sup>2+</sup> dependent manner. Using a flow cytometry-based adhesion assay (Geijtenbeek, 1999, supra), K562 cells transfected with L-SIGN were shown to bind ICAM-3 with high affinity (Fig. 4A). The L-SIGN-mediated binding was inhibited by the DC-SIGN/L-SIGN-specific mAb AZN-D2 and AZN-D3, mannan, or EGTA, but not by the DC-SIGN-specific mAb AZN-D1, demonstrating that L-SIGN functions as a mannose binding C-type lectin with a high affinity for ICAM-3. L-SIGN was also able to bind to HIV-1<sub>gp120</sub> (Fig. 4B). Mock transfected cells did not bind either ICAM-3 or HIV-1<sub>gp120</sub> (data not shown).

20

6. L-SIGN enhances HIV-1 infection

High affinity binding of L-SIGN to HIV-1 gp120 raised the possibility that, L-SIGN might bind infectious HIV-1 and enhance infection of target cells in trans. To test the role of L-SIGN as a trans-receptor in HIV-1 infection, THP-1 cells expressing either DC-SIGN or L-SIGN were pulsed with single-round infectious HIV-luciferase pseudotyped with M-tropic HIV-1<sub>JRFL</sub> envelope glycoprotein, washed to remove unbound virus, and incubated with target cells permissive for HIV-1 infection. Infection was evaluated after three days. Both the L-SIGN- and DC-SIGN-transfected THP-1 cells captured infectious HIV-1 and transmitted the virus to target cells, while mock transfected THP-1 cells did not (Fig. 5A).

35

Next it was investigated whether L-SIGN would be able to capture a limiting concentration of HIV-1 and efficiently present the virus to the permissive cells

WO 02/50119

20

PCT/EP01/15392

promoting infection. HEK293T cells expressing DC-SIGN or L-SIGN, or mock transfected cells were incubated with low titers of HIV-luciferase pseudotyped with HIV-1<sub>ADA</sub> envelope glycoprotein. The unwashed cells were then co-  
5 cultured with activated T cells. Minimal infection of target cells was observed from mock transfected HEK293T cells pulsed with HIV-1 (Fig. 5B). However, HEK293T cells transfected with L-SIGN enhanced HIV-1 infection of T cells in trans (Fig. 5B). The DC-SIGN-mediated  
10 enhancement was inhibited with the crossreactive AZN-D2 antibody, while partial inhibition was observed for L-SIGN. Mannan efficiently inhibited enhancement by both SIGN molecules.

Similar experiments to evaluate the ability of  
15 L-SIGN to enhance HIV-1 infection of T-cells were performed using replication competent virus. K562 cells transfected with L-SIGN, DC-SIGN, and empty vector were incubated with the M-tropic HIV-1<sub>JR-CSF</sub> strain at low virus concentrations for 2 hours and subsequently cocultured  
20 with activated T cells (Fig. 5C). No viral replication was observed using mock transfected K562 cells, while L-SIGN transfectants transmitted HIV-1 to target cells, resulting in viral replication. Almost complete  
25 inhibition of HIV-1 replication with the DC-SIGN/L-SIGN-specific antibody AZN-D2 indicated the specificity of these receptors to enhance HIV-1 infection. Thus, non-DC lineage cells expressing L-SIGN within liver and possibly in lymph node also have the ability to capture and transmit HIV-1 to lymphocytes.

30

Table 1

Polymorphism of the repeat region in *L-SIGN* exon 4.

| No. of repeats | Allele frequency (%) |
|----------------|----------------------|
| 3              | 1 (0.3)              |
| 4              | 25 (3.6)             |
| 5              | 202 (28.9)           |
| 6              | 86 (12.2)            |
| 7              | 377 (53.9)           |
| 8              | 2 (0.3)              |
| 9              | 7 (1.0)              |

## CLAIMS

1. Use of a compound that binds to a C-type lectin on the surface of a sinusoid endothelial layer, in particular reducing, the immune response in a animal, in particular a human or another mammal.
2. Use according to claim 1, wherein the sinusoid endothelial layer is constituted by liver sinusoid endothelial cells (LSEC).
3. Use according to claim 1, wherein the sinusoid endothelial layer is constituted by the lymph node sinusoidal zone.
4. Use according to claim 1 and/or 2, in the preparation of a composition for modulating, in particular reducing, one or more interactions between a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, and a cell expressing ICAM-2 or ICAM-3, in particular a T cell.
5. Use according to claim 1 and/or 2 and/or 4, in the preparation of a composition for modulating, in particular reducing, the adhesion between a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, and a cell expressing ICAM-2 or ICAM-3, in particular a T cell, in particular between a C-type lectin on the surface of a LSEC and an ICAM receptor on the surface of a cell expressing ICAM-2 or ICAM-3, in particular a T cell, in particular an ICAM-2 or ICAM-3 receptor on the surface of a T cell.
6. Use according to any of claims 1-5, in the preparation of a composition for preventing or inhibiting immune responses to specific antigens, for inducing tolerance, for immunotherapy, for immunosuppression, for the treatment of autoimmune diseases, and/or for the treatment of allergy.
7. Use of a compound that binds or can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of the sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, in the

preparation of a composition for inhibiting the HIV infection of cells of a sinusoid endothelial layer, in particular LSECs, in particular for inhibiting the adhesion of HIV surface protein (i.e gp 120) to the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC and thereby the entry of HIV into said cell.

8. Use of a compound that binds or can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, in the preparation of a composition for inhibiting the transfer of HIV from cells of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, to non-infected T cells.

9. Use of a combination of: 1) a compound that binds to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in a particular a LSEC; and attached thereto: 2) an antigen or a fragment or part thereof; in the preparation of a composition for modulating, in particular generating, increasing and/or promoting, an immune response in an animal, in particular a human or other mammal, against said antigen.

10. Use according to claim 9, in which the antigen is covalently bonded to or fused with the compound that can bind to the C-type lectin.

11. Use according to claim 9 or 10, in which the antigen is chosen from cancer antigens which can be used to generate an immune response against tumor cells that contain or express said antigen, or antigens as used in vaccines against infectious diseases.

12. Use according to any of claims 1-11, in which the compound that can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, is chosen from the group consisting of mannose carbohydrates, such as mannan and D-mannose; fucose carbohydrates, such as L-fucose; plant lectins such as concanavalin A; antibiotics, such as pradimicin A; sugars such as N-acetyl-D-glucosamine and galactose; proteins such as gp120 and analogs or fragments thereof;

and antibodies directed against a C-type lectin as expressed on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, or a part, fragment or epitope thereof.

5 13. Use according to any of claims 1-11 in which the C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, is a protein with the amino acid sequence of Figure 7, or a natural variant or equivalent thereof.

10 14. Use according to claim 12 or 13, in which the compound that can bind to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, is a monoclonal antibody, preferably a monoclonal antibody directed against a C-type lectin with  
15 the amino acid sequence of Figure 7 or a natural variant or equivalent thereof; and/or a part, fragment or epitope thereof.

15 15. Antibody, preferably monoclonal antibody, directed against a C-type lectin with the amino acid sequence of Figure 7 or a natural variant or equivalent thereof; and/or a part, fragment or epitope thereof.

16. Antibody according to claim 15, which is AZN-D3.

25 17. Pharmaceutical composition, containing at least one antibody according to claim 15 or 16, and at least one carrier, excipient, adjuvant and/or formulant.

18. Combination of: 1) a compound that binds to a C-type lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC; and attached  
30 thereto: 2) an antigen or a fragment or part thereof.

19. Combination according to claim 18, wherein the antigen is covalently bonded to or fused with the compound that can bind to the C-type lectin.

35 20. Combination according to claim 18 or 19, in which the antigen is chosen from cancer antigens which can be used to generate an immune response against tumor cells that contain or express said antigen, or antigens as used in vaccines against infectious diseases.

21. Combination according to any of claims 18-  
20, in which the compound that can bind to a C-type  
lectin on the surface of a cell of a sinusoid endothelial  
layer, in particular a LSEC, is chosen from the group  
5 consisting of mannose carbohydrates, such as mannan and  
D-mannose; fucose carbohydrates, such as L-fucose; plant  
lectins such as concanavalin A; antibiotics, such as  
pradimicin A; sugars such as N-acetyl-D-glucosamine and  
galactose; proteins such as gp120 and analogs or  
10 fragments thereof; and antibodies directed against a C-  
type lectin as expressed on the surface of a cell of a  
sinusoid endothelial layer, in particular a LSEC, or a  
part, fragment or epitope thereof.

22. Use of an antibody according to claim 15 or  
15 16 in the detection of cells of a sinusoid endothelial  
layer, in particular LSECs, in a biological sample.

23. Use of an antibody according to claim 15 or  
16 in the isolation, preparation and/or purification of  
cells of a sinusoid endothelial layer, in particular  
20 LSECs, from a biological sample or a culture medium.

24. Use of an antibody according to claim 15 or  
16 in an assay for determining the presence and/or the  
expression of C-type lectins, in particular a C-type  
lectin with the amino acid sequence of Figure 6 or a  
25 natural variant or equivalent thereof; and/or a part,  
fragment or epitope thereof, in a biological sample.

25. Method for producing, isolating and/or  
purifying cells of a sinusoid endothelial layer, in  
particular LSECs, from a biological sample or a culture  
30 medium, comprising the steps of:

a) contacting a biological sample or a culture  
medium that contains said cells with an antibody  
according to claim 15 or 16;

b) separating the cells that bind to said  
35 antibody from cells that do not bind to said antibody,  
and optionally from any further constituents of the  
sample or medium;  
and optionally further comprises the step of:

WO 02/50119

26

PCT/EP01/15392

c) separating the cells that bind to the antibody from said antibody.

26. Method according to claim 25, in which the antibody is attached to a column or matrix, to 5 (para)magnetic beads or to a similar solid support.

27. Method according to claim 25 or 26, in which the biological sample is a biological fluid such as blood, plasma or lymph fluid.

28. Cells of a sinusoid endothelial layer, in 10 particular LSECs obtained via the method of claims 25 or 26.

Fig. 1

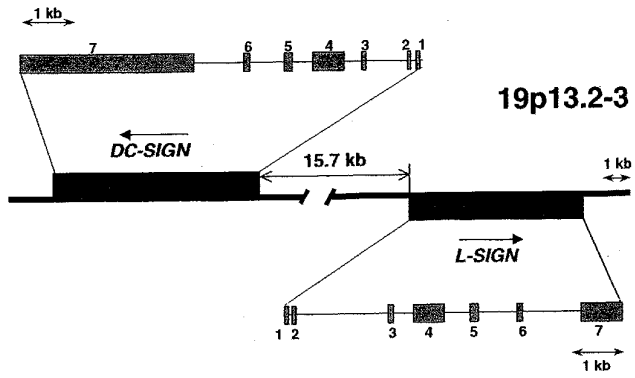


Fig.2

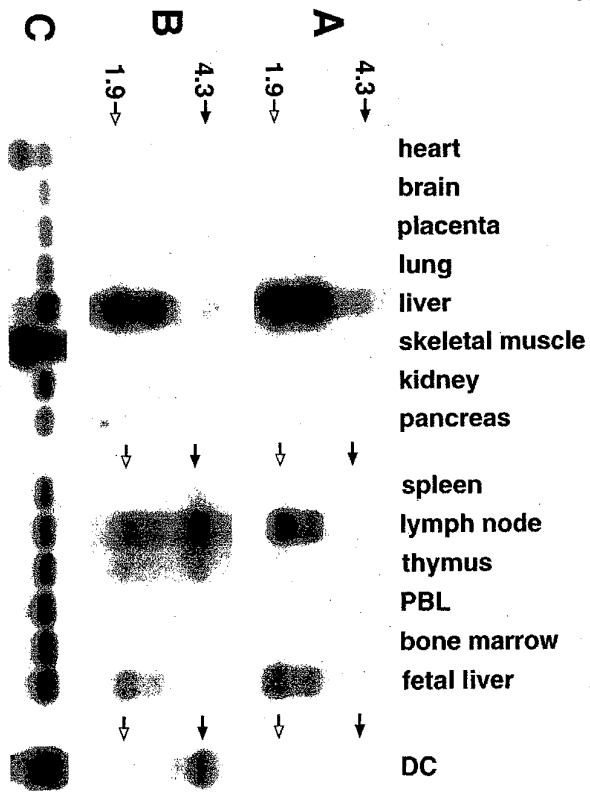


Fig. 3A

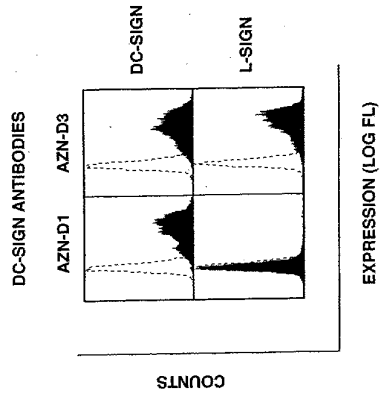
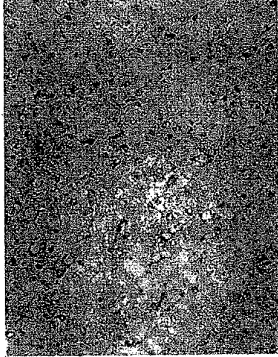
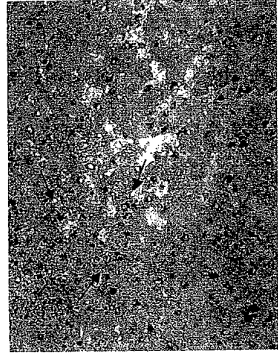


Fig.3B

AZN-D3



AZN-D1



WO 02/50119

5/12

PCT/EP01/15392

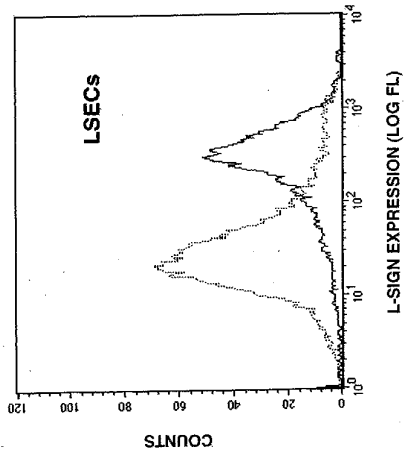


Fig.3C

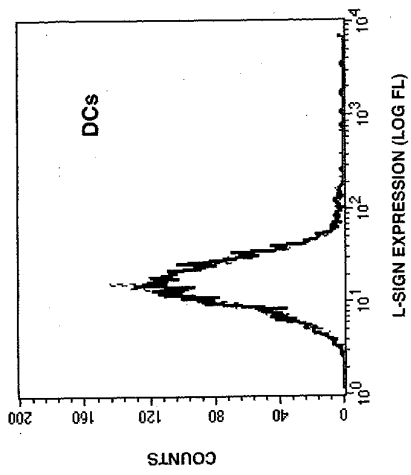


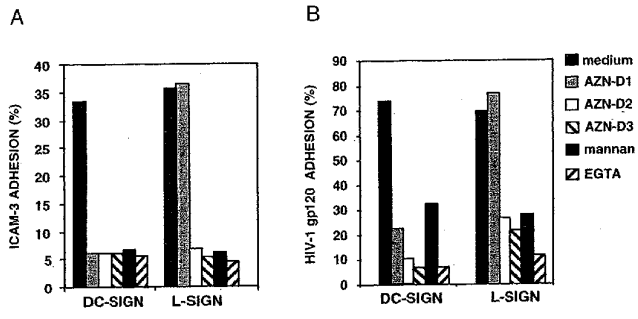
Fig. 3D

WO 02/50119

7/12

PCT/EP01/15392

Fig. 4



WO 02/50119

8/12

PCT/EP01/15392

Fig. 5A

A

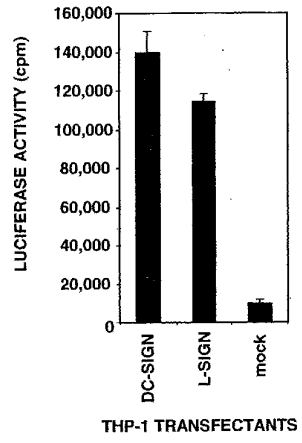


Fig. 5B

**B**

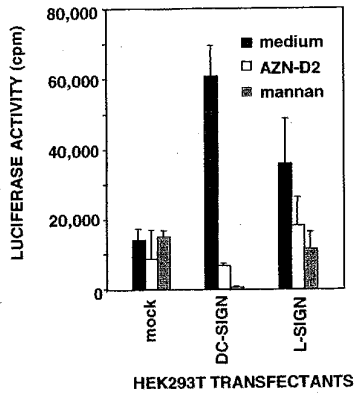
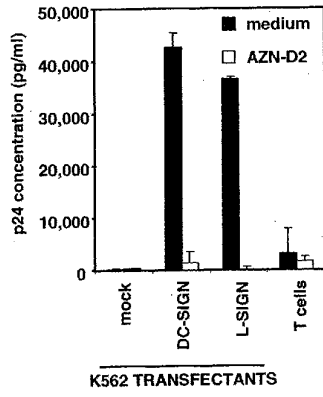


Fig. 5C

C



WO 02/50119

11/12

PCT/EP01/15392

Fig. 6

DNA sequence 1200 b.p. atgagtgactcc ... agagacgaatag linear

```

1/1 31/11
atg agt gac tcc aag gaa cca agg gtg cag cag ctg gcc ctc ctg gaa gaa gat cca aca
M S D S K E P R V Q Q L G L L E E D P T
61/21 91/31
acc agt gcc atc aga ctt ttt cca aga gac ttt caa ttc cag cag ata cat gcc cac aag
T S G I R L F P R D F Q F Q Q I H G H K
121/41 151/51
agc tct aca ggg tgt ctt gcc cat gcc gcc ctg gtg ctg caa ctc ctc tcc ttc atg ctc
S S T G C L G H G A L V L Q L L S F M L
181/61 211/71
ttg gct ggg gtc ctg gtg gcc aac ctt gtc caa gtg tcc aag gtc ccc agc tcc cta agt
L A G V L V A N L V Q V S K V P S S L S
241/81 271/91
cag gaa caa tcc gag caa gac gca atc tac cag aac ctg acc cag ctt aaa gct gca gtg
Q E Q S E Q D A I Y Q N L T Q L K A A V
301/101 331/111
ggc gag ctc tca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc cag ctg aag
G E L S E K S K L Q E I Y Q E L T Q L K
361/121 391/131
gct gca gtg ggt gag ttg cca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc
A A V G E L P E K S K L Q E I Y Q E L T
421/141 451/151
cgg ctg aag gct gca gtg ggt gag ttg cca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag
R L K A A V G E L P E K S K L Q E I Y Q
481/161 511/171
gag ctg acc cag ctg aag gct gca gtg ggt gag ttg cca gag aaa tcc aag ctg cag gag
E L T Q L K A A V G E L P E K S K L Q E
541/181 571/191
atc tac cag gag ctg acc cgg ctg aag gct gca gtg ggt gag ttg cca gag aaa tcc aag
I Y Q E L T R L K A A V G E L P E K S K
601/201 631/211
ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc cgg ctg aag gct gca gtg ggt gag ttg cca gag
L Q E I Y Q E L T R L K A A V G E L P E
661/221 691/231
aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc cag ctg aag gct gca gtg ggt gag
K S K L Q E I Y Q E L T Q L K A A V G E
721/241 751/251
ttg cca gac cag tcc aag cag cag caa atc tat caa gaa ctg acc gat ttg aag act gca
L P D Q S K Q Q Q I Y Q E L T D L K T A
781/261 811/271
ttt gaa cgc ctg tgc cgc cac tgt ccc aag gac tgg aca ttc ttc caa gaa aac tgt tac
F E R L C R H C P K D W T F F Q G N C Y
841/281 871/291
ttc atg tct aac tcc cag cgg aac tgg cac aac tcc gtc acc gcc tgc cag gaa gtg agg
F H S N S Q R N W H H S V T A C Q E V R
901/301 931/311
gcc cag ctc gtc gta atc aaa act gct gag gag cag aac ttc cta cag ctg cag act tcc
A O L V V I K T A E E Q N F L Q L Q T S
961/321 991/331
agg agt aac cgc ttc tcc tgg atg gga ctt tca gac cta aat cag gaa ggc acg tgg caa
R S N R F S W M G L S D L N Q E G T W Q
1021/341 1051/351
tgg gtg gac gcc tca cct ctg tca ccc agc ttc cag cgg tac tgg aac agt gga gaa ccc
W V D G S P L S P S F Q R Y W N S G E P
1081/361 1111/371
aac aat agc ggg aat gaa gac tgt gcy gaa ttt agt gcc agt gcc tgg aac gac aat cga
N N S G N E D C A E F S G S G W N D N R
1141/381 1171/391
tgt gac gtt gac aat tac tgg atc tgc aaa aag ccc gca gcc tgc ttc aga gac gaa tag
C D V D N Y W I C K K F A A C P R D E *

```

WO 02/50119

12/12

PCT/EP01/15392

1 MSDFKPRVQQLQLLEDDPTTSGRRFFPRDFQFQQLHGKRSSTGCLGHGALVQLLSEML  
61 LAGVLEVANLVGVSKVPSLSQEQSEQDAIVQNLTLKAAVGELESKSKLQEIYQELTQLK  
121 AAVGELEPKSKLQEIYQELTRKAAVGELEPKSKLQEIYQELTQLKAAVGELEPKSKLQEI  
181 IYQELTRKAAVGELEPKSKLQEIYQELTRKAAVGELEPKSKLQEIYQELTQLKAAVGE  
241 LFDQSKQQQIYQELTDLKATAPERLCRHCPKDWFDFGHCYFHSNSORNNWINSYACQEVK  
301 RQLVVIKTABEQNFLLQTSRSNRFPSNMGLELDNQEQTIQWVDSLELSPFORXUNSGEP  
361 NNSGNEEDCAEFSGSGWNNRCDVDNYWICKRPAACFRDE

Fig. 7

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
27 June 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/050119 A3

(51) International Patent Classification: C12N 5/06,  
C07K 16/28, 14/705

5, NL-6813 KD Arnhem (NL), TORENSMA, Ruurd  
[NL/NL]; Neushoornstraat 6, NL-6531 RP Nijmegen  
(NL).

(21) International Application Number: PCT/EP01/15392

(74) Agent: VAN SOMEREN, Petronella, Francisca, Hen-  
drika, Maria; Arnold & Siedsma, Sweelinckplein 1,  
NL-2517 GK The Hague (NL).

(22) International Filing Date:  
21 December 2001 (21.12.2001)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
00128143.5 21 December 2000 (21.12.2000) EP  
01200944.5 13 March 2001 (13.03.2001) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): STICHT-  
ING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT [NL/NL]; Geer-  
Grotestraat 9, NL-6525 LZ Nijmegen (NL).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NL, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

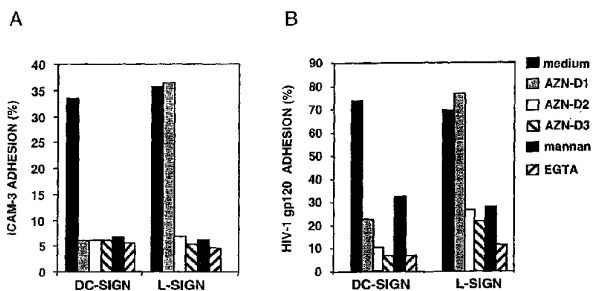
(75) Inventors/Applicants (for US only): FIGDOR, Carl,  
Gustav [NL/NL]; Westwal 54, NL-5211 DD Den Bosch  
(NL), GELTENEK, Teunis, Bernard, Herman  
[NL/NL]; Weezenhof 3471, NL-6536 GR Nijmegen  
(NL), VAN KOOYK, Yvette [NL/NL]; Poggenboeckstraat

Published:  
with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR MODULATING THE BINDING ACTIVITY OF A NOVEL ICAM-3 BINDING RECEPTOR ON SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS IN LIVER AND LYMPH NODES

WO 02/050119 A3



(57) Abstract: The invention relates to the use of a compound that binds to a C-type lectin on the surface of a sinusoid endothelial layer, in the preparation of a composition for modulating, in particular reducing, the immune response in animal, in particular a human or another mammal. The sinusoid endothelial layer may be either constituted by liver sinusoid endothelial cells (LSEC) or by the lymph node sinusoidal zone.

**WO 02/050119 A3** 

**(88) Date of publication of the international search report:** 19 September 2002 *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International Application No.<br>PCT/EP 01/15392 |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>IPC 7 C12N5/06 C07K16/28 C07K14/705   |   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 C12N C07K   |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS   |   |  |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT   |   |  |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                            |
| X  | EP 1 046 651 A (KONINKL UNIVERSITEIT NIJMEGEN) 25 October 2000 (2000-10-25)   | 1-6,<br>9-15,<br>17-21,24                        |
| Y  | the whole document  | 1-28   |
| Y  | SOLLIEUX ET AL.: "Cutting Edge: DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13." J. IMMUNOL., vol. 165, no. 6, 15 September 2000 (2000-09-15), pages 2937-2942, XP002201117 ISSN: 0022-1767 cited in the application | 1-28   |
| X  | the whole document  | 15,22-28   |
|  | ---<br>-/-  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.  |   |  |
| * Special categories of cited documents:   |   |  |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*B* earlier document but published on or after the international filing date<br>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention<br>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>*Z* document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search  | Date of mailing of the international search report  |  |
| 12 June 2002   | 26/06/2002  |  |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   | Authorized officer<br><br>Wimmer, G   |  |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                          |  | International Application No<br>PCT/EP 01/15392 |
|--|--|---|
| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |   |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                           |
| Y  | STAHL P D ET AL: "The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense"<br>CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX,<br>vol. 10, no. 1, February 1998 (1998-02), pages 50-55, XP004313620<br>ISSN: 0952-7915<br>the whole document  | 1-28  |
| A  | GEIJTENBEEK TEUNIS B H ET AL:<br>"Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses"<br>CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US,<br>vol. 100, no. 5,<br>3 March 2000 (2000-03-03), pages 575-585,<br>XP000929197<br>ISSN: 0092-8674<br>cited in the application<br>the whole document  | 1-28  |
| T  | PÖHLMANN STEFAN ET AL: "DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans."<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES,<br>vol. 98, no. 5,<br>27 February 2001 (2001-02-27), pages 2670-2675, XP002201118<br>February 27, 2001<br>ISSN: 0027-8424<br>the whole document | 1-28  |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  | International application No.<br>PCT/EP 01/15392   |
|--|--|
| <b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>   |  |
| This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:   |  |
| 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:   |  |
| because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:   |  |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:  |  |
| 16   |  |
| because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:                                |  |
| see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210  |  |
| 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:   |  |
| because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).  |  |
| <b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>   |  |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  |  |
| 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.   |  |
| 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.   |  |
| 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:             |  |
| 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: |  |
| <b>Remark on Protest</b>   | <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. |
|  | <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.           |

International Application No. PCT/EP 01 15392

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 16

The term "AZN-D3" does not have a well-defined meaning to the skilled person, and no accession number of the Antibody is given in the application. A reasonable search for subject-matter of the claim was therefore not possible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 01/15392

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |            |
|--|------------------|-------------------------|------------------|------------|
| EP 1046651                             | A                | 25-10-2000              | EP 1046651 A1    | 25-10-2000 |
|  |                  |                         | AU 4152600 A     | 02-11-2000 |
|  |                  |                         | EP 1086137 A1    | 28-03-2001 |
|  |                  |                         | WO 0063251 A1    | 26-10-2000 |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I           | テーマコード(参考) |
|--------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 31/18            | A 6 1 K 45/00 |            |
| A 6 1 P 37/02            | A 6 1 P 31/18 |            |
| A 6 1 P 37/06            | A 6 1 P 37/02 |            |
| A 6 1 P 37/08            | A 6 1 P 37/06 |            |
| A 6 1 P 43/00            | A 6 1 P 37/08 |            |
| C 1 2 N 5/00             | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1      |
| G 0 1 N 33/53            | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1      |
| /(C 1 2 N 5/00           | G 0 1 N 33/53 | Y          |
| C 1 2 R 1:91 )           | C 1 2 N 5/00  |            |
|                          | C 1 2 N 5/00  |            |
|                          | C 1 2 R 1:91  |            |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 フィグドー, カール グスタヴ  
オランダ国 エヌエル - 5 2 1 1 ディーディー デン ボッシュ, ウェストワル 5 4

(72)発明者 ゲイジュテンピーク, テウニス ベルナルド ハーマン  
オランダ国 エヌエル - 6 5 3 6 ジーアール ニジユメゲン, ウィーゼンホフ 3 4 7 1

(72)発明者 ヴァン クーイク, イヴェット  
オランダ国 エヌエル - 6 8 1 3 ケイディー アーネム, ポッゲンピークストラート 5

(72)発明者 トレンスマ, ルアド  
オランダ国 エヌエル - 6 5 3 1 アールピー ニジユメゲン, ノイシュアンストラート 6

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA93Y AC20 BC41 BD39 CA44  
4C084 AA17 AA19 NA14 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB322 ZC022 ZC752  
4C085 AA13 AA14 BA01 BB01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA22

|             |  |         |            |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)     | 一种调节新ICAM-3结合受体对肝脏和淋巴结中窦状内皮细胞的结合活性的方法  |         |            |
| 公开(公告)号     | <a href="#">JP2004526685A</a>  | 公开(公告)日 | 2004-09-02 |
| 申请号         | JP2002552012   | 申请日     | 2001-12-21 |
| 申请(专利权)人(译) | Suchihitingu Kasorike 普遍乳木果小山  |         |            |
| [标]发明人      | フィグドーカールグスタヴ<br>ゲイジュテンピークテウニスベルナルドハーマン<br>ヴァンクーイクイヴェット<br>トレンスマルアド   |         |            |
| 发明人         | フィグドー, カール グスタヴ<br>ゲイジュテンピーク, テウニス ベルナルド ハーマン<br>ヴァン クーイク, イヴェット<br>トレンスマ, ルアド   |         |            |
| IPC分类号      | C12N15/09 A61K38/00 A61K38/095 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/21 A61K39/395 A61K45/00<br>A61P31/18 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N5/00 C12N5<br>/071 C12R1/91 G01N33/53  |         |            |
| CPC分类号      | A61K39/21 A61K38/00 A61K39/12 A61K2039/505 A61K2039/6087 C07K14/7056 C07K16/2851 C12N5<br>/069 C12N2740/16134  |         |            |
| FI分类号       | C07K16/28.ZNA A61K39/00.H A61K39/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P31/18<br>A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.111 A61P43/00.121 G01N33/53.Y C12N5/00 C12R1/91   |         |            |
| F-TERM分类号   | 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AC20 4B065/BC41 4B065/BD39 4B065/CA44 4C084/AA17 4C084<br>/AA19 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB322 4C084<br>/ZC022 4C084/ZC752 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA01 4C085/BB01 4H045/AA11 4H045/AA20<br>4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 |         |            |
| 代理人(译)      | 夏木森下   |         |            |
| 优先权         | 2000128143 2000-12-21 EP<br>2001200944 2001-03-13 EP   |         |            |
| 其他公开文献      | JP4322504B2  |         |            |
| 外部链接        | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

本发明涉及在制备用于调节的组合物(降低动物,特别是人或其他哺乳动物中的免疫应答)中制备与窦状内皮层表面上的C型凝集素结合的化合物的用途。窦状内皮层可以由肝窦内皮细胞(LSEC)组成,或者可以由淋巴结正弦区域组成。本发明的组合物调节窦状内皮层的细胞(特别是LSEC)与表达ICAM-2和/或ICAM-3的细胞(特别是T细胞)之间的一种或多种相互作用。可以用来(特别是减少)它。

