

(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2006-517963

(P2006-517963A)

(43) 公表日 平成18年8月3日(2006.8.3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18 ZNA	4B024
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B063
C12N 5/06 (2006.01)	C12N 5/00 E	4B064
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4B065
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 Y	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-503035 (P2006-503035)	(71) 出願人	596129215
(86) (22) 出願日	平成16年1月26日 (2004.1.26)		シェーリング コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月7日 (2005.7.7)		Schering Corporation
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/002133		アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
(87) 国際公開番号	W02004/066937		033-0530, ケニルワース, ギャロ
(87) 国際公開日	平成16年8月12日 (2004.8.12)		ッピング ヒル ロード 2000
(31) 優先権主張番号	60/443, 244	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成15年1月28日 (2003.1.28)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(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】 形質細胞様樹状細胞についての抗体特異性

(57) 【要約】

本発明は、形質細胞様樹状細胞 (pDC) に結合可能な免疫因子 (抗体)、このような抗体を発現する細胞株ならびに、このような抗体を用いて、pDC含有組織から形質細胞様樹状細胞を同定、および精製するためのプロセスを提供する。最終的には、本発明は、pDC含有サンプルからpDCを同定するための方法を提供し、この方法は、前記サンプルを120G8抗体と接触させて、抗体/pDC複合体を形成する工程、およびpDCを同定するために、前記抗体/pDC複合体の存在を検出する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

結合化合物であって、ATCC登録番号PTA-4957のもとで寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体の結合特性を有する、結合化合物。

【請求項 2】

前記結合化合物が、抗体または抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の結合化合物。

【請求項 3】

ATCC登録番号PTA-4957のもとで寄託された前記ハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体の抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体であって、ATCC登録番号PTA-4957のもとで寄託された前記ハイブリドーマ細胞株によって産生される、モノクローナル抗体。

【請求項 5】

ATCC登録番号PTA-4957に寄託された、前記ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 6】

形質細胞様樹状細胞を、該形質細胞様樹状細胞を含むサンプルから精製するための方法であって、該方法は、該サンプルを、請求項 1 に記載の結合化合物と接触させる工程と、次いで、該結合化合物に結合している該形質細胞様樹状細胞を回収する工程とを包含する、方法。

【請求項 7】

前記形質細胞様樹状細胞を、該形質細胞様樹状細胞を含むサンプルから同定するための方法であって、プロセスは、該サンプルを、請求項 1 に記載の結合化合物と接触させ、抗体/形質細胞様樹状細胞複合体を形成する工程；および該複合体の存在を検出する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、形質細胞様樹状細胞(pDC)に結合可能な免疫因子(抗体)、このような抗体を発現する細胞株ならびに、このような抗体を用いて、pDC含有組織から形質細胞様樹状細胞を同定、および精製するためのプロセスを提供する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

樹状細胞(DC)は、抗原提示細胞(APC)であり、T細胞依存性免疫応答を惹起する(Steinman, 1991, Ann. Rev. Immunol. 9: 271-296)。ヒトにおいて、樹状細胞様DC(pDC)は、DCサブセットであり、それらのIg分泌形質細胞との超微細構造の類似(Grouard et al., 1997, J. Exp. Med. 185(6): 1101-1111)、それら固有の表面表現型(CD4+IL-3R++CD45RA+HLA-DR+)(Grouard et al., 1997, J. Exp. Med. 185(6): 1101-1111; Facchetti et al., 1999, Histopathology 35(1): 88-9; Res et al., 1999, Blood 94(8): 2647-57)、およびウイルス刺激または特定のCpGモチーフを含むオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)に应答して高いレベルのIFNを産生するそれら能力(Siegal et al., 1999, Science 284(5421): 1835-7; Kadowaki et al., 2001, J. Immunol. 166(4): 2291-5)によって特徴付けられ、ウイルス接触に続いて、ナイーブ(naive)T細胞のインビトロでの強力なプライミング、およびTh-1分極を誘導する(Cell et al., 2000, Nat. Immunol. 1(4): 305-10; Kadowaki et al., 2000, J. Exp. Med. 192(2): 219-26)。pDCは、T細胞およびB細胞

10

20

30

40

50

に共通する前駆体に由来すると考えられている (Grouardら, 1997, J. Exp. Med. 185, 6: 1101-1111; Resら, 1999, Blood 94, 8: 2647-57; Resら, 1999, Blood 94(8): 2647-57; Brunoら, 1997, J. Exp. Med. 185: 875-884; Bendriss-Vermareら, 2001, JCI 107: 835; Spitsら, 2000, J. Exp. Med. 192(12): 1775-84)。

【0003】

マウスにおいて、pDCは、最近、いくつかのグループによってCD11c^{low}B220^{hi}Gr1^{low}細胞として同定され、ウイルス刺激に应答して、I型IFNを産生することが可能であり、形質細胞様形態を示す (Nakanoら, 2001, J. Exp. Med, 194(8): 1171-8; Paturelら, 2001, Nat Immunol. 2(12): 1144-1150; Bjorck, 2001, Blood 98(13): 3520-6)。マウスpDCはまた、FLT3Lの存在下における骨髓細胞の樹状細胞への分化によって、インビトロで数多く得られ得る。

【0004】

それらの形態、それらのINF産生およびそれらの推定の起源に加えて、pDCはまた、それらの弱い食作用活性 (Grouardら, 1997, J. Exp. Med. 185, 6: 1101-1111)、それらの弱いIL-12産生能力 (Rissoanら, 1999, Science 283: 1183-1186)、およびそれらの活性化を誘導するシグナル (Kadowakiら, 2001, J. Immunol 166(4): 2291-5)において、骨髓性DCと異なる。活性型pDCの補充は、ナイーブT細胞の活性化を通じて免疫を惹起するはずであるが、一方で未成熟DCまたは不活化されたDCは、おそらく調節性T細胞の誘導を通じて、免疫寛容を誘導することが報告されている (Jonuleitら, 2001, Trends Immunol. 22: 394; Bellら, 2001, Trends Immunol 22: 11, Roncaroloら, 2001, JEM 193: F5; Jonuleitら, 2000, JEM 162: 1213)。さらに、pDCは、IL-10分泌T細胞 (Rissoanら, 1999, Science 283: 1183; Liuら, 2001, Nature Immunol 2: 585)およびCD8調節性T細胞 (Gillietら, 2002, J. Exp. Med. 195(6): 695-704)を誘導することが示されている。ヒトの天然の(natural)IFN産生細胞(HuIPC)はまた、ウイルス感染細胞を殺傷するためのナチュラルキラー(NK)細胞の活性化において、不可欠な役割を果たすことが示されている (Bandyopadhyayら, 1986, J. Exp. Med 164(1): 180-95)。さらに、pDCは、最近、自己免疫疾患(特に、エリテマトーデス)と関連づけられている (Farkasら, 2001, Am. J. Pathol. 159(1) 237-43)。

【0005】

I型インターフェロン(IFN-、または)は、ウイルス感染または微生物感染に対する宿主の抵抗の主役である (Pfefferら, 1998, Cancer Res 58(12): 2489-99; van den Broekら, 1995, Immunol Rev 69(8): 4792-6)。ウイルス感染におけるpDCの重要な役割は、最近、インビボでの、MCMV感染モデルおよびVSV感染モデルで実証されている (Dalodら, 2002, J. Exp. Med 195(4): 517-28; Barchetら, 2002, J. Exp. Med 195(4): 507-16)。実際、マウスpDCの非存在下において、IFNのレベルは、MCMV感染マウス中で、劇的に減少する。その研究において、pDCを枯渇させるために用いる抗Gr1処理はまた、好中球に加えて、おそらくマクロファージの比率と活性型T細胞の比率とを枯渇させ得た。しかし、これらの細胞すべてがインビトロでIFN-を産生するわけではなく、そしてTリンパ球またはBリンパ球は、インビボでのINF-産生に必要とされないのので、これらのデータは、MIPCが、MCMV感染に应答してインビボでI型IFNを産生す

ることが可能な唯一の細胞であること、またはこれらのI型IFNの早期の産生は、他の細胞型からのIFN産生のカスケードを惹起するために必要であることのどちらかを実証した(Dalodら, 2002, J Exp Med 195(4):517-28頁)。

【0006】

ヒトにおいて、休止pDCは、BDCA-2およびBDCA-4を特異的に発現することが示されている(Dzionekら, 2000, J Immunol 165(11):6037-46)。マウスにおいて、そのような特異的マーカーは、現在までに同定されていない。モニタリングのための、マウスpDCに特異的な新規のマーカーを同定し、pDCを特徴付け、そしてpDCを単離すること、およびインビボの動物モデルにおいてそれらの機能を研究することもまた大きな利益がある。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、2003年1月27日にATCC登録番号PTA-4957のもとで寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生される、モノクローナル抗体の結合特性を有する結合化合物を提供することによって、前述の必要性を満たす。好ましい実施形態において、この結合組成物は、抗体または抗体フラグメントである。最も好ましくは、このモノクローナル抗体は、ATCC番号PTA-4957のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体120G8である。

20

【0008】

登録番号ATCC PTA-4957を有するハイブリドーマ細胞株もまた、提供される。

【0009】

本発明はさらに、pDC含有サンプルからpDCを精製するための方法を提供し、この方法は、前記サンプルを120G8抗体と接触させる工程、次いで前記抗体に結合したpDCを回収する工程を包含する。

【0010】

最終的には、本発明は、pDC含有サンプルからpDCを同定するための方法を提供し、この方法は、前記サンプルを120G8抗体と接触させて、抗体/pDC複合体を形成する工程、およびpDCを同定するために、前記抗体/pDC複合体の存在を検出する工程を包含する。

30

【0011】

(発明の詳細な説明)

本発明は、部分的に、マウスにおいて特異的にpDCを認識する抗体の発見に基づく。

【0012】

DCによる抗原の提示の際のT細胞応答の性質は、含まれるDCの小集団および提示されるDCの成熟のステージに依存する(Steinmanら, 2000, J Exp Med 191(3):411-6)。機能的柔軟性にもかかわらず、MDCおよびpDCは、Th1応答またはTh2応答へのT細胞応答の型を分極することが可能であり、それはそれぞれ、IL-12を分泌する能力またはその能力を有さないことを通じて行われる(Rissoanら, 1999, Science 283:1183-1186)。2つのDCサブタイプもまた、獲得免疫応答と先天免疫応答との間の異なった連結を作り出し、MDCのB細胞の活性化(Duboisら, 1999, J Leukoc Biol 66:224-230)およびNK細胞の活性化(Zitvogelら, 2002, J Exp Med 195(3):F9-14)の両方と、ウイルスに対する応答における、pDCの多くの量の天然IFNの産生(Liu, Y. J., 2001, Cell 106(3):259-62)とを伴う。例えば、マウスにおいて休止pDCと活性型pDCの両方を認識することが可能な特異的マーカーが欠如していることを考えると、発明者ら

40

50

は、マウス pDC に対する mAb を作製した。

【0013】

この抗体は、120G8 と表され、ハイブリドーマ細胞株によって産生される。このハイブリドーマ細胞株は、2003年1月27日に Budapest Treaty のもとに ATCC 登録番号 PTA-4957 として寄託された。120G8 mAb は、全細胞から pDC を選択的に単離するために用いられ得る。この抗体は、エキソピボの全細胞またはインピト口の骨髄由来 DC のいずれかに由来する pDC を染色する。この抗体はまた、マウスにおいて異なる器官起源の pDC 起源だけでなく、異なるマウス系統起源の pDC 起源も認識する。この抗体は、蛍光細胞分析分離装置 (FACS) 研究、組織切片上の免疫組織化学 (IHC) 染色または免疫組織蛍光 (IHF) 染色において用いられ得る。120G8 mAb は、休止 pDC と活性型 pDC との両方を認識するので、インピト口およびインピボで、活性化に対する pDC 応答を研究することは、最も有用である。最終的には、インピボでの 120G8 mAb 注射は、表現型的かつ機能的に両方で決定されたように、マウスの pDC を枯渇させる。

10

【0014】

用語「結合化合物」は、本明細書で用いられるとき、抗体および pDC に特異的に結合するそれらの機能フラグメントを含み、それらは、本明細書で記載される 120G8 mAb と同じか、または類似するエピトープ特異性を有する。120G8 mAb と同じか、または類似するエピトープ特異性を有する結合化合物は、pDC への結合について 120G8 mAb と競合する、それらの能力によって同定され得る。

20

【実施例】

【0015】

本発明は、以下の非限定な実施例を通じて説明され得、以下の材料および方法を参照することによって、より容易に理解され得る。

【0016】

(マウス、培養培地および抗体)

特異的病原体のない BALB/c ByJ、129 SvPas、C57Bl/6J、CBA/J、C3H/HeN、DBA/2J、BALB/c - ヌード雌性マウス (6~8週齢) を、Charles River (Iffa-Credo, L'Arbresle, France) から購入した。すべてのマウス実験を、施設の動物委員会によって承認されたプロトコルに従って、EEC Council Directive 86/609 ならびに施設の動物管理使用 (animal care and use) ガイドラインに従って実施した。

30

【0017】

初代細胞を、完全な RPMI 1640 培地: 10% (v/v) 熱不活化ウシ胎仔血清 (FCS, Life Technologies)、2mM L-グルタミン (Life Technologies)、80µg/ml Gentallin (Schering Plough, Union, NJ)、10mM Hepes (Life Technologies)、50µM 2-メルカプトエタノール (Sigma, St Louis, MO) を補充した RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley Park, U.K.) 中、5% CO₂ 中で 37 °C において増殖させた。ハイブリドーマの高密度の上清を、2mM L-グルタミン、80µg/ml Gentallin を補充した DMEM/F12 (Life Technologies) において生成した。特定されない限り、10% (v/v) ウマ血清 (HS, Life Technologies) を加えた。すべての抗体は、特に記されない限り、Pharmingen (San Diego, CA) 製であった。

40

【0018】

(組織調製および細胞枯渇)

マウスを、CO₂ 吸入によって屠殺した。単離した細胞を、手順の全体を通して PBS - FCS - EDTA: 5% (v/v) 熱不活化 FCS および 0.5mM EDTA (Si

50

gma)を補充したPBS(Life Technologies)中で維持した。血球を、屠殺後すぐの心臓穿刺により、過剰なPBS-FCS-EDTA中に回収した。脾臓、胸腺、リンパ節(膝窩または末梢(プールした単径部、腋窩および膝窩))、パイエル板を、PBS-FCS-EDTA中に押し出し、25G針を通した。赤血球を、NH₄Cl溶液(Stem Cell Technologies, Vancouver, BC)中で、5分間溶解した。骨髄細胞を、冷たいPBS-FCS-EDTAを用いて骨から流し出した。

【0019】

T細胞枯渇およびB細胞枯渇について、細胞を、抗CD3分子複合体(17A2)の混合物と一緒に、30分間4℃においてインキュベートし、抗CD8(53-5.8)、抗CD19(1D3)または抗赤血球(TER119)を、代わりに用いた。細胞とヤギ抗ウサギIgGコートDynabeads(Dynal, Oslo, Norway)とを、15分間4℃における持続的な攪拌のもとで混合した。ビーズおよび付着細胞を、Dynal magnetを用いて除いた。

10

【0020】

CD11c⁺細胞を、CD11c⁺のMicrobeadsおよびMiniMacs(Mytenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いたポジティブ選択によって精製し、この精製は、全脾臓細胞、全骨髄細胞またはCD19、CD3、CD8、TER119枯渇細胞のいずれかから開始した。

【0021】

FLT3LにおけるインビトロでのDC由来(BM-DC)骨髄について、24ウェルプレート中に10⁶細胞/mlにおいてプレートした単離した骨髄細胞を、9日間、25ng/mlの組み換えマウスFLT3L(R&D systems, Abingdon, U.K.)を補充した完全なRPMI1640培地においてインキュベートした。培地は、2~3日ごとに新しくした。

20

【0022】

(マウス形質細胞様DCを用いたラットの免疫)

BALB/cマウス由来のマウス脾臓細胞を、抗CD3分子複合体(17A2)、抗CD8(53-5.8)、抗CD19(1D3)、抗CD5(53-7.3)、抗CD11b(M1/70)、および抗赤血球(TER119)を含むラットmAbの混合物と共に30分間4℃においてインキュベートし、次いで、抗体でコートした細胞を、Dynabeadを用いて除いた。枯渇細胞を、ラット抗Ly6G/C(RB6-8C5)-フィコエリトリン(PE)、ハムスター抗CD11c(HL-3)-ビオチン、およびフルオレセインイソチオシアン酸(FITC)標識されたハムスター抗CD3(145-2C11)のカクテル、ラット抗CD19(1D3)、抗CD5(53-7.3)、抗CD11b(M1/70)、および抗全(pan)NK細胞(DX5)を用い、30分間4℃において染色した。次いで、細胞を、ストレプトアビジン-Pe-Cy5(Dako, Glostrup, Denmark)を用いて染色し、CD11c⁺Gr1⁺CD3⁻CD19⁻CD5⁻CD11b⁻DX5⁻細胞(pDC)として、FACStar plus フローサイトメーター(Becton Dickinson, Mountain View, CA)を用いてソートした。ソートした細胞を、PBS(Life Technology, Paisley Park, U.K.)中で3回洗浄し、PBS中に再懸濁し、注射時まで-20℃において凍結した。

30

40

【0023】

1匹のLOU雌性ラット(Iffa Credo)(4週齢)を、ソートしたpDCで免疫した。そのプロトコルは、以下の通りであった:

0日目: 完全 Freund アジュバント(CFA)中10⁶細胞の腹腔内注射(ip)

14日目: 不完全な Freund アジュバント(IFA)中10⁶細胞のip注射

21日目: PBS中10⁶細胞のip注射

35日目: PBS中2.10⁶細胞の静脈内(iv)注射

50

38日目：ラットを屠殺し、脾臓を回収した。

脾臓細胞を、ポリエチレングリコール-1000 (Sigma) を用いて、マウス骨髄腫細胞株SP20と融合させた。ハイブリド細胞を、96ウェルプレートにプレートし、10% HS、2 mM L-グルタミン、80 µg/ml Gentallin、1% 培養培地添加物 (culture medium additive) (CRTS, Lyon, France)、 10^{-5} M アザセリン (Sigma) および 5×10^{-5} M ヒポキサンチンを補充したDMEM/F12を与えた。上清を、エキソピボでの単離脾臓細胞、骨髄および脾臓CD11c⁺ 樹状細胞との反応性について、スクリーニングした。選択したハイブリドーマを、限界希釈によりクローン化した。

【0024】

mAb 120G8を、無血清の高密度上清から、Hiload Qカラム (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 上での陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、標準的手順を用いてAlexa488およびビオチンと結合させた。Balb/c-ヌードマウス (Iffa Credo) において、腹水を生成した。Igアイソタイプを、ラットIgサブタイピング (subtyping) キット (Pharmingen, San Diego, CA) を用いたELISAにより決定した。

10

【0025】

(FACS分析)

すべてのFACS分析について、PBS-FCS-EDTA中で維持された細胞を、第一に、抗CD16/32未標識のラットAbと共に15分間インキュベートし、Fcレセプターのブロッキングを確実にし、次いで、指示されたAbと共に30分間4⁺において染色した。染色された細胞を、FACSscanフローサイトメーターを用いて分析した。ネガティブコントロールを、ラットIgまたはハムスターIgと適合したアイソタイプで実行した。PerCpCy5.5染色を用いない場合、自己蛍光 (auto fluorescent) 細胞を、FL3チャンネルを用いてゲートアウト (gate out) した。

20

【0026】

120G8⁺ 細胞の表面表現型について、単離した細胞を、Alexa-488標識した120G8、PE標識した抗体 (抗CD3、CD19、DX5、CD11c、CD45R/B220、Ly6C、Ly6G/C (Gr1, RB6-8C5)、CD11b、I-A^d、H2-K^d) およびAPC標識したハムスター抗CD11c (HL-3) を用いて染色した。FLT3L中の培養物の指示された日におけるBM-DCの染色のために、120G8 Alexa488、抗CD11c-PE、抗CD11b-PerCpCy5.5および抗CD45R/B220-APCを用いて、細胞を染色した。異なる器官における120G8⁺ 細胞および120G8⁻CD11c⁺ 細胞の表面表現型について、120G8-Alexa488、抗CD45R/B220-PE、抗Ly6C-ビオチンおよび抗CD11c-APCを用いて、単離した細胞を染色した。ビオチン標識した抗Ly6Cを、PerCP-Cy5.5ストレプトアビジン (Pharmingen) を用いて曝露した。

30

40

【0027】

マウス器官におけるDCサブセット細胞頻度 (frequency) の分析について、PBS-FCS-EDTA中で維持した脾臓細胞を、ラット120G8-Alexa488、抗CD19と抗CD3-PerCpCy5.5との両方、抗CD11c-APCならびに抗CD8-PEまたは抗CD11b-PEを用いて染色した。CD19⁺ 細胞/CD3⁺ 細胞を、分析のためにFL3チャンネルを用いてゲートアウトした。結果を、全脾臓細胞中の指示された細胞サブセットの頻度として示す。

【0028】

(細胞活性化およびサイトカイン産生)

細胞活性化について、指示された細胞を、完全RPMI1640倍地中 (ソートしてい

50

ない細胞について 10^6 細胞/ml、およびソートした細胞について 0.5×10^6 細胞/ml) で、指示された刺激の非存在下または存在下において、培養した。ホルムアルデヒドで不活化したヒトインフルエンザウイルス (NK/TM/138/00株 (N. Kuehn, Aventis Pasteur, Val de Reuil, France) により、親切に提供された) を培養物に加え、1mlあたり100血球凝集素単位 (HAU) の最終濃度とした。特に特定されない限り、ホスホロチオエート CpG ODN (TCA TTG GAA AAC GTT CTT CGG GGC G) (配列番号1) を、MWG Biotech (Munich, Germany) から購入し、 $10 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度において用いた。組み換えマウス IFN- (Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands) を、指示された最終濃度において用いた。組み換えマウス IFN- (R&D) を、 2 ng/ml の最終濃度において用いた。

【0029】

120G8+細胞によるサイトカイン産生について、脾臓細胞を、30分間4において、抗CD3分子複合体、抗CD8、抗CD19および抗赤血球 (TER119) を含むmAbの混合物と共にインキュベートし、次いで抗体でコートした細胞を、Dynabeadを用いて除いた。枯渴細胞を、ラット120G8-Alexa488、ハムスター抗CD11c (HL-3)-フィコエリトリン (PE) を用いて、30分間4において染色した。次いで、細胞を、FACSstar plusフローサイトメーター (Becton Dickinson) を用いてソートし、洗浄し、指示された刺激薬と共に20~24時間、96ウェル培養プレート中にプレートした。上清を20~24時間において回収し、特異的ELISAによってIFN- およびIL-12 (p40またはp70) (それぞれ、PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ および R&D Systems) についてアッセイするまで-20に保管した。

【0030】

細胞活性化後の120G8発現について、単離した細胞を、指示された刺激薬と共に20~24時間インキュベートした。次いで、刺激した細胞を、CD11c+活性型細胞について、120G8-Alexa488、抗CD11b-PerCpCy5.5および抗CD45R/B220-PE、または全脾臓細胞について、120G8-Alexa488およびPEに結合した指示されたmAbを用いて染色した。後者の実験のために、指示された細胞を、FL2チャンネルを用いてゲートイン (gate in) した。

【0031】

(組織切片上の120G8の免疫染色)

脾臓を、OCT化合物 (Miles) 中に包埋し、液体窒素中に急凍結 (snap frozen) し、そしてさらなる分析まで-80において保管した。厚さ $8 \mu\text{m}$ の凍結切片を、80%アセトン (Sigma) 中で-20において20分間固定し、室温において乾燥させ、染色するまで凍結保管した。切片を、PBS (Life Technology) 中で再水和した。アビジン/ビオチンおよびペルオキシダーゼの組織含有量を、それぞれ特異的キット (Vector Laboratory, Burlingame, CA) および0.3%の H_2O_2 (Sigma) を用いて中和した。切片を、2%正常マウス血清 (Dako, Glostrup, Denmark) を用いてブロッキングし、室温において染色を実施した。種々のマウス組織におけるインサイチュの120G8+細胞の分布のために、切片を、標識されていない120G8 Abで60分間、ビオチンに結合するヤギ抗ラット (Jackson ImmunoResearch) で60分間、ペルオキシダーゼ (Sigma) に結合した余分なアビジン (Sigma) で30分間、連続的に染色し、ペルオキシダーゼ基質 (AEC, Sigma) を用いて曝露した。ヘマトキシリン (Vector Laboratory) を用いて、対比染色を行った。免疫組織蛍光分析のために、切片を、未標識の120G8 Abで60分間、Alexa488に結合したヤギ抗ラット (Molecular Probes, Leiden, The

Netherlands)で60分間、2%ラット血清、ビオチンおよびストレプトアビジン - Alexa594 (Molecular Probes) に結合した指示されたAbで、連続的に染色した。

【0032】

(インビボでの処理)

CpG処理について、マウス1匹につき、30 μ lの陽イオン性リポソーム調製(DOTAP, Roche, Mannheim, Germany)を、麻酔したマウスの後方の眼窩静脈への注射の前に、ポリスチレンチューブ中で10分間、170 μ l PBS中5 μ gのCpG ODNと混合した。CpG注射の6時間後、脾臓を回収し、免疫染色のために調製した。

10

【0033】

インビボでの120G8+細胞の枯渇について、最適な量の120G8腹水をマウスにi.p.注射した。pDC枯渇のFACS分析のために、120G8注射の24時間後に脾臓を単離し、抗Ly6C-FITC、抗CD45R/B220-PE、抗CD11c-APCおよび抗CD19-PerCpCy5.5または抗CD3-PerCpCy5.5を用いて染色した。CpG処理後のインビボでのサイトカイン産生に対する、120G8⁺細胞の寄与を評価する実験のために、マウスに、1日目およびCpG処理の時点において、120G8腹水をi.p.注射した。CpG注射の6時間後に、屠殺後すぐの心臓穿刺によって、血液を回収した。30分間37 $^{\circ}$ Cにおける凝集および遠心分離によって、血清を全血から調製し、サイトカイン含有量についてアッセイされるまで、血清を凍結した。脾臓細胞を単離し、フローサイトメトリーによって枯渇の効率を評価した。

20

【0034】

(実施例1)

(マウスpDCに対して反応性のモノクローナル抗体120G8の選択)

2400のハイブリドーマからの上清を、総マウス脾臓細胞の調製物の5%未満の細胞を用いて、反応性についてスクリーニングし、さらに、CD3⁺細胞、CD19⁺細胞、TER119⁺細胞、CD11b⁺細胞を枯渇した脾臓に対する反応性についてスクリーニングした。融合から生じた25プレートのうちの5つの96ウェルプレートを、-80 $^{\circ}$ Cにおいて10%DMSOを補充したHS中で凍結した。これら5プレートのうち2つは、凍結せず、上に記載された通りの完全DMEM F12で培養し、そして上清を、総脾臓細胞上(5%未満)のFACS染色によって、二度目のスクリーニングをした。選択された上清を、骨髄と脾臓CD11c⁺細胞との両方に対する反応性についてアッセイした。1つのハイブリドーマ(120G8と名付けた)からの上清は、骨髄CD11c⁺細胞(60~70%)の主要なサブセットと、脾臓CD11c⁺細胞の微量なCD11c⁺サブセット(10~20%)とのみ反応することが、見出された。このハイブリドーマを、限界希釈によってクローン化した。この結果得られたクローンを、一度、親株と類似した反応性について選択し、さらに限界希釈によってクローニングした。そしてマウスCD11c⁺細胞に関する最も高い反応性、すなわちAbを産生する最も高い能力について、選択した(クローン6)。

30

【0035】

この抗体を、腹水中の親クローンと高密度上清中のクローン6との両方から、作製した。MAb 120G8は、ELISAによって決定する場合、IgG1/アイソタイプであると見出した。脾臓における120G8細胞は、特に当該のものと思われるCD11c⁺B220⁺Gr1⁺細胞(以前はマウスpDCとして定義された)であるようだが、さらなる研究のためにmAb 120G8を選択した。

40

【0036】

(実施例2)

(120G8 mAbは、マウスIFN- γ 産生細胞[pDC]と高度に反応性である)

120G8 mAbの反応性を、無刺激の脾臓細胞に関してさらに試験した。この試験

50

は、Alexa 488および系統特異的マーカーに結合した120G8を用いる二重の免疫蛍光研究を使用した。120G8 Abは、前方の散乱および側面の散乱において均質な、小さなサブセットの新しく単離された脾臓細胞を染色した。このサブセットは、TER119（赤血球系統マーカー）、CD19（B細胞系統マーカー）、CD3（T細胞系統マーカー）およびDX5（NK細胞系統マーカー）を発現していなかった。すべての120G8⁺細胞はまた、CD11c^{low}であり、このAbが脾臓DCのサブセットを染色したことを確認した。これらの結果は、少なくとも3つの実験の代表値である。

【0037】

次に、120G8 mAbのIFN- γ 産生細胞（IPC）を特異的に認識する能力を、インビトロで試験した。CD11c⁺脾臓細胞は、インビトロにおいてインフルエンザウイルスに応答して多くの量のIFN- γ を産生する唯一の細胞であることが、すでに実証されている（Paturelら, Nat Immunol, 2001）。CD11c⁺120G8⁺およびCD11c⁺120G8⁻細胞を、フローサイトメトリーによってCD3⁺CD19⁺CD8⁺TER119⁺細胞を枯渇した脾臓細胞から精製した。この2つのサブセットを、上記のように、インビトロで不活化インフルエンザウイルスまたはCpGによって刺激した。実験を3回実施し、同様の結果を得た。培地のみでインキュベートされた、両方のソートした集団に由来するIFN- γ 産生およびIL-12p40産生は、ELISA検出レベルを下回った。CD11c⁺細胞の120G8⁺サブセットのみが、インフルエンザウイルス刺激とCpG刺激との両方の後に、IFN- γ を産生した。インフルエンザウイルスとCpGとの両方に対する応答における、120G8⁻ソート細胞によるIFN- γ 産生は、非常に低いが、または、検出レベルを下回った。120G8⁺細胞はまた両方の刺激に対する反応において、IL-12p40を産生することが可能であったが、CpG刺激については、CD11c^{high}DCを含むサブセットである120G8⁻細胞よりも低いレベルであった。このことは、CD8⁺CD11c^{high}DCが、種々の刺激に応答して、多くの量のIL-12を産生することが可能であることを示す前のデータと一致している。

【0038】

（実施例3）

（120G8 + CD11c + 脾臓細胞の表面表現型）

マウスpDCは、脾臓におけるCD11c⁺Gr1⁺B220⁺細胞（Paturelら, 2001, Nagano, 2001, Bjorck, 2001）およびインビトロで骨髓細胞から誘導したDCにおけるCD11c⁺B220⁺CD11b⁻細胞であることが、以前に記載されている。120G8⁻CD11c⁺DCと比較して、120G8⁺細胞の表面表現型を研究するために、エキソピボで単離したCD11c⁺およびFLT3L中でインビトロで誘導したDCを、120G8、CD11cおよびPEに結合するいくつかのAbを用いて染色した。エキソピボで単離した脾臓CD11c⁺細胞を分析する場合、120G8⁺細胞は、B220^{high}、Gr1^{low}、Ly6C^{high}、CD11b⁻、CD8^{neg/low}、IA^{d low}およびH-2K^{d+}であり、他方では、CD11c⁺120G8⁻細胞は、B220^{neg/low}、Gr1⁻、Ly6C^{neg/low}、CD11b^{+/-}、CD8^{neg/high}、IA^{d low/high}およびH-2K^{d+}であった。120G8の表現型は、以前に記載されたマウスpDCの表面表現型と適合する。さらに、120G8はまた、以前に同定されたCD11b⁻CD11c⁺B220⁺マウスpDCであって、インビトロでFLT3L中で刺激した骨髓細胞培養物（BM-DC）において誘導したpDCを染色した。BM-DCを分析する場合、120G8⁺細胞は、B220^{high}、Gr1^{neg/low}、Ly6C^{high}、CD11b⁻であり、他方では、120G8⁻細胞は、B220^{neg/low}、Gr1⁻、Ly6C^{neg}、CD11b⁺であった。

【0039】

従って、120G8 mAbは、マウス脾臓pDCとインビトロで誘導したpDCとの両方を染色する。

10

20

30

40

50

【0040】

(実施例4)

(120G8は、マウスpDC分化の早期のマーカである)

BM-DC (FLT3L) 上の120G8 mAb染色を、6日目から10日目の間のインビトロでのpDC分化について研究した。細胞を、120G8、CD11c、CD11bおよびB220を用いて染色した。120G8 mAbは、6日目から10日目のCD11c-細胞を染色しなかった。しかし、すべての120G8+細胞は、早くも培養の6日後に、CD11c+CD11b-B220+細胞であった。B220+CD11c+120G8-のサブセットをまた検出し得、これはCD11b+であって、CD11b+骨髄性DCに由来する可能性が最も高かった。6日目(70%)から8日目(90%)に、CD11c+細胞のパーセンテージが増加したし、そして10日目までは一定なままであったが、CD11c+細胞のうち120G8+細胞のパーセンテージは、6日目(23%)から8日目(38%)までゆっくりと増加し、そして、その後急速に減少した(10日目における4%)。これらの結果は、120G8 mAbが、インビトロでの分化の間のマウスpDCの早期のマーカであることを実証する。

10

【0041】

(実施例5)

(種々のリンパ系器官における120G8+細胞の表面表現型)

120G8 mAbの染色を、Balb/cマウス由来の脾臓、骨髄、血液、胸腺、末梢リンパ節および腸間膜リンパ節において研究した。単離した細胞を、120G8 Ab、抗CD45R/B220 Ab、抗Ly6C Abおよび抗CD11c Abを用いた四重の表面染色において分析した。CD11c+120G8+細胞およびCD11c+120G8-細胞におけるLy6C発現およびB220発現を、研究した。試験したすべての器官および血液において、CD11c+120G8+は、すべてB220^{high}Ly6C^{high}であった。対照的に、CD11c+120G8-は、B220^{high}Ly6C^{high}ではなかった。このことは、120G8 mAbは、それらがどの組織から単離したかにもかかわらず、マウスpDC(CD11c+B220^{high}Ly6C^{high})細胞を認識し得ることを実証する。

20

【0042】

(実施例6)

(異なるマウス系統における120G8+細胞の頻度)

120G8 mAbの異なるマウス系統に由来するpDCと反応する能力を、さらに研究した。120G8 mAbは、BALB/cByJマウス、129 SvPasマウス、C57Bl/6Jマウス、CBA/Jマウス、C3H/HeNマウスおよびDBA/2Jマウスから単離された脾臓pDCと反応した。これら6種の異なるマウス系統に由来する総脾臓細胞のうち120G8+DCサブセットの頻度を、さらに研究した。同じ週齢のマウスから脾臓細胞を単離し(マウス系統につき、3匹のマウスで、実験は2回行った)、120G8、CD11c、CD19およびCD3を用いて染色した。分析のために、CD19/CD3+細胞を、ゲートアウトした。総脾臓細胞のうちpDC頻度の分析は、どのマウス系統が企図されているかに依存して異なることを示した。例えば、C57/Bl6マウスは、最も低い脾臓pDC頻度(総脾臓細胞の0.6% + / - 0.06)を示し、129 Svマウスは、最も高い頻度(総脾臓細胞の1.94% + / - 0.37)を示した。

30

40

【0043】

(実施例7)

(組織切片上の120G8の免疫組織化学染色)

120G8+細胞のインサイチュでの分布を、胸腺、脾臓、パイエル板、末梢リンパ節、腸間膜リンパ節の免疫組織化学によって試験した。すべてのこれらの器官において、120G8+の個々の細胞を、検出し得た。いくつかの器官(例えば、胸腺)において、内皮細胞上のいくらかの低い染色を、検出し得た。腸絨毛上のいくらかの低い染色もまた、

50

検出した。

【0044】

(実施例8)

(120G8は、インビトロでの活性化の後にマウスpDC上に維持される)

BDC A2、CD123、BDC A4は、ヒトにおいてpDCを検出するために一般的に用いられる、3つのマーカーである。しかし、活性型ヒトpDCは、インビトロで、非常に急速にこれらのマーカーをダウンレギュレートすることが公知である。従って、活性型pDCをインサイチュで検出することは、現在まで非常に困難であった。マウスにおいてpDC(休止または活性型)は、一般に抗CD11cおよび抗CD45R/B220を用いた二重染色によって検出されるが、この組み合わせは、他の細胞(例えば、B細胞)を染色する。休止pDCおよび活性型pDCに対する120G8染色を評価するために、MACS精製した129Svマウス由来のCD11c+脾臓細胞を、インビトロで20時間、不活化インフルエンザウイルスおよびCpG ODN 1668(TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT)(配列番号2)と一緒に、またはそれらなしでインキュベートした。120G8 mAb染色の平均蛍光強度は、試験したすべての条件において小さなCD11c⁺B220^{high}CD11b⁻サブセット(pDC)に対して、一定なままであった。いくらかのCD11c⁺B220^{high}120G8⁻を、インフルエンザウイルス刺激およびCpG刺激の後に検出したが、これらの細胞はまた、CD11bを発現した。このことは、いくらかの骨髄性DCは、B220をアップレギュレートし得るが、120G8をアップレギュレートし得ないことを示唆し、さらに、pDCに対する120G8染色の特異性を確認した。

【0045】

120G8 mAbはまた、インビボで活性型pDCを染色し得ることをさらに確認するため、方法において記載したとおりにCpGを用いて、129Svマウスを処理した。CpG注射の6時間後に、脾臓細胞を単離し、DC上に発現する活性マーカーを、DCサブセットに対して研究した。120G8+細胞は、インビボでのCpGでの刺激の後に、アップレギュレートされたDC活性分子(例えば、CD40、CD86)であり、そしてより低い程度でCD8ならびにMHCクラスII分子であった。これらの細胞は、コントロールマウスおよびCpG処理マウスにおいて同じレベルのCD11c(low)およびCD11b(ネガティブ)を示し、そしてpDCにおける120G8染色の平均蛍光強度は、一定のままであった。従って、120G8 mAbは、インビトロとインビボとの両方において、休止pDCおよび活性型pDCを認識する。

【0046】

(実施例9)

(正常マウスおよびCpG活性化マウス由来の脾臓における120G8+細胞の局在)

いくつかの研究は、ヒトpDCがT細胞帯(zone)に局在することを示しているが、HSV感染に応答してIFNを産生する細胞は、マウスにおいては脾臓辺縁帯に位置している(Eloranta, Alm, Scand J Immunol, 1999)。実施例7において提示されるように、免疫組織化学染色研究は、正常マウスにおける脾臓pDCが、T細胞帯に位置したことを示唆した。120G8 mAbは、インサイチュで休止pDCと活性型pDCとの両方を染色する唯一のツールと思われるので、本発明者らは、脾臓におけるマウスpDC局在を追跡するために、129Svマウスを、方法において記載のとおりCpGで処理した。この研究を、免疫蛍光によってインサイチュ分析において実行した。これには、CpG処理の6時間後の、緑色蛍光(Alexa488蛍光色素)中の120G8+細胞、および赤色蛍光(抗CD3 mAb、抗CD19 mAb、抗CD11c mAb(N418クローン)および抗CD11b mAbと一緒に、Alexa594蛍光色素)中のT、B、DCまたはマクロファージの、脾臓中での共染色を用いた。120G8+細胞は、pDCによるCD11cの低い発現のために、本発明者らの実験条件において、CD11cによって染色され得なかったことは注意すべきことである。従って、インサイチュでのCD11c染色によって、CD11c^{high}のみを検

出した。120G8を用いたCD19、CD3またはCD11bの共染色について、連続切片を分析した。安静時の動物において、120G8 mAbは、T細胞帯（CD3染色）と辺縁帯（CD11b染色）との両方に由来する細胞を染色した。120G8+細胞は、B細胞帯（CD19染色）には見出され得なかった。CD11c^{high}細胞（CD11c染色）を、赤脾髄とT細胞帯との間のブリッジング（bridging）チャンネルにおいて検出したが、CD11c^{high}細胞は、pDCと同様の分布のパターンは示さなかった。

【0047】

CpG活性化した脾臓において、120G8 mAbは、辺縁帯由来の細胞を染色する。B細胞帯またはT細胞帯において、120G8+細胞は、全く検出されないか、もしくはほとんど検出され得なかった。対照的に、CD11c^{high}細胞の大量流入を、T細胞帯において検出し得た。

10

【0048】

従って、120G8 mAbは、活性化に応答するpDCの移動を直接的にインサイチュで追跡するために、使用し得る。

【0049】

（実施例10）

（インビボでの120G8細胞の枯渇は、IFN-産生を抑制する）

以前の研究において、ウイルス感染におけるpDCの役割は、これらの細胞を抗Ly6G/C（Gr1）処理を用いて枯渇することによって、実証されている。pDCおよび好中球に加え、この処理はまた、おそらくマクロファージの比率と活性型T細胞の比率とを枯渇させる。従って、特異的にpDCを枯渇させるための120G8の使用は、インビボ研究のために非常に有用であり得る。BALB/cマウスに、120G8 mAbをi.p.注射するか、または注射せず、24時間後に、脾臓細胞におけるLy6C+B220+CD11c+頻度ならびに、CD19またはCD3混入細胞のレベルのFACS分析のために、120G8未処理マウスおよび120G8処理マウス（1群につき3匹）の両方において脾臓細胞を単離した。120G8 mAbを用いたインビボの処理は、脾臓Ly6C+B220+CD11c+細胞の頻度を減少させた。さらに、残りのLy6C+B220+CD11c+細胞は、すべてpDCというわけではなかった。それは、それらが、CD3を発現し（42%）、そしてより低い程度でCD19を発現した（18%）から

20

30

【0050】

IFN産生に対する120G8枯渇の効果を評価するために、セリック（seric）IFNおよびIL12産生を、129Svマウス（1群につき3匹）におけるCpG処理の6時間後にアッセイした。それらのマウスは、予め120G8+細胞を枯渇していたか、または枯渇していなかった。コントロールのマウス血清（DOTAP単独）は、両方のサイトカインについてネガティブであった。120G8処理は、CpG処理（正常マウスについて、13300 pg/ml+/ - 1500、120G8処理マウスについて、150 pg/ml未満）によって誘導されるIFN産生を、完全に消滅させた一方、p40とp70との両方でIL12産生の小規模な阻害をもたらす（IL-12p70：正常マウスについて、1240 pg/ml+/ - 540、120G8処理マウスについて、300 pg/ml+/ - 74；IL-12p40：正常マウスについて、5806 pg/ml+/ - 1135、120G8処理マウスについて、4250 pg/ml+/ - 1170）。従って、120G8 mAbは、インビボでマウスからIFN産生細胞を枯渇させるために、使用し得る。

40

【0051】

（実施例11）

（IFNの存在下で、B細胞において、120G8発現は、アップレギュレートされる）

120G8 mAbは、正常マウスから単離された全休止細胞のなかで、pDCのみを

50

染色する。本発明者らは、いくらかの他の細胞もまた、サイトカイン活性化の後に、120G8によって染色され得るかどうかを調査した。Balb/cマウスから脾臓細胞を単離し、24時間、サイトカインの存在下においてインキュベートした。次いで、これらの細胞に対して、120G8と抗CD19 mAb、CD4 mAb、CD8 mAbまたはCD11c mAbとを用いた二重染色を分析した。自己蛍光細胞を、FL3チャンネルを用いてゲートアウトした。このことは、120G8 mAbによって認識される抗原は、100U/mlのIFN- γ に应答してB細胞およびCD11c+DC上でアップレギュレートされたが、T CD4+DCまたはT CD8+DC上ではアップレギュレートされなかったことを示した。このアップレギュレーションは、IFN- γ 、IL-12またはTNF- α に対する应答においては観察されなかった。しかし、B細胞上の120G8染色の平均蛍光強度は、依然として、pDCよりも少なくとも1ログ低いままであった。

10

【0052】

当業者に明らかであるように、本発明の多くの改変およびバリエーションは、その精神および範囲から逸脱することなく成され得る。本明細書に記載される特定の実施形態は、一例として提供され、本発明は、添付された特許請求の範囲の項目（このような特許請求の範囲が権利を与えられるものに対する等価物のすべての範囲を伴う）によってのみ限定される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

20

<110> Schering Corporation

<120> Antibodies Specific for Plasmacytoid Dendritic Cells

<130> SF06011WI01

<150> US 60/443,244

<151> 2003-01-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> oligodeoxynucleotide (ODN)

<400> 1

tcattggaaa acgttcttcg gggcg

25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligodeoxynucleotide (ODN)

40

<400> 2

tccatgacgt tcctgatgct

20

【手続補正書】

【提出日】平成17年8月15日(2005.8.15)

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2006517963000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/02133	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 16/28; C12N 5/20; G01N 33/543, 33/553, 33/563, 33/567 US CL : 435/2, 7.21, 7.24, 332, 343, 343.1; 436/503, 512, 518, 526; 530/ 388.2, 388.7, 388.73 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/2, 7.21, 7.24, 70.21, 449, 452, 332, 343, 343.1; 436/501, 503, 512, 518, 526, 548; 530/ 388.2, 388.7, 388.73 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
A	NAKANO et al. CD11c+B220+Gr-1+ Cells in Mouse Lymph Nodes and Spleen Display Characteristics of Plasmacytoid Dendritic Cells. Journal of Experimental Medicine. 15 October 2001, Vol. 194, No. 8, pages 1171-1178.	1-7	
X,P	ASSELIN-PATUREL et al. Mouse Strain Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Frequency and Function Revealed by a Novel Monoclonal Antibody. The Journal of Immunology. 2003, Vol. 171, pages 6466-6477, see entire document.	1-7	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.			
* Special categories of cited documents:			
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 01 December 2004 (01.12.2004)		Date of mailing of the international search report 27 JAN 2005	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>James L. Grun</i> James L. Grun Telephone No. 571-272-1600	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/02133

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, DIALOG
Search Terms: dendritic cell, plasmacytoid, pDC, mouse, murine, 120G8

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	

(81) 指定国 AP(BW, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 パトゥレル, カリーヌ
フランス国 エフ - 6 9 1 9 0 マーシー イエトワール, アレ デュ ボワ, 4 1 1

(72) 発明者 トリンチェリ, ジョルジュ
フランス国 エフ - 6 9 3 9 0 シャーリー, ルド コンダミンス, 6 4

(72) 発明者 ピン, ジャン - ジャック
フランス国 エフ - 6 9 7 2 0 サン ボネ ド ミューレ, アールエヌ 6 9 4

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA44 CA01 DA02 GA05 HA15
4B063 QA01 QQ08 QS33
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA90X AB04 AC14 CA25 CA46
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50 EA60

专利名称(译)	浆细胞样树突状细胞的抗体特异性		
公开(公告)号	JP2006517963A	公开(公告)日	2006-08-03
申请号	JP2006503035	申请日	2004-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	先灵公司 先灵葆雅有限公司		
申请(专利权)人(译)	先灵公司		
[标]发明人	パトウレルカリーヌ トリンチェリジョルジュ ピンジャンジャック		
发明人	パトウレル, カリーヌ トリンチェリ, ジョルジュ ピン, ジャン-ジャック		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 C12N5/06 C12Q1/04 G01N33/53 C12N15/09 C12P21/08 C07K16/28 C12N5/0784 C12N5/20 G01N33/569		
CPC分类号	C12N5/0639 C07K16/28 G01N33/56972		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N5/00.B C12N5/00.E C12Q1/04 G01N33/53.Y C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA60		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/443244 2003-01-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是能够结合免疫因子浆细胞样树突细胞 (PDC) (抗体) 和细胞系中表达的此类抗体, 使用这些抗体, 浆细胞样树突含有组织的pDC并识别和纯化细胞样细胞。最后, 本发明提供了一种从含有pDC的样品中鉴定pDC的方法, 包括使所述样品与120G8抗体接触以形成抗体/pDC复合物和pDC。检测抗体/pDC复合物的存在它涵盖了这一进程。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC Class : C12N 5/06, C12N 5/09, C12N 5/04, C12N 5/05, C12N 5/06, C12N 5/07, C12N 5/08, C12N 5/09, C12N 5/10, C12N 5/11, C12N 5/12, C12N 5/13, C12N 5/14, C12N 5/15, C12N 5/16, C12N 5/17, C12N 5/18, C12N 5/19, C12N 5/20, C12N 5/21, C12N 5/22, C12N 5/23, C12N 5/24, C12N 5/25, C12N 5/26, C12N 5/27, C12N 5/28, C12N 5/29, C12N 5/30, C12N 5/31, C12N 5/32, C12N 5/33, C12N 5/34, C12N 5/35, C12N 5/36, C12N 5/37, C12N 5/38, C12N 5/39, C12N 5/40, C12N 5/41, C12N 5/42, C12N 5/43, C12N 5/44, C12N 5/45, C12N 5/46, C12N 5/47, C12N 5/48, C12N 5/49, C12N 5/50, C12N 5/51, C12N 5/52, C12N 5/53, C12N 5/54, C12N 5/55, C12N 5/56, C12N 5/57, C12N 5/58, C12N 5/59, C12N 5/60, C12N 5/61, C12N 5/62, C12N 5/63, C12N 5/64, C12N 5/65, C12N 5/66, C12N 5/67, C12N 5/68, C12N 5/69, C12N 5/70, C12N 5/71, C12N 5/72, C12N 5/73, C12N 5/74, C12N 5/75, C12N 5/76, C12N 5/77, C12N 5/78, C12N 5/79, C12N 5/80, C12N 5/81, C12N 5/82, C12N 5/83, C12N 5/84, C12N 5/85, C12N 5/86, C12N 5/87, C12N 5/88, C12N 5/89, C12N 5/90, C12N 5/91, C12N 5/92, C12N 5/93, C12N 5/94, C12N 5/95, C12N 5/96, C12N 5/97, C12N 5/98, C12N 5/99, C12N 6/00, C12N 6/01, C12N 6/02, C12N 6/03, C12N 6/04, C12N 6/05, C12N 6/06, C12N 6/07, C12N 6/08, C12N 6/09, C12N 6/10, C12N 6/11, C12N 6/12, C12N 6/13, C12N 6/14, C12N 6/15, C12N 6/16, C12N 6/17, C12N 6/18, C12N 6/19, C12N 6/20, C12N 6/21, C12N 6/22, C12N 6/23, C12N 6/24, C12N 6/25, C12N 6/26, C12N 6/27, C12N 6/28, C12N 6/29, C12N 6/30, C12N 6/31, C12N 6/32, C12N 6/33, C12N 6/34, C12N 6/35, C12N 6/36, C12N 6/37, C12N 6/38, C12N 6/39, C12N 6/40, C12N 6/41, C12N 6/42, C12N 6/43, C12N 6/44, C12N 6/45, C12N 6/46, C12N 6/47, C12N 6/48, C12N 6/49, C12N 6/50, C12N 6/51, C12N 6/52, C12N 6/53, C12N 6/54, C12N 6/55, C12N 6/56, C12N 6/57, C12N 6/58, C12N 6/59, C12N 6/60, C12N 6/61, C12N 6/62, C12N 6/63, C12N 6/64, C12N 6/65, C12N 6/66, C12N 6/67, C12N 6/68, C12N 6/69, C12N 6/70, C12N 6/71, C12N 6/72, C12N 6/73, C12N 6/74, C12N 6/75, C12N 6/76, C12N 6/77, C12N 6/78, C12N 6/79, C12N 6/80, C12N 6/81, C12N 6/82, C12N 6/83, C12N 6/84, C12N 6/85, C12N 6/86, C12N 6/87, C12N 6/88, C12N 6/89, C12N 6/90, C12N 6/91, C12N 6/92, C12N 6/93, C12N 6/94, C12N 6/95, C12N 6/96, C12N 6/97, C12N 6/98, C12N 6/99, C12N 7/00, C12N 7/01, C12N 7/02, C12N 7/03, C12N 7/04, C12N 7/05, C12N 7/06, C12N 7/07, C12N 7/08, C12N 7/09, C12N 7/10, C12N 7/11, C12N 7/12, C12N 7/13, C12N 7/14, C12N 7/15, C12N 7/16, C12N 7/17, C12N 7/18, C12N 7/19, C12N 7/20, C12N 7/21, C12N 7/22, C12N 7/23, C12N 7/24, C12N 7/25, C12N 7/26, C12N 7/27, C12N 7/28, C12N 7/29, C12N 7/30, C12N 7/31, C12N 7/32, C12N 7/33, C12N 7/34, C12N 7/35, C12N 7/36, C12N 7/37, C12N 7/38, C12N 7/39, C12N 7/40, C12N 7/41, C12N 7/42, C12N 7/43, C12N 7/44, C12N 7/45, C12N 7/46, C12N 7/47, C12N 7/48, C12N 7/49, C12N 7/50, C12N 7/51, C12N 7/52, C12N 7/53, C12N 7/54, C12N 7/55, C12N 7/56, C12N 7/57, C12N 7/58, C12N 7/59, C12N 7/60, C12N 7/61, C12N 7/62, C12N 7/63, C12N 7/64, C12N 7/65, C12N 7/66, C12N 7/67, C12N 7/68, C12N 7/69, C12N 7/70, C12N 7/71, C12N 7/72, C12N 7/73, C12N 7/74, C12N 7/75, C12N 7/76, C12N 7/77, C12N 7/78, C12N 7/79, C12N 7/80, C12N 7/81, C12N 7/82, C12N 7/83, C12N 7/84, C12N 7/85, C12N 7/86, C12N 7/87, C12N 7/88, C12N 7/89, C12N 7/90, C12N 7/91, C12N 7/92, C12N 7/93, C12N 7/94, C12N 7/95, C12N 7/96, C12N 7/97, C12N 7/98, C12N 7/99, C12N 8/00, C12N 8/01, C12N 8/02, C12N 8/03, C12N 8/04, C12N 8/05, C12N 8/06, C12N 8/07, C12N 8/08, C12N 8/09, C12N 8/10, C12N 8/11, C12N 8/12, C12N 8/13, C12N 8/14, C12N 8/15, C12N 8/16, C12N 8/17, C12N 8/18, C12N 8/19, C12N 8/20, C12N 8/21, C12N 8/22, C12N 8/23, C12N 8/24, C12N 8/25, C12N 8/26, C12N 8/27, C12N 8/28, C12N 8/29, C12N 8/30, C12N 8/31, C12N 8/32, C12N 8/33, C12N 8/34, C12N 8/35, C12N 8/36, C12N 8/37, C12N 8/38, C12N 8/39, C12N 8/40, C12N 8/41, C12N 8/42, C12N 8/43, C12N 8/44, C12N 8/45, C12N 8/46, C12N 8/47, C12N 8/48, C12N 8/49, C12N 8/50, C12N 8/51, C12N 8/52, C12N 8/53, C12N 8/54, C12N 8/55, C12N 8/56, C12N 8/57, C12N 8/58, C12N 8/59, C12N 8/60, C12N 8/61, C12N 8/62, C12N 8/63, C12N 8/64, C12N 8/65, C12N 8/66, C12N 8/67, C12N 8/68, C12N 8/69, C12N 8/70, C12N 8/71, C12N 8/72, C12N 8/73, C12N 8/74, C12N 8/75, C12N 8/76, C12N 8/77, C12N 8/78, C12N 8/79, C12N 8/80, C12N 8/81, C12N 8/82, C12N 8/83, C12N 8/84, C12N 8/85, C12N 8/86, C12N 8/87, C12N 8/88, C12N 8/89, C12N 8/90, C12N 8/91, C12N 8/92, C12N 8/93, C12N 8/94, C12N 8/95, C12N 8/96, C12N 8/97, C12N 8/98, C12N 8/99, C12N 9/00, C12N 9/01, C12N 9/02, C12N 9/03, C12N 9/04, C12N 9/05, C12N 9/06, C12N 9/07, C12N 9/08, C12N 9/09, C12N 9/10, C12N 9/11, C12N 9/12, C12N 9/13, C12N 9/14, C12N 9/15, C12N 9/16, C12N 9/17, C12N 9/18, C12N 9/19, C12N 9/20, C12N 9/21, C12N 9/22, C12N 9/23, C12N 9/24, C12N 9/25, C12N 9/26, C12N 9/27, C12N 9/28, C12N 9/29, C12N 9/30, C12N 9/31, C12N 9/32, C12N 9/33, C12N 9/34, C12N 9/35, C12N 9/36, C12N 9/37, C12N 9/38, C12N 9/39, C12N 9/40, C12N 9/41, C12N 9/42, C12N 9/43, C12N 9/44, C12N 9/45, C12N 9/46, C12N 9/47, C12N 9/48, C12N 9/49, C12N 9/50, C12N 9/51, C12N 9/52, C12N 9/53, C12N 9/54, C12N 9/55, C12N 9/56, C12N 9/57, C12N 9/58, C12N 9/59, C12N 9/60, C12N 9/61, C12N 9/62, C12N 9/63, C12N 9/64, C12N 9/65, C12N 9/66, C12N 9/67, C12N 9/68, C12N 9/69, C12N 9/70, C12N 9/71, C12N 9/72, C12N 9/73, C12N 9/74, C12N 9/75, C12N 9/76, C12N 9/77, C12N 9/78, C12N 9/79, C12N 9/80, C12N 9/81, C12N 9/82, C12N 9/83, C12N 9/84, C12N 9/85, C12N 9/86, C12N 9/87, C12N 9/88, C12N 9/89, C12N 9/90, C12N 9/91, C12N 9/92, C12N 9/93, C12N 9/94, C12N 9/95, C12N 9/96, C12N 9/97, C12N 9/98, C12N 9/99, C12N 10/00, C12N 10/01, C12N 10/02, C12N 10/03, C12N 10/04, C12N 10/05, C12N 10/06, C12N 10/07, C12N 10/08, C12N 10/09, C12N 10/10, C12N 10/11, C12N 10/12, C12N 10/13, C12N 10/14, C12N 10/15, C12N 10/16, C12N 10/17, C12N 10/18, C12N 10/19, C12N 10/20, C12N 10/21, C12N 10/22, C12N 10/23, C12N 10/24, C12N 10/25, C12N 10/26, C12N 10/27, C12N 10/28, C12N 10/29, C12N 10/30, C12N 10/31, C12N 10/32, C12N 10/33, C12N 10/34, C12N 10/35, C12N 10/36, C12N 10/37, C12N 10/38, C12N 10/39, C12N 10/40, C12N 10/41, C12N 10/42, C12N 10/43, C12N 10/44, C12N 10/45, C12N 10/46, C12N 10/47, C12N 10/48, C12N 10/49, C12N 10/50, C12N 10/51, C12N 10/52, C12N 10/53, C12N 10/54, C12N 10/55, C12N 10/56, C12N 10/57, C12N 10/58, C12N 10/59, C12N 10/60, C12N 10/61, C12N 10/62, C12N 10/63, C12N 10/64, C12N 10/65, C12N 10/66, C12N 10/67, C12N 10/68, C12N 10/69, C12N 10/70, C12N 10/71, C12N 10/72, C12N 10/73, C12N 10/74, C12N 10/75, C12N 10/76, C12N 10/77, C12N 10/78, C12N 10/79, C12N 10/80, C12N 10/81, C12N 10/82, C12N 10/83, C12N 10/84, C12N 10/85, C12N 10/86, C12N 10/87, C12N 10/88, C12N 10/89, C12N 10/90, C12N 10/91, C12N 10/92, C12N 10/93, C12N 10/94, C12N 10/95, C12N 10/96, C12N 10/97, C12N 10/98, C12N 10/99, C12N 11/00, C12N 11/01, C12N 11/02, C12N 11/03, C12N 11/04, C12N 11/05, C12N 11/06, C12N 11/07, C12N 11/08, C12N 11/09, C12N 11/10, C12N 11/11, C12N 11/12, C12N 11/13, C12N 11/14, C12N 11/15, C12N 11/16, C12N 11/17, C12N 11/18, C12N 11/19, C12N 11/20, C12N 11/21, C12N 11/22, C12N 11/23, C12N 11/24, C12N 11/25, C12N 11/26, C12N 11/27, C12N 11/28, C12N 11/29, C12N 11/30, C12N 11/31, C12N 11/32, C12N 11/33, C12N 11/34, C12N 11/35, C12N 11/36, C12N 11/37, C12N 11/38, C12N 11/39, C12N 11/40, C12N 11/41, C12N 11/42, C12N 11/43, C12N 11/44, C12N 11/45, C12N 11/46, C12N 11/47, C12N 11/48, C12N 11/49, C12N 11/50, C12N 11/51, C12N 11/52, C12N 11/53, C12N 11/54, C12N 11/55, C12N 11/56, C12N 11/57, C12N 11/58, C12N 11/59, C12N 11/60, C12N 11/61, C12N 11/62, C12N 11/63, C12N 11/64, C12N 11/65, C12N 11/66, C12N 11/67, C12N 11/68, C12N 11/69, C12N 11/70, C12N 11/71, C12N 11/72, C12N 11/73, C12N 11/74, C12N 11/75, C12N 11/76, C12N 11/77, C12N 11/78, C12N 11/79, C12N 11/80, C12N 11/81, C12N 11/82, C12N 11/83, C12N 11/84, C12N 11/85, C12N 11/86, C12N 11/87, C12N 11/88, C12N 11/89, C12N 11/90, C12N 11/91, C12N 11/92, C12N 11/93, C12N 11/94, C12N 11/95, C12N 11/96, C12N 11/97, C12N 11/98, C12N 11/99, C12N 12/00, C12N 12/01, C12N 12/02, C12N 12/03, C12N 12/04, C12N 12/05, C12N 12/06, C12N 12/07, C12N 12/08, C12N 12/09, C12N 12/10, C12N 12/11, C12N 12/12, C12N 12/13, C12N 12/14, C12N 12/15, C12N 12/16, C12N 12/17, C12N 12/18, C12N 12/19, C12N 12/20, C12N 12/21, C12N 12/22, C12N 12/23, C12N 12/24, C12N 12/25, C12N 12/26, C12N 12/27, C12N 12/28, C12N 12/29, C12N 12/30, C12N 12/31, C12N 12/32, C12N 12/33, C12N 12/34, C12N 12/35, C12N 12/36, C12N 12/37, C12N 12/38, C12N 12/39, C12N 12/40, C12N 12/41, C12N 12/42, C12N 12/43, C12N 12/44, C12N 12/45, C12N 12/46, C12N 12/47, C12N 12/48, C12N 12/49, C12N 12/50, C12N 12/51, C12N 12/52, C12N 12/53, C12N 12/54, C12N 12/55, C12N 12/56, C12N 12/57, C12N 12/58, C12N 12/59, C12N 12/60, C12N 12/61, C12N 12/62, C12N 12/63, C12N 12/64, C12N 12/65, C12N 12/66, C12N 12/67, C12N 12/68, C12N 12/69, C12N 12/70, C12N 12/71, C12N 12/72, C12N 12/73, C12N 12/74, C12N 12/75, C12N 12/76, C12N 12/77, C12N 12/78, C12N 12/79, C12N 12/80, C12N 12/81, C12N 12/82, C12N 12/83, C12N 12/84, C12N 12/85, C12N 12/86, C12N 12/87, C12N 12/88, C12N 12/89, C12N 12/90, C12N 12/91, C12N 12/92, C12N 12/93, C12N 12/94, C12N 12/95, C12N 12/96, C12N 12/97, C12N 12/98, C12N 12/99, C12N 13/00, C12N 13/01, C12N 13/02, C12N 13/03, C12N 13/04, C12N 13/05, C12N 13/06, C12N 13/07, C12N 13/08, C12N 13/09, C12N 13/10, C12N 13/11, C12N 13/12, C12N 13/13, C12N 13/14, C12N 13/15, C12N 13/16, C12N 13/17, C12N 13/18, C12N 13/19, C12N 13/20, C12N 13/21, C12N 13/22, C12N 13/23, C12N 13/24, C12N 13/25, C12N 13/26, C12N 13/27, C12N 13/28, C12N 13/29, C12N 13/30, C12N 13/31, C12N 13/32, C12N 13/33, C12N 13/34, C12N 13/35, C12N 13/36, C12N 13/37, C12N 13/38, C12N 13/39, C12N 13/40, C12N 13/41, C12N 13/42, C12N 13/43, C12N 13/44, C12N 13/45, C12N 13/46, C12N 13/47, C12N 13/48, C12N 13/49, C12N 13/50, C12N 13/51, C12N 13/52, C12N 13/53, C12N 13/54, C12N 13/55, C12N 13/56, C12N 13/57, C12N 13/58, C12N 13/59, C12N 13/60, C12N 13/61, C12N 13/62, C12N 13/63, C12N 13/64, C12N 13/65, C12N 13/66, C12N 13/67, C12N 13/68, C12N 13/69, C12N 13/70, C12N 13/71, C12N 13/72, C12N 13/73, C12N 13/74, C12N 13/75, C12N 13/76, C12N 13/77, C12N 13/78, C12N 13/79, C12N 13/80, C12N 13/81, C12N 13/82, C12N 13/83, C12N 13/84, C12N 13/85, C12N 13/86, C12N 13/87, C12N 13/88, C12N 13/89, C12N 13/90, C12N 13/91, C12N 13/92, C12N 13/93, C12N 13/94, C12N 13/95, C12N 13/96, C12N 13/97, C12N 13/98, C12N 13/99, C12N 14/00, C12N 14/01, C12N 14/02, C12N 14/03, C12N 14/04, C12N 14/05, C12N 14/06, C12N 14/07, C12N 14/08, C12N 14/09, C12N 14/10, C12N 14/11, C12N 14/12, C12N 14/13, C12N 14/14, C12N 14/15, C12N 14/16, C12N 14/17, C12N 14/18, C12N 14/19, C12N 14/20, C12N 14/21, C12N 14/22, C12N 14/23, C12N 14/24, C12N 14/25, C12N 14/26, C12N 14/27, C12N 14/28, C12N 14/29, C12N 14/30, C12N 14/31, C12N 14/32, C12N 14/33, C12N 14/34, C12N 14/35, C12N 14/36, C12N 14/37, C12N 14/38, C12N 14/39, C12N 14/40, C12N 14/41, C12N 14/42, C12N 14/43, C12N 14/44, C12N 14/45, C12N 14/46, C12N 14/47, C12N 14/48, C12N 14/49, C12N 14/50, C12N 14/51, C12N 14/52, C12N 14/53, C12N 14/54, C12N 14/55, C12N 14/56, C12N 14/57, C12N 14/58, C12N 14/59, C12N 14/60, C12N 14/61, C12N 14/62, C12N 14/63, C12N 14/64, C12N 14/65, C12N 14/66, C12N 14/67, C12N 14/68, C12N 14/69, C12N 14/70, C12N 14/71, C12N 14/72, C12N 14/73, C12N 14/74, C12N 14/75, C12N 14/76, C12N 14/77, C12N 14/78, C12N 14/79, C12N 14/80, C12N 14/81, C12N 14/82, C12N 14/83, C12N 14/84, C12N 14/85, C12N 14/86, C12N 14/87, C12N 14/88, C12N 14/89, C12N 14/90, C12N 14/91, C12N 14/92, C12N 14/93, C12N 14/94, C12N 14/95, C12N 14/96, C12N 14/97, C12N 14/98, C12N 14/99, C12N 15/00, C12N 15/01, C12N 15/02, C12N 15/03, C12N 15/04, C12N 15/05, C12N 15/06, C12N 15/07, C12N 15/08, C12N 15/09, C12N 15/10, C12N 15/11, C12N 15/12, C12N 15/13, C12N 15/14, C12N 15/15, C12N 15/16, C12N 15/17, C12N 15/18, C12N 15/19, C12N 15/20, C12N 15/21, C12N 15/22, C12N 15/23, C12N 15/24, C12N 15/25, C12N 15/26, C12N 15/27, C12N 15/28, C12N 15/29, C12N 15/30, C12N 15/31, C12N 15/32, C12N 15/33, C12N 15/34, C12N 15/35, C12N 15/36, C12N 15/37, C12N 15/38, C12N 15/39, C12N 15/40, C12N 15/41, C12N 15/42, C12N 15/43, C12N 15/44, C12N 15/45, C12N 15/46, C12N 15/47, C12N 15/48, C12N 15/49, C12N 15/50, C12N </p>		