

(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2004-504020

(P2004-504020A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 3
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-512228 (P2002-512228)	(71) 出願人	596129215
(86) (22) 出願日	平成13年7月17日 (2001.7.17)		シェーリング コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月15日 (2003.1.15)		Schering Corporation
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/022663		アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
(87) 国際公開番号	W02002/006328		033-0530, ケニルワース, ギ
(87) 国際公開日	平成14年1月24日 (2002.1.24)		ャロッピング ヒル ロード 2000,
(31) 優先権主張番号	00306087.8		パテント デパートメント - ケイ-6
(32) 優先日	平成12年7月18日 (2000.7.18)		-1 1990
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		2000 Galloping Hill
			Road, Kenilworth,
			New Jersey 07033-05
			30, U. S. A
		(74) 代理人	100107489
			弁理士 大塩 竹志
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2型樹状細胞前駆体由来のコード核酸ならびに関連の組成物および方法

(57) 【要約】

免疫系の樹状細胞に関連する遺伝子が、単離され、クローニングされ、配列決定され、そして機能的に同定された。これらの核酸およびコードされたタンパク質を、診断目的および治療目的のために使用し得る。配列番号2、4または6に由来するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。成熟タンパク質のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。配列番号2、4または6に由来するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2、4 または 6 に由来するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

成熟タンパク質のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 2、4 または 6 に由来するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

【請求項 4】

前記ヌクレオチド配列が前記成熟タンパク質をコードする、請求項 3 に記載の核酸。

【請求項 5】

配列番号 1、3 または 5 に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 4 に記載の核酸。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドに特異的に結合する、結合化合物。

【請求項 8】

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 7 に記載の結合化合物。

【請求項 9】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 8 に記載の結合化合物。

【請求項 10】

請求項 3 に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 10 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 13】

ポリペプチドを組換え的に生成するためのプロセスであって、該プロセスは、該ポリペプチドが発現される条件下で請求項 12 に記載の宿主細胞を培養する工程を包含する、プロセス。

【請求項 14】

サンプル中の特定の核酸配列を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

- a) 配列番号 1、3 または 5 から選択される少なくとも 8 連続ヌクレオチドを含む核酸配列を含むプローブと、特定の核酸配列を含むことが疑われるサンプルを、該プローブと該サンプル中の該特定の核酸との間のハイブリッドを形成し得る条件下で接触させる工程；
- b) 工程 (a) において形成された任意のハイブリッドを検出する工程であって、ここで、該ハイブリッドの検出が、該サンプル中の該特定の核酸配列の存在を示す、工程、を包含する、方法。

【請求項 15】

前記検出する工程の前に、前記サンプル中の前記特定の配列を増幅する工程をさらに包含する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

サンプル中の特定の抗原性成分を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

- a) 配列番号 2、4 または 6 に由来するアミノ酸配列によってコードされる特定の抗原性成分を含むことが疑われるサンプルを、該成分に対して特異的な抗体または抗体フラグメントと、該抗体または該抗体フラグメントと該サンプル中の該抗原性成分との間で安定な抗原-抗体複合体が形成され得る条件下で接触させる工程；および
- b) 工程 (a) において形成された任意の抗原-抗体複合体を検出する工程であって、ここで、抗原-抗体複合体の検出が、該サンプル中の該抗原性成分の存在を示す、工程、を包含する、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

候補治療剤をスクリーニングする方法であって、以下：

- a) 配列番号 2、4 または 6 に由来するアミノ酸配列を有するポリペプチドを、標的配列として選択する工程；
- b) 試験化合物を、該標的配列と接触させる工程；および
- c) 該標的配列に結合する試験化合物を、該候補治療剤として選択する工程、を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に、免疫系において機能する細胞である樹状細胞に関連する遺伝子に関する。本発明は、より具体的には、樹状細胞から単離された核酸、該核酸によってコードされるタンパク質ならびに関連の診断的および治療的な組成物および方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

樹状細胞は、抗原の取り込みおよび T 細胞に対する抗原提示において専門化する。従って、樹状細胞は、抗原特異的免疫応答において重要な役割を果たす。

【0003】

樹状細胞は、体中で種々のリンパ組織および非リンパ組織に広く分布する、形態学的に類似した細胞型の多様な集団によって表される (Caux ら、1995、Immunology Today 16:2; Steinman、1991、Ann. Rev. Immunol. 9:271-296)。例えば、これらの細胞としては、脾臓のリンパ樹状細胞、表皮のランゲルハンス細胞および血液循環中のベール細胞が挙げられる。樹状細胞は、集合的に、その形態、高レベルの表面 MHC クラス II 発現、ならびに T 細胞の結合および同時刺激を媒介するいくつかのアクセサリ分子 (B7-1 [CD80] および B7-2 [CD86]) の発現に基づいて、グループとして分類される (Inaba ら、1990、Intern. Rev. Immunol. 6:197-206; Friendenthal ら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7698)。さらに、T 細胞、B 細胞、単球およびナチュラルキラー細胞上で発現される特定の他の表面マーカーの非存在は、樹状細胞を示す。

【0004】

樹状細胞は、骨髄由来であり、そして血流を介して前駆体として組織に移動し、ここで、樹状細胞は、表皮のランゲルハンス細胞のような常在性の細胞になる。末梢において、病原体の侵入後に、未成熟樹状細胞 (例えば、新鮮なランゲルハンス細胞) は、炎症部位で補充され (Kaplan ら、1992、J. Exp. Med. 175:1717-1728; McWilliam ら、1994、J. Exp. Med. 179:1331-1336)、ここで、樹状細胞は、抗原を捕捉し、そしてプロセッシングする (Inaba ら、1986、J. Exp. Med. 164:605-613; Streilein ら、1989、J. Immunol. 143:3925-3933; Romanis ら、1989、J. Exp. Med. 169:1169-1178; Pure ら、1990、J. Exp. Med. 172:1459-1469; Schuler ら、1985、J. Exp. Med. 161:526-546)。

【0005】

次いで、抗原をロードされた樹状細胞は、末梢組織から、リンパ管を介してリンパ節の T 細胞豊富な領域に移動し、ここで、成熟樹状細胞は、樹枝状細胞 (interdigitating cell) と呼ばれる。(Austyn ら、1988、J. Exp. Med. 167:646-651; Kupiec-Weglinski ら、1988、J. Exp. Med. 167:632-645; Larsen ら、1990、J. Exp. Med. 172:1483-1494; Fossum, S. 1988、Scand. J. Immunol. 27:97-105; Macatonia ら、1987、J. Exp. Med. 166:111-121)。

10

20

30

40

50

． 166：1654－1667；K r i p k e ら、1990、J． I m m u n o l． 145：2833－2838）。この部位で、樹状細胞は、プロセシングされた抗原をナイーブなT細胞に提示し、そして抗原特異的な一次T細胞応答を生成する（L i u ら、1993、J． E x p． M e d． 177：1299－1307；S o r n a s s e ら、1992、J． E x p． M e d． 175：15－21；H e u f l e r ら、1988、J． E x p． M e d． 167：700－705）。

【0006】

末梢組織からリンパ器官への移動の間、樹状細胞は、表現型および機能における劇的な変化を包含する、成熟プロセスを経る（L a r s e n ら、1990、J． E x p． M e d． 172：1483－1494；S t r e i l e i n e ら、1990、I m m u n o l． 10 R e v． 117：159－184；D e S m e d t ら、1996、J． E x p． M e d． 184：1413－1424）。特に、可溶性タンパク質を効果的に捕捉およびプロセスし、そして特異的記憶およびエフェクターT細胞の活性化において有効な、未成熟樹状細胞（例えば、新鮮なランゲルハンス細胞）とは対照的に、成熟樹状細胞（例えば、リンパ器官の樹枝状細胞）は、抗原捕捉およびプロセシングにおいて劣るが、ナイーブなT細胞のプライミングにおいては顕著に効果的である（I n a b a ら、1986、J． E x p． M e d． 164：605－613；S t r e i l e i n ら、1989、J． I m m u n o l． 143：3925－3933；R o m a n i ら、1989、J． E x p． M e d． 169：1169－1178；P u r e ら、1990、J． E x p． M e d． 172：1459－1469；S a l l u s t o ら、1995、J． E x p． M e d． 182：38 20 9－400；C e l l a ら、1997、C u r r e n t O p i n． I m m u n o l． 9：10－16）。複合体輸送および樹状細胞の成熟パターンを調節するシグナルは、複雑でありかつ完全には理解されていない。

【0007】

抗原提示およびT細胞活性化における機能に加えて、腫瘍抗原をロードされた樹状細胞は、腫瘍の発達を予防し、そして確立された腫瘍の退行を誘導しさえすることが示されている。さらに、樹状細胞の特定の亜集団は、同種移植およびおそらく異種移植の分野において非常に有用であることを証明し得る特性である耐性状態を誘導し得るという証拠が、現在存在する。従って、どの樹状細胞のサブセットが、異なる病理学において標的化されるべきかを規定することが重要である。 30

【0008】

免疫系機能および関連の腫瘍増殖抑制に対する樹状細胞の重要性にもかかわらず、樹状細胞は、樹状細胞の起源、樹状細胞が発現するタンパク質、および樹状細胞の多くの機能に関して、特徴付けが不十分のままである。特に、免疫応答の開始（抗原のプロセシングおよび提示を含む）に関連するプロセスおよび機構は、十分に解明されていない。

【0009】

樹状細胞は、骨髄および非骨髄由来の細胞型を含む、いくつかの供給源に起源する。こうして同定された樹状細胞の多くは、はるかに単球（骨髄）起源に由来する。おそらくリンパ起源に由来する樹状細胞の、これまで分類分けされていないサブセットは、特に研究および分類分けの価値がある。なぜなら、この樹状細胞のサブセットは、大量のインターフェ 40 ロン α を生成するからである。インターフェロン α は、ウイルス病原体の抑制において特に重要であり、そしてまた癌抑制においても意図される。

【0010】

従って、樹状細胞の成熟、輸送および機能に関与する遺伝子およびタンパク質の同定についての重要な必要性が、当該分野において存在する。さらに、免疫系の機能に非常に重要なこれらの細胞の不適切な調節、発達および／または生理学によって引き起こされる医学的状态の診断および処置において有用な薬剤についての必要性が存在する。

【0011】

（発明の要旨）

本発明は、樹状細胞から単離された新規遺伝子を提供することによって、これらの必要性 50

を満たす。樹状細胞のこの特定のサブセットは、おそらく、骨髄起源に対して、リンパ起源のものである。この新規遺伝子は、おそらく、細胞表面レセプターおよび分泌タンパク質としてこのような分子をコードする。これらの遺伝子は、樹状細胞によって生成されるかまたは樹状細胞上に発現される特定の遺伝子産物の存在、量、分布および常態を研究するために使用され得る。これらはまた、特定の疾患状態を診断および処置するために有用な、組成物および方法の発見を容易にするために使用され得る。

【0012】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号2、4または6に由来するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。配列番号2、4または6に由来するポリペプチドは、配列番号2、4または6由来の少なくとも8、好ましくは少なくとも10、そして最も好ましくは少なくとも約12以上連続するアミノ酸残基ならびにこれらの配列の配列と機能の保存的改変体を含む。好ましい実施形態において、このアミノ酸配列は、成熟タンパク質をコードする。

10

【0013】

関連の実施形態において、本発明は、配列番号2、4または6に由来するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。この単離された核酸配列は、配列番号2、4または6由来の、少なくとも約12、好ましくは少なくとも約18、より好ましくは少なくとも20〜35、そして最も好ましくは35〜55以上連続するヌクレオチドを含む。この核酸は、DNA、RNA、AND/RNA二重鎖、タンパク質-核酸またはこれらの誘導体であり得る。好ましい実施形態において、この核酸配列は、配列番号1、3または5に示される核酸配列を含む。

20

【0014】

本発明はまた、本発明のヌクレオチド配列を含む組換えDNAベクター（DNAベクターおよび発現ベクターを含む）；このようなベクターを含む細胞（細菌、真菌、植物、昆虫および哺乳動物の細胞を含む）、ならびにこれらの配列によってコードされるRNAおよびポリペプチドを含む発現産物を生成するための方法を包含する。

【0015】

なお別の実施形態において、本発明は、請求項1のポリペプチドに特異的に結合する結合化合物を提供する。好ましくは、この結合化合物は、抗体または抗体フラグメントである。最も好ましくは、この結合化合物は、モノクローナル抗体である。

30

【0016】

本発明はまた、サンプル中の本発明の核酸およびポリペプチドを検出するための方法を提供する。本発明の核酸を検出するための方法は、以下の工程を包含する：（1）ハイブリダイゼーションが生じ得る条件下で、サンプルを、配列番号1、3または5から選択される少なくとも8連続するヌクレオチドを含む核酸を含むプローブと接触させる工程；および（2）存在する場合、ハイブリダイゼーションを検出する工程。本発明のポリペプチドを検出するための方法は、以下の工程を包含する：（1）サンプルを、検出されるべきポリペプチドに特異的な抗体または抗体フラグメントと接触させる工程；および（2）抗原-抗体複合体の存在を検出する工程。

【0017】

最後に、本発明は、候補治療剤のスクリーニングの方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：（1）配列番号2、4または6由来のアミノ酸配列を有するポリペプチドを標的として選択する工程；および（2）試験化合物を標的配列と接触させる工程；および（3）この標的配列に結合する試験化合物を、候補治療剤として選択する工程。

40

【0018】

（発明の詳細な説明）

本発明は、樹状細胞由来の核酸およびコードされたタンパク質に関する。さらに、本発明は、これらの核酸およびタンパク質を利用する診断方法および治療方法に関する。

【0019】

本明細書中で引用される全ての特許出願、特許および文献は、本明細書中でその全体が参

50

考として援用される。

【0020】

本発明の実行において、分子生物学、微生物学および組換えDNAにおける多くの慣用的な技術が使用される。このような技術は、周知であり、そして、例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York；DNA Cloning: A Practical Approach、第I巻および第II巻、1985（D. N. Glover編）；Oligonucleotide Synthesis、1984（M. L. Gait編）；Nucleic Acid Hybridization、1985（HamesおよびHiggins）；Transcription and Translation、1984（HamesおよびHiggins編）；Animal Cell Culture、1986（R. I. Freshney編）；Immobilized Cells and Enzymes、1986（IRL Press）；Perbal、1984、A Practical Guide to Molecular Cloning；シリーズ、Methods in Enzymology（Academic Press Inc.）；Gene Transfer Vector for Mammalian Cells、1987（J. H. MillerおよびM. P. Calos編、Cold Spring Harbor Laboratory）；およびMethods in Enzymology第154巻および第155巻（それぞれ、WuおよびGrossman編、ならびにWu編）において完全に説明される。 10 20

【0021】

本発明を詳細に説明する前に、以下の定義が、本明細書および特許請求の範囲の理解を助けるために提供される：

「樹状細胞由来の（dendritic-derived）」核酸またはポリペプチドとは、その配列が元々単離された供給源をいう。

【0022】

「富化された遺伝子産物」とは、特定の細胞型または組織によって大量に生成されるタンパク質である。 30

【0023】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」とは、任意の長さの、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドのいずれか、あるいは混合されたポリリボ-ポリデオキシリボヌクレオチドの、プリン含有ポリマーおよびピリミジン含有ポリマーをいう。これは、一本鎖の分子および二本鎖の分子（すなわち、DNA-DNA、DNA-RNAおよびRNA-RNAハイブリッド）、ならびにアミノ酸骨格に塩基を結合体化することによって形成される「タンパク質核酸」（PNA）を含む。これはまた、改変された塩基を含む核酸を含む。

【0024】

「コード配列」または「タンパク質コード配列」とは、mRNAに転写され得るポリヌクレオチド配列および／またはポリペプチドに翻訳され得るポリヌクレオチド配列である。コード配列の境界は、代表的に、5'末端の翻訳開始コドンおよび3'末端の翻訳終止コドンによって決定される。 40

【0025】

核酸配列の「相補体」とは、元の配列とのWatson-Crick塩基対に関与する「アンチセンス」配列をいう。

【0026】

「単離された」核酸またはポリペプチドとは、その元の環境（例えば、それが天然に存在する場合は、天然の環境）から取り出された成分をいう。単離された核酸またはポリペプチドは、好ましくは、それが元々関連する細胞成分の約50%未満、より好ましくは約7 50

5 %未満、そして最も好ましくは約90 %未満を含む。

【0027】

指定された配列「に由来する (derived from)」核酸配列またはポリペプチド配列とは、指定された配列のある領域に対応する配列をいう。核酸配列について、これは、この配列ならびに「配列保存的改変体」および「機能保存的改変体」に相同または相補的である配列を包含する。ポリペプチド配列について、これは、「機能保存的改変体」を包含する。配列保存的改変体とは、所定のコドン位置における1以上のヌクレオチド変化がその位置でのコードされたアミノ酸の変更を生じない、改変体である。機能保存的改変体は、ポリペプチド中の所定のアミノ酸残基がネイティブなポリペプチドの全体の立体構造および機能を実質的に変更せずに変化された改変体であり、同様の物理化学的特性（例えば、酸性、塩基性、疎水性など）を有するアミノ酸でのアミノ酸の置換を含むが、これに限定されない。「機能保存的」改変体はまた、指定されたポリペプチドに特異的な抗体を惹起する能力を有する任意のポリペプチドを含む。

【0028】

「プローブ」は、プローブ中の少なくとも1つの配列の、標的中の配列との相補性に起因して、この標的領域中の配列とハイブリッド構造を形成する核酸またはオリゴヌクレオチドをいう。

【0029】

核酸は、核酸の少なくとも1つの鎖が、規定されたストリンジェンシーの条件下で別の核酸鎖にアニールし得る場合に、互いに「ハイブリダイズ可能」である。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、例えば、a) ハイブリダイゼーションおよび／または洗浄が実行される温度、そしてb) ハイブリダイゼーション溶液および洗浄溶液のイオン強度および極性（例えば、ホルムアミド）ならびに他のパラメーターによって決定される。ハイブリダイゼーションは、2つの核酸が実質的に相補的な配列を含むことを必要とする；しかし、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに依存して、ミスマッチが許容され得る。核酸をハイブリダイズするために適切なストリンジェンシーは、核酸の長さおよび相補性の程度、当該分野で周知の変数に依存する。

【0030】

「免疫原性成分」とは、宿主動物において体液性免疫応答および／または細胞性免疫応答を惹起し得る部分をいう。

【0031】

「抗原性成分」とは、十分に高い親和性でその特異的な抗体に結合し、検出可能な抗原-抗体複合体を形成する部分をいう。

【0032】

「サンプル」とは、例えば、個体またはインビトロの細胞培養物成分から単離される組織または液体のような生物学的サンプル、ならびに実験室の手順から獲得されるサンプルをいう。

【0033】

本発明は、樹状細胞によって発現されるかおよび／または樹状細胞上に発現される哺乳動物タンパク質をコードする核酸配列を提供する。特定のヒト樹状細胞由来の遺伝子および遺伝子産物が本明細書中に記載されるが、本発明は、他の供給源または哺乳動物種由来の構造的に関連する（例えば、配列）実施形態（多型改変体または個体改変体を含む）を包含する。これらとしては、例えば、配列（例えば、約5 %未満）および数（例えば、20残基未満の置換（代表的には、15未満、好ましくは10未満およびより好ましくは5未満の置換））に置いて相対的にほとんど変化を示さないタンパク質が挙げられる。これらとしてはまた、これらの配列の実質的なセグメントを含む全長タンパク質および融合タンパク質から短縮されたバージョンが挙げられる。

【0034】

本発明者らは、推定リンパ起源の樹状細胞から、3つの遺伝子を単離した。ヒトは、樹状細胞前駆体の2つの別個のサブセットを有する。末梢血単球は、いくつかの補因子での刺

激および／または身体における適切なプロセッシング後に、成熟骨髄（I型）樹状細胞（DC1）を生じる。II型樹状細胞（DC2）は、推定リンパ起源から生じる。例えば、ヒト扁桃および血液由来のプラズマ細胞（リンパ）は、II型樹状細胞に分化する（Rissoanら、1999、Science 283:1183）。I型およびII型の樹状細胞は、異なる表面マーカーを有する。II型、 $CD3^-CD4^+CD11c^-$ の樹状細胞は、エンベロープのあるウイルス、細菌および腫瘍細胞に応答する、主要なインターフェロン α プロデューサーである（Siegalら、1999、Science 284:1835）。実施例Iは、これらのII型樹状細胞の単離を記載する。

【0035】

（実施例I）

（ $CD3^-CD4^+CD11c^-Lin^-$ 細胞の精製）

$CD3^-CD4^+CD11c^-$ 細胞を、ヒト扁桃から単離した。簡潔には、扁桃を、小片に切断し、そしてRPMI 1640中のコラゲナーゼIV（1mg/ml；Sigma）およびデオキシリボヌクレアーゼI（50KU/ml；Sigma）で、37℃で12分間消化した。2回の組織消化からプールされた細胞を、400gで20分、50%を超えるPercoll（Pharmacia Uppsala, Sweden）で遠心分離した。 $CD3^+$ T細胞、 $CD14^+$ 単球 $CD19^+$ B細胞および $CD20^+$ B細胞、ならびに $CD56^+$ NK細胞を、得られた低密度の細胞から、免疫磁気ビーズ（シート抗マウスIgコートされたDynabeads；Dynal, Oslo, Norway）によって枯渇させた。得られた細胞を、マウス抗CD4-PE-Cy5（Immunotech 20）、抗CD11c-PE（Becton Dickinson）、ならびにFITC標識されたmAb抗CD3および抗CD34のカクテル（Immunotech）、抗CD20、抗CD57、抗CD7、抗CD14および抗CD16（Becton Dickinson）、ならびに抗CD1a（Ortho）で染色した。次いで、 $CD3^-CD4^+CD11c^-Lin^-$ 細胞を、細胞分類によって単離した。分類された細胞の再分析によって、98%の純度を確認した（Grouardら、1997、J. Exp. Med.、185:1101-1111）。

【0036】

$CD3^-CD4^+CD11c^-$ 細胞によって主におよび／または排他的に生成される3つの遺伝子（本明細書中以降、コンティグ58、92および20という）を、単離し、配列決定し、そしてcDNAサブトラクションを介して機能的に同定した。コンティグ58は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列および配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する。コンティグ92は、配列番号3に示されるヌクレオチド配列および配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する。コンティグ20は、配列番号5に示されるヌクレオチド配列および配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する。要するに、cDNAサブトラクションは、1つのmRNA集団で発現されるが、別のmRNA集団においては減少しているかまたは存在しない遺伝子を見出すための方法である。実施例IIは、このサブトラクションプロセスを記載する。

【0037】

（実施例II）

（サブトラクトされたcDNAライブラリーの構築）

扁桃由来の98%精製された $CD3^-CD4^+CD11c^-$ 細胞から単離されたmRNAから作製されたcDNAを、 $CD3^-CD4^+CD11c^-$ 細胞によって排他的に生成されるか、または少なくとも豊富な生成を示す遺伝子産物を決定するために、単球由来のDC1から単離されたmRNAから作製されたcDNAからサブトラクトした。この $CD3^-CD4^+CD11c^-$ 細胞を、IL-3およびCD40L繊維芽細胞中で、一晚または48時間培養した（細胞の2つのサブセットをプールした）。単球由来のDC1を、GM-CSFおよびIL4中で6日間培養し、GM-CSF+CD40Lで一晩または48時間活性化した。相補的DNAの合成およびサブトラクションを、AdvantageTM Klen Tagポリメラーゼ（Clontech）を使用するPCR-select

10

20

30

40

50

キット (Clontech、Palo Alto、CA) を利用して実行した。サーマルサイクラー (480; Perkin-Elmer Corp.、Norwalk、CT) で、1 回目の PCR 反応を 28 サイクル行い、そして 2 回目の (ネスト化) PCR を 12 サイクル行った。サブトラクトした DC cDNA をクローニングするため、10 回のネスト化反応物をプールし、そして 2% の低融点アガロースで分離した。個々のバンドを照準として、0.7~1.4 kb のサイズ範囲のゲルスライスを切り出し; DNA を溶出し、そして直接または増幅後のいずれかで、T/A ベクター (pCRII In vitro gen Corp.、San Diego、CA) 中にクローニングした。挿入物を自動配列決定によって、両方の方向で配列決定した。GenBank および dbest データベースに対する比較ならびにタンパク質相同性予測を、NCBI blast サーバー (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) から獲得した。 10

【0038】

(コンティグ 58)

コンティグ 58 は、実施例 I に記載のプラズマ細胞の富化された遺伝子産物であるが、これらの細胞によって排他的に生成されない。コンティグ 58 は、配列番号 1 によってコードされる。コンティグ 58 によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 2 に示される。

【0039】

コンティグ 58 の完全配列を獲得した後、BLAST 分析を使用して、他の遺伝子に対する相同性について配列を分析した。実施例 III は、このプロセスを記載する。 20

【0040】

(実施例 III)

(単離されたコンティグの、既知の遺伝子に対する配列比較)

配列比較のために、代表的に 1 つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピューターに入力し、必要な場合、部分配列の座標を指定し、そして配列アルゴリズムパラメーターを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する、試験配列の配列同一性パーセントを算定する。

【0041】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith および Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482 の局所的相同性アルゴリズム、Needleman および Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443 の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson および Lipman (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 の類似性検索方法、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、WI の GAP、BESTFIT、FASTA および TFASTA) のコンピューター化された実行、または目視検査 (一般には、Ausbel ら、前出を参照のこと) によって実行され得る。 40

【0042】

配列の同一性および配列の類似性のパーセントを決定するのに適切なアルゴリズムの例は、BLAST アルゴリズム (これは、Altschul ら (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 に記載される) である。BLAST 解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) を介して公的に利用可能である。このアルゴリズムは、問い合わせ配列中の W 長の短い単語を同定することによって、高いスコアリング配列の対 (HSP) を最初に同定することを包含し、これは、データベース配列において同じ長さの単語とアラインメントさせる (align) 場合に何らかの正の値の閾値スコア T と一致するかまたは閾値スコア T を満 50

足させるかのいずれかである。Tとは、近隣単語スコア閾値と称される (A l t s c h u l 1ら, 前出)。これらの最初の近隣単語のヒットは、検索を開始するためにシード (s e e d) として作用して、これらを含む、より長いH S Pを見出す。次いで、これらの単語のヒットは、累積アラインメントスコアが増加し得る限り、各配列に沿って両方向に伸長される。各方向におけるこれらの単語のヒットの伸長は、以下の場合に中断される：累積アラインメントのスコアがその最大到達値から量X低下する場合；累積スコアが、1つ以上の負のスコアリングの残基アラインメントの累積に起因して、ゼロ以下になった場合；またはいずれかの配列の末端に到達した場合。B L A S TアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、このアラインメントの感度およびスピードを決定する。B L A S Tプログラムは、単語長 (W) 11、B L O S U M 6 2スコアリング行列 (H e n i k o f fおよびH e n i k o f f (1989) P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 89:10915を参照のこと) アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、M = 5、N = 4、および両鎖の比較をデフォルトとして用いる。

【0043】

配列同一性のパーセントを算出するのに加えて、B L A S Tアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計学的解析を実施する (例えば、K a r l i nおよびA l t s c h u l (1993) P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 90:5873-5787を参照のこと)。B L A S Tアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小和確率 (P (N)) であり、これは、2つのヌクレオチド配列間または2つのアミノ酸配列間の一致が偶然生じる確率の指標を提供する。例えば、核酸は、試験核酸の参照核酸との比較における最小和確率が約0.1より低い、より好ましくは約0.01より低い、そして最も好ましくは約0.001より低い場合、参照配列に類似するとみなされる。

【0044】

保存されたアラインメントのパターン (いくつかの程度のストリンジェンシーで認められる) を、コンセンサスプログラム (インターネットURL <http://www.bork.embl-Leidelberg.de/Alignment/consensus.html>) によって引き出した。タンパク質のフィンガープリントのP R I N T Sライブラリー (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bism/dbbrowser/PRINTS/PRINTS.html>) (A t t w o o dら (1997) N u c l e i c A c i d s R e s . 25:212-217) は、多様なロイシンリッチリピート (L R R) のN末端の特徴およびC末端の特徴を柔軟に一致させる化合物モチーフ (P R I N T SコードL e u r i c h r p t) を用いてコンティグ58の細胞外セグメント中に存在するL R Rを確実に同定した。三状態 (t h r e e - s t a t e) の精度が72%を超える2つの予測アルゴリズムを用いて、認識作動力 (e f f o r t) を折り畳むための架橋 (b r i d g e) として細胞内ドメインのアラインメントについてのコンセンサス二次構造を誘導した (F i s c h e rら (1996) F A S E B J . 10:126-136)。神経ネットワークプログラムP H D (R o s tおよびS a n d e r (1994) P r o t e i n s 19:55-72) ならびに統計学的予測方法D S C (K i n gおよびS t e r n b e r g (1996) P r o t e i n S c i . 5:2298-2310) は両方とも、インターネットサーバー (それぞれのURL http://www.embl-eidelberg.de/predictprotein/phd_pred.html および http://bonsai.lif.icnet.uk/bmm/dsc/dsc_read_align.html) を有する。

【0045】

(実施例IV：コンティグの染色体局在決定)

染色体局在決定を、S t a n f o r d G 3 R H中分解能パネルを用いて実施した (R e s e a r c h G e n e t i c s , H u n t s v i l l e , A L , U . S . A .) 。P C Rを、目的の遺伝子の特異的に増幅するが、そのマウス等価物を増幅しないオリゴヌクレオチドを用いて実施する。結果を、異なる細胞株由来のゲノムDNA中のP C Rフラグ

メントの存在または非存在によってスコアリングする。この情報を、手動でスコアリングし、そして解析をRHマッパー (mapper) プログラム (<http://shgc-www.stanford.edu>) を用いて実施する。この方法を用いると、コンティグ58は、染色体19q13-q12 (免疫系の細胞表面レセプターをコードする多数の遺伝子を含む染色体の領域) に局在決定された。同様に、BACクローンAC008397に対する相同性によって、類似の染色体の局在が示される。

【0046】

BLAST解析に加えて、コンティグ58の推定ORFを、pSORTを用いてモチーフおよびタンパク質局在シグナルに関して解析した。

【0047】

(実施例V: コンティグのpSORT解析)

(1. シグナル配列の認識)

真核生物において、いわゆる小胞経路 (大きな流れ) を介してソーティングされるタンパク質は、通常、N末端にシグナル配列 (リーダーペプチドともいう) を有し、これは、ER膜を介してトランスロケーションされた後、切断される。いくつかのN末端シグナル配列は、切断されず、膜貫通セグメントとして残っているが、これは、これらのタンパク質がERに保持されることを意味しない; これらはさらに、小胞中に含まれてソーティングされ得る。pSORTは、シグナル配列の存在を、NakaiおよびKanehisa (Proteins 11 (2): 95-110, 1991) ならびにNakai, 1996によって改変されたMcGeoch方法 (D. J. McGeoch, Virus Res. , 3: 271, 1985) によって最初に予測する。それは、シグナル配列のN末端の正に荷電した領域 (N領域) および中央の疎水性領域 (H領域) を考慮する。判別スコアを、3つの値: H領域の長さ、H領域のピーク値、およびN領域の正味の電荷から算出する。大きな正の判別スコアは、そのタンパク質がシグナル配列を保有する可能性が高いことを意味するが、それはその切断の可能性とは関連しない。次に、pSORTは、シグナル配列認識のvon Heijne方法 (G. von Heijne, Nucl. Acids Res. , 14: 4683, 1986) を適用する。それは、重み行列方法であり、そして切断部位 ((-3, -1) 規則) 周辺のコンセンサスパターンの情報およびH領域の特性を組み込む。従って、それを用いて、シグナルアンカー配列を検出し得る。この「GvH」のアウトプットスコアは、3.5を減じた、もとの重み行列スコア (真核生物について) である。大きな正のアウトプットは、それが切断可能なシグナル配列を有する可能性が高いことを意味する。可能性のある切断部位の位置 (すなわち、シグナル配列の最もC末端側の位置) もまた、報告される。

【0048】

(2. 膜貫通セグメントの認識)

pSORTの現在のバージョンは、全ての内在性膜タンパク質が疎水性の膜貫通セグメント (膜中で α ヘリックスであると考えられる) を有すると仮定する。pSORTは、NakaiおよびKanehisa (Genomics, 1992, 14 (4): 897-911, 1992) によって改変された潜在的な膜貫通セグメントを検出するためのKleinらの方法 (ALOM, KKDともいう) (P. Klein, M. Kanehisa, およびC. DeLisi, Biochim. Biophys. Acta, 815: 468, 1985) を利用する。それを反復して、存在する場合、17残基のセグメントの平均疎水性値から最もありそうな膜貫通セグメントを同定する。これは、判別スコア (「ALOMスコア」として報告される) を閾値パラメーターと比較して、そのセグメントが膜貫通セグメント (内在性 (INTEGRAL)) であるかまたはそうでない (周辺性 (PERIPHERAL)) かを予測する。内在性膜タンパク質について、膜貫通セグメントの位置もまた、報告される。これらの長さを17に固定するが、その伸長 (すなわち、判別基準を満たす最大範囲) もまた丸括弧の中に示す。上記の判別工程は、検出されたセグメントを除いた後、推定膜貫通セグメントがなくなるまで続ける。項目「TMSの数」は、推定膜貫通セグメントの数である。このアルゴリズムを、推定成熟配列 (すなわち、切断

10

20

30

40

50

可能なシグナル配列が含まれない) に対して適用するので、この数を、成熟タンパク質についての数字であると予測する。Nakai および Kanehisa, 1992 による改変は、2 種類の閾値の値を利用した。なぜなら、ALOM は、ポリトープ性 (polytopic) (すなわち、複数の膜貫通) タンパク質の膜貫通セグメントの正確な数を予測するのにそれほど厳密ではないからである。このアプローチの理論的根拠は、一旦このポリペプチドの一部が組み込まれると、より疎水性の低いセグメントはより容易に膜に組み込まれるようであることである。特に、pSORT は、よりストリンジェントの低い値 (0.5) を用いて膜貫通セグメントの数を最初に試験的に評価する。次いで、よりストリンジェントな閾値 (-2.0) を用いることによってその数を再評価する。少なくとも 1 つの膜貫通セグメントを有すると依然として予測される場合、先の閾値の値が用いられる。

10

【0049】

(3. 膜トポロジーの予測)

いずれの膜タンパク質も、膜に組み込まれるべきそれ自体の配向性を有する。換言すると、膜タンパク質は、どちら側 (細胞質側または細胞質外側) に N 末端が位置するかをわかっている。このような配向は、膜トポロジーといわれる。膜トポロジーについての Singer の分類 (S. J. Singer, Ann. Rev. Cell Biol., 6: 247, 1990) を利用した。膜トポロジーの予測は重要である。なぜなら、いくつかのソーティングされたシグナルは、特定のトポロジーにおいて特定の位置 (例えば、細胞質末尾) に存在するからである (以下を参照のこと)。pSORT は、膜トポロジーの予測のために Hartmann らの方法 (E. Hartmann, T. A. Rapoport, および H. F. Lodish, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5786, 1989); pSORT において「MTOP」といわれる) を用いる。MTOP は、真核生物の膜タンパク質の全体のトポロジーが、両側における最も N 末端側の膜貫通セグメントに隣接する 15 残基の正味の電荷の差によって決定されると仮定する。このようなセグメントの中央の残基は、最初に報告される。タンパク質が切断可能な 1 つのシグナル配列および 1 つの膜貫通セグメントを有すると予測される場合、そのトポロジーは、「1a」である。タンパク質が切断可能なシグナル配列を有さないが 1 つの膜貫通セグメントを有すると予測される場合、その位置が試験される。それがその C 末端付近に存在する場合、そのトポロジーは、「Nt (N 尾部)」として割り当てられる (U. Kutay ら, Trends Cell Biol., 3: 72-75, 1993 を参照のこと)。他の場合、そのトポロジーは、MTOP によって報告される電荷の差に依存して「1b」または「2」に割り当てられる。ポリトープ性タンパク質について、それらのトポロジーは、MTOP によって単純に予測される。

20

30

【0050】

コンティグ 58 について、pSORT は、1 型膜タンパク質 (すなわち、(アミノ酸約 1 ~ 24 の) N 末端の切断可能なシグナルペプチドおよび約 166 ~ 182 の 1 つの膜貫通セグメントを有するタンパク質) を予測する。このタンパク質の N 末端は細胞の外側に存在し、C 末端は細胞の内側に存在する。コンティグ 58 によってコードされるタンパク質は、いくつかのロイシンリッチリピートを有すると特徴付けられる。これらのリピートは、タンパク質/タンパク質の相互作用にしばしば関連する。広範な潜在的なリガンドは、これらのモチーフを認識し、これは、分泌サイトカイン様の低分子のシステイン knott ファミリーのメンバーを含む。この型のドメインもまた、非タンパク質リガンド (例えば、核酸またはリポ多糖類) と相互作用することが公知である。従って、コンティグ 58 によってコードされる分子は、新規パターン認識レセプターを示し得る。

40

【0051】

推定アミノ酸配列はまた、2 つのチロシンベースのモチーフ、PI3 キナーゼとの相互作用のためのモチーフ (YENM)、および ITAM (免疫レセプターチロシンベースの活性化モチーフ: YXXI/L X (7/8) YXXI/L) を示す。これらのモチーフは、以下の参考文献に記載される: Biero M. Olcese ら, 「Early Si

50

gnaling via Inhibitory and Activating NK Receptors」, Hum Immunol 1:51-64 (Jan. 6, 2000); Gergely J. Pecht 氏, 「Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing Receptors Regulate the Immunoreceptor Tyrosine-based activation motif-induced activation of Immune Competent Cells」, Immunol Lett 1:3-15 (May 1999); Daeron, M., 「Structural Bases of Fc Gamma R functions」, Int. Rev. Immunol 16:1-27, (1997)。

10

【0052】

コンティグ58は、架橋したとき細胞の活性化を引き起こすシグナルを生じる、膜複合体の成分である型の分子であると考えられる。ITAM型のモチーフは、一般的に免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーまたはレクチンに関連し、従って、この分子は、新規ファミリーの細胞表面レセプターを示し得る。

【0053】

pSORTによって解明されるようなその構造、BLASTによって解明されるような他の遺伝子に対するその相同性、およびそのアミノ酸配列に基づいて、コンティグ58は、先天免疫細胞および好転免疫細胞の損傷誘導性活性化に関連する新規型のレセプターを示し得る。コンティグ58によってコードされるレセプターを誘発することは、免疫機能を刺激または調整し得る。同様に、このレセプターをブロックすることは、状態（例えば、自己免疫、移植片拒絶、および中毒性ショック）における過剰な刺激の影響を低減させ得る。

20

【0054】

（実施例VI：RT-PCRによる発現分析）

コンティグ58の発現パターンを、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって分析した。mRNAを、細胞、組織または細胞株から、mRNAを含むポリAを単離するためのオリゴdT結合体化磁気ビーズを用いて単離し、そして第1鎖cDNA合成を標準的方法を用いて実施した。次いで、コンティグ58の発現パターンを分析した。新たに単離された細胞において、コンティグ58は、非活性化B細胞、単球およびCD3-CD4+CD11c-DCによって発現される。インビトロで生じた細胞において、コンティグ58は、CD34+前駆体から生じた顆粒球およびDCによって発現される。コンティグ58によってコードされる遺伝子の発現は、MRC5（胎児肺線維芽細胞）、CHA（腎臓上皮細胞）、JY（EBV誘導性B細胞株）、Jurkat（T細胞株）、U937（組織球性骨髄腫）およびTF1（造血前駆体）のような細胞株においては見られない。

30

【0055】

コンティグ58によってコードされるこの新規分子は、造血細胞においてCD40-リガンド活性化によってダウンレギュレートされる。mRNAは、PMA-イオノマイシンで活性化された造血細胞株および非造血細胞株において検出されなかった。

40

【0056】

（実施例VII：組織ノーザンブロットによる発現分析）

総RNAを、ノーザンブロットおよび第1鎖cDNAの調製のために用いた。ノーザンブロットを、ホルムアルデヒド変性ゲルで分離した10μgの総RNAを用いて調製し、そしてHybond N⁺膜（Amersham, Les Ulis, France）にブロッティングした。ヒト成人組織およびヒト胎児組織のブロットもまた用いた（MTNブロット7760-1および7756-1 Clontech, Palo Alto, CA.）。ゲノムDNAを、標準的技術を用いてPBLから単離し、制限酵素で切断し、1%のアガロースゲルで分離し、そしてHybond N⁺膜にブロッティングした。ノーザンブロットおよびサザンブロットのハイブリダイゼーションは、High Prime

50

Kit (Boehringer Mannheim, Meylan, France) を用いて [32 P] dCTP で標識した特定の cDNA に対応する DNA フラグメントを用いてであった。高ストリンジェンシー洗浄を、 $0.2 \times$ SSC、 0.2% の SDS を用いて 2 回、30 分間実施した。第 1 鎖 cDNA を、 $5 \mu\text{g}$ の総 RNA の Dnase I 処理後、Superscript キットを用いてオリゴ (dT) プライマー (Pharmacia, Orsay, France) を用いて調製した。cDNA の合成を、 β アクチンプライマーを用いて RT-PCR によってチェックした。RT-PCR を、AmpliTaq 酵素ならびに緩衝液 (Perkin Elmer, Paris, France)、 0.8 mM の dNTP および最終濃度 5% の DMSO を用いて実施した。

【0057】

ノーザンブロットは、コンティグ 58 が、末梢血リンパ球において強い発現を示し、そして脾臓およびリンパ節においてより低い発現を示すことを示す。60 時間の暴露で癌細胞株中で検出可能な発現は存在しない。18 日後、Burkitt リンパ腫 Raji (EBV B 細胞株) 中で弱い発現が存在する。

【0058】

(コンティグ 92)

コンティグ 92 は、実施例 I に記載される形質細胞様細胞によって主に産生されるようである。コンティグ 92 について、pSORT は、約 $57 \sim 74$ の非切断シグナルアンカー配列を有する II 型膜貫通タンパク質を予測する。このタンパク質について予測されるトポロジーは、C 末端が細胞外側、N 末端が細胞質ゾル側である。

【0059】

(RT-PCR による発現分析)

コンティグ 92 にコードされるタンパク質の発現パターンを分析するために利用される詳細なプロトコルについては実施例 VI を参照のこと。コンティグ 92 の発現パターンを、RT-PCR によって分析した。この遺伝子は、 $CD3^- CD4^+ CD11c^- DC$ によって非常に強く発現され、単球および単球由来の DC によって発現され、インビトロで生じた顆粒球において弱く発現され、そして T 細胞、B 細胞、ならびに細胞株 JY および細胞株 Jurkat において非常に弱く発現された。

【0060】

(組織ノーザンブロットによる発現分析)

詳細なプロトコルについては実施例 VII を参照のこと。コンティグ 92 によってコードされるタンパク質の発現は、全ての造血細胞において検出され、胸腺および虫垂において非常に強く検出され、リンパ節および脾臓、胎児肝臓、骨髄において強く検出され、そして末梢血リンパ球においてより弱く検出される。癌細胞株において、発現は、黒色腫、および慢性白血病 MOL T-4 において見出される。

【0061】

(コンティグ 20)

コンティグ 20 について、pSORT は、切断可能なシグナルペプチドを有する分泌タンパク質を予測する。

【0062】

(RT-PCR による発現分析)

詳細なプロトコルについては実施例 VI を参照のこと。コンティグ 20 の発現パターンを、RT-PCR によって分析した。この遺伝子は、新たに単離された T 細胞および B 細胞、 $CD3^- CD4^+ CD11c^- DC$ 、インビトロで生じた顆粒球および $CD34^+$ 前駆体から生じた DC、ならびに単球によって発現される。さらに、この遺伝子は、造血細胞株 JY および造血細胞株 Jurkat によって発現されるが、造血細胞株 U937 および造血細胞株 TF1 によって発現されず、そして非造血細胞株 CHA および非造血細胞株 MRC5 によって発現されない。

【0063】

(組織ノーザンブロット (Clontech) による発現分析)

10

20

30

40

50

詳細なプロトコルについては実施例 V I I を参照のこと。ノーザンブロットは、0.7 kb の 1 つの主なバンドおよび 4.4 kb および 7.5 kb のより高分子量の 2 つのバンドを示す。

【0064】

0.7 kb のバンドは、配列番号 6 に示される推定 cDNA 配列に対応する。より高い MW の 2 つのバンドは、おそらく核のプレ mRNA (スプライシングされていない) である。この新規タンパク質 (コンティグ 20) は、ヒト骨髄、末梢血リンパ球、脾臓、およびリンパ節において高度に発現される。胸腺、虫垂および胎児肝臓において、発現は低減される。コンティグ 20 は、ヒト癌細胞株の Burkitt リンパ腫 Raji および慢性白血病 MOLT-4 において発現される。

10

【0065】

コンティグ 20 は、造血細胞によって発現される推定分泌分子をコードするようである。コンティグ 20 において発現されるタンパク質は、サイトカインであり得る。なぜなら、それは分泌され、それは造血細胞中に存在し、その広範な分布は、このタンパク質が細胞の相互作用に重要であることを示唆するからである。

【0066】

コンティグ 20 によってコードされるタンパク質はまた、ディフェンシン様分子であり得る。なぜなら、ディフェンシンは、3 つまたは 4 つの分子内システインジスルフィド結合を有する小さなペプチドのファミリーであり、そしてディフェンシンは、免疫細胞を化学誘引する能力に基づく抗微生物活性を有し、これによって宿主の免疫性を促進させるからである。

20

【0067】

コンティグ 20 は、新規の広範な造血性増殖因子、およびいくつかの癌 (白血病) に対するオートクライン因子を示し得る。これは、免疫細胞の相互作用を定量的および定性的の両方で制御し得、そして免疫刺激因子としてかまたは免疫調節因子として用いられ得る。あるいは、コンティグ 20 は、望ましくない免疫反応性 (例えば、自己免疫疾患または移植片拒絶) の状態においてブロック因子についての標的を示し得る。

【0068】

(マウスの等価物)

上記の配列のマウス相同体を、各遺伝子の ORF の BLAST 解析 (tBLASTn) を用いて同一の特徴を有するタンパク質を潜在的にコードするマウス EST を検出することによって検出した。コンティグを、得られた配列を用いて作製し、そして推定タンパク質を、そのヒトタンパク質のように解析した。

30

【0069】

コンティグ 58 のマウス相同体は、EST の W85307 および AI430301 によってコードされる。

【0070】

コンティグ 92 のマウス相同体は、脳において発現される (ESTAB030199)。

【0071】

複数の EST (80 を超える) が、コンティグ 20 に対するマウス相同体として同定された。これら (t h s e s e) (および原則として全ての ORF を含む EST) のうちの最も 5' 側のものは、AA968242、AA796464、AI317775 である。ノーザンブロットは、脾臓における非常に強い発現、心臓、肺、および肝臓における強い発現、ならびに腎臓における弱い発現を 2 kb のサイズで示す。精巣において、2 kb および 2.4 kb の 2 つのバンドが見られる。2.4 kb のバンドがより強い。骨格筋および脳において発現は見られない

40

(核酸、ベクター、および宿主細胞)

本発明は、核酸配列 (詳細には、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 5 に示される核酸配列、あるいは配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 に示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列) を提供する。本発明は、本明細書中で開示される個々の核酸配列の全

50

てまたはその一部を含む単離された核酸フラグメントを包含する。本発明の核酸配列は、少なくとも約12、好ましくは少なくとも約18、より好ましくは少なくとも約20～35、そして最も好ましくは少なくとも約35～55またはそれより多い連続するヌクレオチド（完全なタンパク質コード配列、またはその相補体を含む）を含む。本発明は、これらの配列の配列保存的（sequence-conservative）改変体および機能保存的（function-conservative）改変体を包含する。

【0072】

本明細書中で開示される配列のいずれかを含む核酸またはその部分配列は、配列番号1、配列番号3または配列番号5に提供される核酸配列情報を用いて標準的方法によって調製され得る。例えば、核酸は、例えば、以下を用いて化学的に合成され得る：Matteucciら，1981，J. Am. Chem. Soc. 103：3185のホスホルアミダイト固体支持体法、Yooら，1989，J. Biol. Chem. 764：17078の方法、または他の周知の方法。これは、一連のオリゴヌクレオチドカセット（合成用オリゴヌクレオチドの対を含む）を順番に連結することによってなされ得る。核酸は、細胞から直接単離され得る。あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）方法を用いて、化学的に合成された鎖またはゲノム材料のいずれかをテンプレートとして用いて本発明の核酸を産生し得る。PCRに用いるプライマーは、本明細書中で提供する配列情報を用いて合成され得、そしてさらに、所望の場合、組換え発現のための所定のベクターへの組み込みを容易にするため、適切な新しい制限部位を導入するよう設計され得る。当然のことながら、遺伝コードの縮重に起因して、多数の異なるヌクレオチド配列は、配列番号2、配列番号4または配列番号6に規定するアミノ酸配列あるいはその部分配列を有するポリペプチドをコードし得る。コドン、原核生物系または真核生物系における最適な発現のために選択し得る。このような縮重改変体もまた、本発明によって包含される。

【0073】

コードされるポリペプチドは、多数の既知のベクター（例えば、pUCプラスミド、pETプラスミド（Novagen, Inc., Madison, WI）、またはpRSETもしくはpREP（Invitrogen, San Diego, CA））、ならびに多数の適切な宿主細胞（例えば、Escherichia coli、Saccharomyces cerevisiae、ならびに昆虫細胞株および哺乳動物細胞株）を用いて、当業者に公知の方法を用いることによって発現され得る。ベクター／宿主の特定の選択は、本発明の実施に重要ではない。

【0074】

本発明の核酸は、例えば、ペプチドまたはポリペプチドの組換え産生のためのテンプレートとして、本明細書中で記載されるヒト遺伝子の検出のため、および染色体マッピングのためのプローブおよびプライマーとして、ならびに他哺乳動物種における相同遺伝子を同定するためのプローブとしてまたはPCRプライマーを設計するための用途を見出す。相同性は実験的に決定され得る。あるいは、相同性分析は、コンピューターにより実施され得る。本発明の実施において、別の哺乳動物種のゲノムと少なくとも約70%のDNA配列相同性をヌクレオチドレベルで共有する遺伝子は、その種中に存在すると考えられる。遺伝子が別の哺乳動物中に存在するという決定は、当該分野で公知の任意の技術を用いて達成され得る。適切な技術としては、限定することなく、ゲノムDNAへのハイブリダイゼーション、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーへのコロニーハイブリダイゼーション、縮重プライマーまたは遺伝子特異的プライマーおよびテンプレートとしてのゲノムDNAを用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、遺伝的相補性、抗体交差反応性、あるいはインビトロでの生化学的相補性が挙げられる。

【0075】

これらの技術の適用において、プローブとテンプレートとの間の異なるレベルの相同性を判別する条件が確立される。例えば、固定化したDNAに対するプローブのハイブリダイゼーション（サザンブロットにおいてであろうと、ドットブロットにおいてであろうと、コロニーハイブリダイゼーション形式においてであろうと）について、緩衝液中のSSC

濃度を変更することは、異なるレベルの相同性を有するハイブリッドの検出を可能にする（ $1 \times \text{SSC}$ は、 0.15 M の NaCl — 0.015 M のクエン酸 Na である）。 6 M の尿素および 0.4% のドデシル硫酸ナトリウムを含む洗浄緩衝液において、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5 \times \text{SSC}$ 、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、および $0.05 \times \text{SSC}$ の存在は、それぞれ、少なくとも $55\% + 5\%$ 、 $65\% + 5\%$ 、 $75\% + 5\%$ 、および $> 85\%$ の閾値の相同性を有するハイブリッドの形成を可能にする。好ましくは、一旦遺伝子がハイブリダイゼーションまたはPCRによって別の生物体において同定されると、この遺伝子のDNA配列は、直接決定される。

【0076】

相同配列を検出するいくつかの方法は、特定の遺伝子のタンパク質コード配列全体の一部のみの同定または単離を生じ得ることが理解される。タンパク質コード配列全体は、例えば、その配列の既知の部分をコードする単離された核酸、またはそのフラグメントを用いて、テンプレートとしてcDNAを用いた配列決定反応を開始し、続いてこの増幅された産物を配列決定することによって単離および同定され得る。開示される配列をコードする単離された核酸、またはそのフラグメントはまた、適切なcDNAライブラリーにハイブリダイズされて、より短い配列が一部を形成するタンパク質コード配列のさらなる完全なセグメントを含むクローンが同定され得る。次いで、タンパク質コード配列全体もしくはそのフラグメント、またはその配列の全体もしくは一部をコードする核酸、またはその配列保存的改変体もしくは機能保存的改変体は、本発明の実施において用いられ得る。

10

【0077】

類似の様式において、このタンパク質をコードする配列の5'隣接領域および3'隣接領域由来のさらなる配列（調節配列を含む）は、単離され得、そしてこのヌクレオチド配列が決定され得る。

20

【0078】

（ポリペプチド）

本明細書中に記載される、天然に存在する形態のポリペプチドおよび組換え形態のポリペプチド（グリコシル化形態および非グリコシル化形態の両方を含む）は両方とも、本発明によって包含される。本発明のポリペプチド（機能保存的改変体を含む）は、ヒト単球、またはタンパク質コード配列が導入および発現されている異種生物体もしくは異種細胞（例えば、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、および哺乳動物細胞）から単離され得る。本明細書中に記載されるタンパク質、またはその部分はまた、他のタンパク質との融合物として発現され得る。これらのポリペプチドは、市販の自動化手順（排他的固相合成（*exclusive solid phase synthesis*）、部分的固相方法、フラグメント縮合（*fragment condensation*）または古典的溶液合成が挙げられるがこれらに限定されない）によって化学合成され得る。ポリペプチドはまた、インビトロ翻訳によって有利に作製され得る。

30

【0079】

ポリペプチド精製のための方法は、当該分野で周知であり、この方法としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：分取ディスクゲル電気泳動（*preparative disc-gel electrophoresis*）、等電点電気泳動、スクロース密度勾配遠心分離（*sucrose density gradient centrifugation*）、HPLC、逆相HPLC、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび分配クロマトグラフィー、および向流分配。いくつかの目的のために、タンパク質が、精製を容易にするさらなる配列タグ（限定するわけではないが、例えば、ポリヒスチジン配列）を含む組換え系においてポリペプチドを産生することが好ましい。次いで、ポリペプチドは、適切な固相マトリクスにおけるクロマトグラフィーによって宿主細胞の粗溶解産物から精製され得る。あるいは、タンパク質に対してかまたはそれ由来のペプチドに対して産生される抗体は、精製試薬として用いられ得る。他の精製方法が可能である。

40

【0080】

50

本発明はまた、本明細書中に特に開示されるポリペプチドの誘導体およびホモログも包含する。いくつかの目的のために、ペプチドをコードする核酸配列は、機能的に等価な分子（すなわち、機能保存的改変体）を提供する置換、付加、または欠失によって変更され得る。例えば、その配列内の1つ以上のアミノ酸残基は、類似の性質の別のアミノ酸（例えば、正に荷電したアミノ酸（アルギニン、リジン、およびヒスチジン）；負に荷電したアミノ酸（アスパルテートおよびグルタメート）；極性の中性アミノ酸；ならびに非極性アミノ酸）によって置換され得る。

【0081】

単離されたポリペプチドは、例えば、リン酸化、硫酸化、アシル化、または他のタンパク質改変によって改変され得る。これらはまた、検出可能なシグナルを提供することが可能な標識（放射線同位体および蛍光化合物が挙げられるがこれらに限定されない）で、直接的または間接的のいずれかで改変され得る。

10

【0082】

本発明のポリペプチドは、例えば、結合研究のため、改変分子の構築および発現のため、構造／機能研究のため、ならびにポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための使用を見出す。抗体を調製するための免疫原性成分として有用なポリペプチドまたは結合因子研究のための標的として有用なポリペプチドは、長さが少なくとも5残基以上である。好ましくは、このポリペプチドは、少なくとも約12残基、より好ましくは少なくとも約20残基、および最も好ましくは少なくとも約30残基以上を含む。これらのポリペプチドを得るための方法は、周知であり、そして *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, 1987 (Mayer and Waler, 編; Academic Press, London); *Scopes*, 1987, *Protein Purification: Principles and Practice*, 第2版 (Springer-Verlag, N. Y.) および *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, 第I-IV巻 (Weir and Blackwell, 編) に説明されている。

20

【0083】

特異的な相互作用の結合パートナーのうちの1つのメンバーが単離されると、対抗するパートナーを単離するための方法が存在する。例えば、Gearringら, 1989, *EMBO J.* 8: 3667-3676を参照のこと。結合活性についてスクリーニングする多くの方法が、当業者によって公知であり、そして本発明の実施に使用され得る。例えば、発現ライブラリーは、そのタンパク質に対する特異的な結合について、例えば、細胞分類、またはそのような結合成分を発現する亜集団を検出するための他のスクリーニングによって、スクリーニングされ得る。例えば、Hōら, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11267-11271を参照のこと。あるいは、パニング方法が、使用され得る。例えば、SeedおよびAruffo, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3365-3369を参照のこと。ツークハイブリッド選択系もまた、利用可能なタンパク質配列を用いて適切な構築物の作製することによって適用され得る。例えば、FieldsおよびSong, 1989, *Nature* 340: 245-246を参照のこと。自動化アッセイのいくつかの方法が近年開発され、短期間で何万の化合物のスクリーニングを可能にする。

30

40

【0084】

（物理的改変体）

本発明はまた、配列番号2、4または6のアミノ酸配列に実質的なアミノ酸配列類似性を有するタンパク質またはペプチドを含む。置換（例えば、20個未満、好ましくは10個未満、より好ましくは5個未満の置換）を示す改変体が、含まれる。置換が保存的置換である場合、改変体は、対応する天然配列のタンパク質と免疫原性もしくは抗原性の類似性を共有するか、または交差反応性を共有する。天然の改変体としては、個体の改変体、対立遺伝子改変体、多型改変体、系統改変体、および種改変体が挙げられる。

50

【0085】

アミノ酸配列の類似性または配列同一性は、残基の一致を最適化し、必要な場合、必要とされるギャップを導入することによって決定される。これは、保存的置換を一致とみなす場合、変化する。保存的置換は、代表的に、以下の群の中での置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。相同アミノ酸配列としては、各それぞれのタンパク質配列における天然の対立遺伝子バリエーションおよび種間バリエーションが挙げられる。代表的な相同タンパク質またはペプチドは、関連タンパク質のアミノ酸配列内に、50～100%の類似性（ギャップが導入され得る場合）から75～100%の相同性（保存的置換が含まれる場合）を有する。同一性の尺度は、少なくとも約50%、一般的に少なくとも60%、より一般的に少なくとも65%、通常少なくとも70%、より通常では少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、およびより好ましくは少なくとも80%、そして特に好ましい実施形態において、少なくとも85%以上である。Needlehamら, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453; Sankoffら, 1983, Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison Chapter One, Addison-Wesley, Reading, MA; ならびに IntelliGenetics, Mountain View, CAからのソフトウェアパッケージ; および University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), Madison, WIからのソフトウェアパッケージもまた参照のこと。

【0086】

対応するタンパク質をコードする核酸は、代表的に、ストリンジェントな条件下で配列番号1、3または5にハイブリダイズする。例えば、それぞれのタンパク質をコードする核酸は、代表的に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号1、3または5の核酸にハイブリダイズするが、いくつかの擬陽性ハイブリダイゼーションシグナルを提供する。一般的に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHにおいて、ハイブリダイズする配列の熱融点（ T_m ）よりも約10℃下で選択される。 T_m は、完全に一致するプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度（規定されたイオン強度およびpH下）である。代表的に、ストリンジェントな条件は、洗浄中の塩濃度がpH7において約0.02モル濃度であり、そして温度が少なくとも約50℃である条件である。他の因子（とりわけ、塩基組成および相補鎖のサイズ、有機溶媒（例えば、ホルムアミド）の存在、および塩基ミスマッチの存在）は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに有意に影響を与え得る。好ましい実施形態は、50%ホルムアミドおよび20～50mM NaCl、42℃において開示された配列に結合する核酸を含む。

【0087】

単離された核酸は、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、ヌクレオチド挿入、およびヌクレオチドストレッチの逆位によって、容易に改変され得る。これらの改変は、高度に類似する生理学的活性、免疫原性活性、または抗原性活性を有する抗原、それらの誘導体またはタンパク質をコードする、新規DNA配列を生じる。

【0088】

改変された配列を使用して、変異体抗原を生成し得るか、または発現を増強し得る。発現の増強としては、遺伝子増幅、転写の増加、翻訳の増加および他の機構が挙げられ得る。このような変異体タンパク質誘導体としては、それぞれのタンパク質またはそのフラグメントの予め決定された変異または部位特異的変異が挙げられる。「変異体タンパク質」は、他の点では上記のようなタンパク質の相同性定義内に入るが、欠失、置換または挿入のいずれかによって天然に見出されるタンパク質のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。特に、「部位特異的変異体タンパク質」は、一般的に、配列

番号2、4または6の配列を有するタンパク質と有意な類似性を有するタンパク質を含む。一般的に、改変体は、これらの配列と多くの物理化学的活性および生物学的活性（例えば、抗原性活性または免疫原性活性）を共有し、好ましい実施形態において、開示された配列のほとんどまたは全てを含む。

【0089】

例えば、合成およびプロセッシングの間、またはさらなるプロセッシング工程においてポリペプチドのグリコシル化パターンを改変することによって作製されるグリコシル化変更が、含まれる。これを達成するための特に好ましい手段は、通常このようなプロセッシングを提供する細胞由来のグリコシル化酵素（例えば、哺乳動物グリコシル化酵素）に、ポリペプチドを曝露することによる手段である。脱グリコシル化酵素もまた、意図される。他の主要でない改変（リン酸化アミノ酸残基（例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、またはホストレオニン）を含む）または他の部分（リボシル基または架橋試薬を含む）を有する同じ一次アミノ酸配列のバージョンもまた、含まれる。置換を含むタンパク質もまた含まれ、このタンパク質は、実質的な免疫原性を保持し、配列番号2、4、または6のタンパク質を認識する抗体を生成するべきである。代表的に、これらのタンパク質は、開示された配列から20個未満の残基置換、より代表的には10個未満の置換、好ましくは5個未満、より好ましくは3個未満の置換を含む。あるいは、構造ドメインで始まりそして構造ドメインで終わるタンパク質は、通常、抗原性および交差免疫原性を保持する。

10

【0090】

誘導体の主要なグループは、本明細書中に開示されるタンパク質またはそのフラグメントと他のタンパク質またはポリペプチドとの共有結合体である。これらの誘導体は、組換え培養物中で合成され得るか（例えば、N末端融合体またはC末端融合体）、または反応性側鎖基を介するタンパク質の架橋において有用性が当該分野で公知である試薬の使用によって、合成され得る。架橋因子を有する好ましいタンパク質誘導体化部位は、遊離のアミノ基、炭水化物部分、およびシステイン残基である。

20

【0091】

これらのタンパク質と他の相同タンパク質または異種タンパク質との間の融合ポリペプチドもまた、提供される。異種ポリペプチドは、異なる表面マーカー間の融合物であり得、例えば、ハイブリッドタンパク質を生じる。同様に、誘導体タンパク質の特性または活性の組み合わせを示す異種融合物が、構築され得る。代表的な例は、レポーターポリペプチド（例えば、ルシフェラーゼ）とタンパク質のセグメントまたはドメイン（例えば、レセプター結合セグメント）との融合体であり、その結果、この融合タンパク質の存在または位置は、容易に決定され得る。例えば、米国特許第4,859,609号を参照のこと。他の遺伝子融合パートナーとしては、細菌β-ガラクトシダーゼ、trpE、プロテインA、β-ラクタマーゼ、αアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、および酵母α接合因子が挙げられる。例えば、Godowskiら, 1988, Science 241: 812-816を参照のこと。

30

【0092】

このようなポリペプチドはまた、リン酸化、スルホン化、ビオチン化または他の部分（特に、リン酸基に類似した分子形状を有するもの）の付加もしくは除去によって、化学的に改変されたアミノ酸残基を有し得る。いくつかの実施形態において、改変は、有用な標識試薬であるか、または精製標的（例えば、アフィニティリガンド）として役立つ。

40

【0093】

本発明はまた、アミノ酸配列バリエーションまたはグリコシル化におけるバリエーション以外の、これらのタンパク質の誘導体の使用を意図する。このような誘導体は、化学部分との共有結合または凝集性結合を含み得る。これらの誘導体は、一般的に、3つのクラスに含まれる：（1）塩、（2）側鎖および末端残基の共有結合改変、ならびに（3）吸着複合体（例えば、細胞膜と）。このような共有結合的な誘導体または凝集性誘導体は、免疫原としてか、免疫アッセイにおける試薬としてか、または精製方法（例えば、リガンドまたは他の結合リガンドのアフィニティ精製）において、有用である。例えば、タンパ

50

ク質抗原は、抗体のアッセイまたは精製における使用のために、共有結合によって固体支持体（例えば、臭化シアン活性化 Sepharose）に固定され得るか、もしくは当該分野で周知の方法によって固定され得るか、またはグルタルアルデヒド架橋剤ありまたは無しで、ポリオレフィン表面上に吸着され得る。タンパク質はまた、検出可能な基を用いて標識され得る（例えば、クロラミン T 手順によって放射性ヨウ素化され得るか、希土類キレートに共有結合され得るか、または診断アッセイにおける使用のための別の蛍光部分と結合体化され得る）。これらのタンパク質の精製は、固定化された抗体によって達成され得る。

【0094】

（抗体）

上記のように、本発明の免疫原性成分は、標準的な方法によって抗体を調製するための抗原として有用である。このような免疫原性成分は、大きなポリペプチドのタンパク質分解性切断によってか、または化学合成もしくは組換え技術によって生成され得、従って、タンパク質分解性切断部位によって制限されない。好ましくは、より小さい免疫原性成分をまず、免疫原性のキャリア分子（すなわち、宿主動物において免疫学的応答を独立して誘発する特性を有する高分子であって、これに本発明の免疫原性成分が、共有結合的に連結され得る）に対して架橋することによってかまたはカップリングすることによって、より免疫原性にする。キャリア分子への架橋または結合体化が必要とされ得る。なぜなら、小さいポリペプチドフラグメントは、しばしばハプテン（抗体に特異的に結合し得るが、抗体産生を誘発し得ない分子であって、すなわちこれらは免疫原性ではない）として作用するからである。このようなフラグメントの免疫原性キャリア分子への結合体化は、「キャリア効果」として一般的に公知の効果を介してこのようなフラグメントを免疫原性にする。

【0095】

本発明に従う抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が挙げられる。抗体は、本発明の免疫原性成分を用いた免疫によって動物宿主中で誘発され得るか、または免疫細胞のインビトロ免疫（感作）によって形成され得る。抗体産生を誘発するために使用される免疫原性成分は、ヒト細胞（例えば、ヒト樹状細胞）から単離され得るか、または化学合成され得る。抗体はまた、適切な抗体をコードする DNA を用いてプログラムされた組換え系において産生され得る。あるいは、抗体は、精製された重鎖および軽鎖の生化学再構成によって構築され得る。

【0096】

本発明の抗体は、標準的な方法（調製ディスクゲル電気泳動、等電点電気泳動、HPLC、逆相 HPLC、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび分配クロマトグラフィー、ならびに逆流分配（countercurrent distribution）を含むが、これらに限定されない）によって精製され得る。抗体の精製方法は、例えば、The Art of Antibody Purification, 1989, Amicon Division, W. R. Grace & Co. に開示される。一般的なタンパク質精製方法は、Protein Purification: Principles and Practice, R. K. Scopes, 編, 1987, Springer-Verlag, New York, NY に記載される。

【0097】

動物のワクチン接種のための適切なアジュバントとしては、アジュバント 65（ピーナッツオイル、マンニットモノオレアート（mannide monooleate）およびアルミニウムモノステアレートを含む）；フロイントの完全アジュバントもしくは不完全アジュバント；ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよびミョウバン）；界面活性剤（例えば、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、リゾレシチン、ジメチルジオクタデシルー臭化アンモニウム、N, N-ジオクタデシルーN', N'-ビス（2-ヒドロキシメチル）プロパン-ジアミン、メトキシヘキサデシルグリセロールおよびプルロニックポリオール（pluronic polyol））；ポリアニ

10

20

30

40

50

オン（例えば、ピラン、硫酸デキストラン、ポリIC、ポリアクリル酸およびカルボポール（carbopol））；ペプチド（例えば、ムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、およびツフトシン（tuftsin））；ならびにオイルエマルジョンが挙げられるが、これらに限定されない。免疫原性成分はまた、リポソームまたは他の微小キャリアへの組込み後に投与され得る。アジュバントおよび免疫アッセイの種々の局面に関する情報は、例えば、P. Tijssen, 1987, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, 第3版, Elsevier, New Yorkによるシリーズに開示される。

【0098】

このように免疫された動物から生成される血清は、直接使用され得る。あるいは、IgG画分が、プラズマフェレシス（plasmaphoresis）またはIgG特異的吸着剤（例えば、固定化されたプロテインA）を用いた吸着クロマトグラフィーのような標準的な方法を使用して血清から分離され得る。

【0099】

本発明の免疫原性成分に対するモノクローナル抗体を作製するために使用される本発明のハイブリドーマは、周知技術によって生成される。通常、このプロセスは、所望の抗体を産生するBリンパ球と不死化細胞との融合を含む。あるいは、不死化抗体産生細胞を作製するための非融合技術が可能であり、そして本発明の範囲内にある（例えば、ウイルス誘導形質転換）Casaliら, 1986, Science 234: 476。不死化細胞は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特に、げっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞である。より頻繁には、簡便性および利用可能性の問題として、ラットまたはマウスの骨髓種細胞株が利用される。

【0100】

免疫原性成分を注射された哺乳動物から適切なリンパ球を得るための技術が、周知である。一般的に、ヒト起源の細胞が所望される場合、末梢血リンパ球（PBL）が使用されるか、または非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合、脾細胞またはリンパ節細胞が使用される。宿主動物に、好ましく精製された免疫原性成分の反復投薬量を注射し、そして不死化細胞株との融合のために収集する前に、この動物に所望の抗体産生細胞を生成させる。融合のための技術もまた、当該分野で周知であり、そして一般的に、細胞を融合剤（例えば、ポリエチレングリコール）と混合する工程を包含する。

【0101】

ハイブリドーマは、標準的な手順、例えば、HAT（ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン）選択によって選択される。これらのハイブリドーマの間から、所望の抗体を分泌する細胞が、これらの培養培地を標準的な免疫アッセイ（例えば、ウエスタンブロッティング、ELISA（酵素結合免疫吸着検定）、RIA（ラジオイムノアッセイ）など）によってアッセイすることによって選択される。抗体は、標準的なタンパク質精製技術を用いて培地から収集される、Tijssen, 1985, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier, Amsterdam。

【0102】

上記の技術のうちのいずれかを適用する際の手引きのための多くの参考文献が、利用可能である：Kohlerら, 1980, Hybridoma Techniques, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Tijssen, 1985, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier, Amsterdam; Campbell, 1984, Monoclonal Antibody Technology, Elsevier, Amsterdam; Hurrell, 1982, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Boca Raton, FL。モノクローナル抗体もまた、周知のファージライブラリー系を用いて産生され得る。

【0103】

抗体フラグメントの使用および生成もまた、周知である。例えば、Fabフラグメント：Tijssen, 1985, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier, Amsterdam; Fvフラグメント：Hochmanら, 1973, Biochemistry 12:1130; Sharonら, 1976, Biochemistry 15:1591; Ehrlichら, 米国特許第4,355,023号; ならびに抗体ハーフ分子：Auditor-Hargreaves, 米国特許第4,470,925号。これらはまた、免疫アッセイにおいて有用であり得る。

【0104】

これらの抗体（ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体に関わらず）は、例えば、周知の方法によって固体支持体に結合した固定形態で使用されて、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって免疫原性成分を単離および精製し得る。抗体は、組織および細胞型分布を識別するためのプローブとして有用である。抗体は、特定の発現産物について発現ライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。通常、このような手順に使用される抗体は、抗体結合による抗原の存在の簡単な検出を可能にする部分を用いて標識される。タンパク質に対する抗体は、それぞれのタンパク質を発現する特定の細胞集団成分の分析または同定のために使用され得る。本明細書中に記載されるタンパク質を発現する細胞の発現産物をアッセイすることによって、疾患（例えば、免疫欠損状態、単球涸渇状態、または単球の過剰産生）を診断することが可能である。タンパク質に対して惹起される抗体はまた、抗イディオタイプ抗体を惹起するために使用される。これらは、それぞれの抗原の発現に関連する種々の免疫学的状態を検出または診断する際に有用である。本発明は、単球由来の免疫原性成分を特異的に認識する抗体を含む。このような抗体は、例えば、単球細胞成分の精製のための試薬としてか、または診断適用において、慣習的に使用され得る。

【0105】

（診断適用）

本発明は、定性的診断または定量的診断の臨床設定（すなわち、生物学的サンプル中の特定の成分の検出）において有用な組成物、方法およびキットを含む。これらの適用は、核酸、ペプチド／ポリペプチド、または本明細書中に記載される成分に特異的な抗体を利用する。抗体に基づく診断方法および核酸に基づく診断方法（PCRに基づく診断方法を含む）の両方が、意図される。サンプル中に存在する特定の型の樹状細胞のレベルの検出が、特定の異常な疾患状態の診断に重要であり得る。例えば、胸部癌腫組織において、樹状細胞の成熟段階に特異的なマーカーは、腫瘍内に存在する樹状細胞が、未成熟段階で据え置かれることを示し、ゆえに、腫瘍脱出のための可能な機構を例示する。Bell D.ら, 「In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas.」J Exp Med. 1999 Nov 15, 190(10):1417-26)。

【0106】

本発明のタンパク質の、天然に存在する形態および組換え形態の両方が、このタンパク質に対する結合活性について化合物をスクリーニングし得るキットおよびアッセイ方法において特に有用である。

【0107】

核酸型診断方法において、分析されるサンプルは、核酸プローブと直接接触され得る。プローブとしては、少なくとも12ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも18ヌクレオチド長、最も好ましくは20～35以上のヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが挙げられる。あるいは、サンプルは、サンプル中に含まれる核酸を抽出するために処理され得る。DNAを抽出するために使用される特定の方法が生物学的サンプルの性質に依存すること

10

20

30

40

50

が、理解される。サンプルから得られる核酸は、ゲル電気泳動もしくは他のサイズ分離技術に供され得るか、または核酸サンプルは、サイズ分離を伴わずに、適切な固体マトリックス上に固定され得るか、もしくはPCRに使用され得る。

【0108】

抗体に基づく診断適用に適切なキットは、代表的に、1つ以上の以下の成分を備える。

【0109】

(i) 抗体：抗体は、事前に標識され得るか；あるいは、この抗体は、標識され得ず、そして標識のための成分が、別々の容器中でそのキットに含まれ得るか、または標識した二次抗体が提供される；および

(ii) 反応成分：キットはまた、特定の免疫アッセイプロトコールに必要とされる他の適切にパッケージングされた試薬および材料（固相マトリックス（適用可能な場合）および標準物質を含む）を含む。 10

【0110】

核酸に基づく診断適用に適切なキットは、代表的に、以下の成分を備える。

【0111】

(i) プローブDNA：このプローブDNAは、予め標識され得るか；あるいは、このプローブDNAは、標識され得ず、そして標識のための成分が、別々の容器中でそのキットに含まれ得る；および

(ii) ハイブリダイゼーション試薬：このキットはまた、特定のハイブリダイゼーションプロトコールに必要とされる他の適切にパッケージングされた試薬および材料（固相マトリックス（適用可能な場合）および標準物質を含む）を含み得る。 20

【0112】

PCRに基づく診断キットがまた、意図され、そして本発明によって含まれる。

【0113】

上記に参照されるキットは、試験を実行するための指示書を備え得る。さらに、好ましい実施形態において、診断キットは、高スループットおよび／または自動化操作に適用可能である。

【0114】

（治療適用）

本発明はまた、有意な治療価値を示し得る試薬を提供する。タンパク質（天然に存在するタンパク質または組換えタンパク質）、そのフラグメント、およびこのタンパク質に対する抗体は、このタンパク質に対する結合親和性を有するとして同定された化合物とともに、異常な生理機能または発生に関連する状態の処置に有用であり得る。例えば、樹状細胞（例えば、抗原提示細胞）による異常な発現または異常なシグナル伝達に関連する疾患または障害は、タンパク質のアゴニストまたはアンタゴニストについての標的である。タンパク質はおそらく、免疫学的応答（例えば、抗原提示および生じるエフェクター機能）に影響をもたらす造血細胞（例えば、リンパ球細胞）の調節または発生において役割を果たす。 30

【0115】

本発明の組換え樹状細胞由来タンパク質または抗体は、精製され、そして患者へ投与され得る。これらの試薬は、治療用途のために、生理学的に無害の安定剤または賦形剤と一緒に、さらなる活性成分または不活性成分（例えば、従来の薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤（例えば、免疫原性アジュバント））と合わされ得る。特に、これらは、ワクチンの状況において有用であり得、ここで、抗原は、アゴニストまたはアンタゴニストの治療バージョンのうちの1つと合わされる。これらの組合せは、滅菌濾過され、そして凍結乾燥されによって投薬量バイアル中に投薬量形態で配置されるか、または安定化された水性調製物中に保存され得る。本発明はまた、補体結合でない形態を含む、抗体またはその結合フラグメントの使用を意図する。 40

【0116】

抗体もしくはレセプターまたはそれらのフラグメントを使用する薬物スクリーニングは、 50

これらの樹状細胞由来タンパク質に結合親和性を有する化合物を同定し得る（関連成分の単離を含む）。次いで、引き続く生物学的アッセイを利用して、この化合物がタンパク質の活性をブロックまたは拮抗するか否かを決定し得る。同様に、固有の刺激活性を有する化合物は、そのタンパク質を介して細胞を活性化し得、ゆえに、アゴニストである。本発明はさらに、アンタゴニストとしての、タンパク質に対する抗体の治療的使用を含む。

【0117】

効果的な治療に必要な試薬の量は、多くの異なる因子（投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、および投与された他の医薬を含む）に依存する。従って、処置投薬量は、安全性および効率を最適化するために滴定されるべきである。代表的に、インビトロで使用される投薬量は、これらの試薬のインサイチュ投与に有用な量で、有用な手引きを提供し得る。特定の疾患の処置のための有効用量の動物試験は、ヒト投薬量のさらなる推定的な指標を提供する。種々の考慮が、例えば、Gilmanら（編）（1990）GoodmanおよびGilman: The Pharmacological Bases of Therapeutics（第8版）Pergamon Press；ならびに（1990）Remington's Pharmaceutical Sciences（第17版）Mack Publishing Co., Easton, PAに記載される。投与（例えば、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、または筋内投与、経皮拡散など）のための方法は、本明細書中および以下に議論される。薬学的に受容可能なキャリアとしては、水、生理食塩水、緩衝液および例えば、Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJに記載される他の化合物が挙げられる。投薬量範囲は、本来、適切なキャリアを伴って、1 mM未満の濃度の量であることが予想され、代表的に、約10 μ M未満の濃度、通常約100 nM未満、好ましくは約10 pM（ピコモル濃度）未満、そして最も好ましくは約1 fM（フェムトモル濃度）未満の濃度であることが予想される。低速放出処方物または低速放出装置は、しばしば、連続した投与のために利用される。

10

20

【0118】

タンパク質、アンタゴニストおよびアゴニストは、処置される宿主に直接投与され得るか、または化合物のサイズに依存して投与され、これらの投与前に、これらのタンパク質、アンタゴニストおよびアゴニストをキャリアタンパク質（例えば、オボアルブミンまたは血清アルブミン）に結合体化させることが望ましくあり得る。治療処方物は、多くの従来の投薬量処方物に投与され得る。活性な成分が単独で投与されることは可能であるが、活性な成分が薬学的処方物として存在することが好ましい。処方物は、代表的に、上記に規定されるような少なくとも1つの成分を、その受容可能なキャリアの1つ以上とともに含む。各キャリアは、他の成分と適合であり、そして患者に対して有害でないという意味において、薬学的および生理学的の両方で利用可能であるべきである。処方物としては、経口投与、直腸投与、経鼻投与または非経口投与（皮下投与、筋内投与、静脈内投与および皮内投与）に適切な処方物が挙げられる。処方物は、単位投薬量形態で好都合に存在し得、そして薬学分野において周知の任意の方法によって調製され得る。例えば、Gilmanら（編）（1990）GoodmanおよびGilman: The Pharmacological Bases of Therapeutics（第8版）Pergamon Press；ならびに（1990）Remington's Pharmaceutical Sciences（第17版）Mack Publishing Co., Easton, PA；Avisら（編）（1993）Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY；Liebermanら（編）（1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY；Liebermanら（編）（1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NYを参照のこと。本発明の治療は、他の化学療法剤または化学予防剤と合わされ得るか、またはこれらと共同して使用され得る。

30

40

【0119】

50

本発明の多くの改変およびバリエーションが、当業者に明らかであるように、本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得る。本明細書中に記載される特定の実施形態は、例示のためにのみ提供され、そして本発明は、このような特許請求の範囲が与えられるものに対して等価な全範囲と共に、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ制限される。

【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
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06328 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/435

(21) International Application Number: PCT/US91/22663

(22) International Filing Date: 17 July 2001 (17.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00306067.8 18 July 2000 (18.07.2000) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING CORPORATION (US/US); 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 (US).

(81) Designated States (national): AP, AT, AU, AM, AI, AL, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MY, NG, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(a)) for all designations

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **RISDOAN, Marie-Clotilde** (FR/FR); 8, place Saint Jean, F-69005 Lyon (FR); **BRIDON, Jean-Michel** (FR/FR); 24, avenue du Chêne, F-69140 Francheville (FR); **DULHEN, Thomas** (FR/FR); 40 Boulevard Baptiste Cayol, Villa Paula, Boulevard C, F-13008 Marseille (FR); **BRIERE, Françoise** (FR/FR); Chemin du cimetière, Le Bourg, F-69210 St. Germain Sur L'Arbresle (FR); **BATES, Elizabeth** (GB/FR); 14 Place Gabriel Rambaud, F-69001 Lyon (FR).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

(74) Agent: MC LAUGHLIN, Jay, R.; Schering-Plough Corporation, Patent Dept., K 6 1, 1990, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 (US).

WO 02/06328 A2

(54) Title: DENDRITIC CELL-DERIVED NUCLEIC ACIDS AND RELATED COMPOSITIONS AND METHODS

(57) Abstract: Genes related to dendritic cells of the immune system have been isolated, cloned, sequenced, and functionally identified. These nucleic acids and encoded proteins can be used for diagnostic and therapeutic purposes.

WO 02/06328

PCT/US01/22663

Dendritic Cell-Derived Nucleic Acids and Related Compositions and Methods5 **Field of the Invention**

The present invention relates generally to genes associated with dendritic cells, cells which function in the immune system. The invention more particularly relates to nucleic acids isolated from dendritic cells, proteins encoded by said nucleic acids, and related diagnostic and therapeutic compositions and methods.

Background of the Invention

Dendritic cells specialize in the uptake of antigen and the presentation of antigen to T cells. Dendritic cells thus play a critical role in antigen-specific immune responses.

Dendritic cells are represented by a diverse population of morphologically similar cell types distributed widely throughout the body in a variety of lymphoid and non-lymphoid tissues (Caux, *et al.*, 1995, *Immunology Today* 16:2; Steinman, 1991, *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-296). For example, these cells include lymphoid dendritic cells of the spleen, Langerhans cells of the epidermis, and veiled cells in the blood circulation. Dendritic cells are collectively classified as a group based on their morphology, high levels of surface MHC-class II expression as well as expression of several accessory molecules (B7-1[CD80] and B7-2[CD86]) that mediate T cell binding and costimulation (Inaba, *et al.*, 1990, *Intern. Rev. Immunol.* 6:197-206; Freudenthal, *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7698). In addition, the absence of certain other surface markers expressed on T cells, B cells, monocytes, and natural killer cells is indicative of dendritic cells.

Dendritic cells are bone marrow-derived and migrate as precursors through blood stream to tissues, where they become resident cells such as Langerhans cells in the epidermis. In the periphery, following pathogen invasion, immature dendritic cells such as fresh Langerhans cells are recruited at the site of inflammation (Kaplan, *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.* 175:1717-1728; McWilliam, *et al.*, 1994, *J. Exp. Med.* 179:1331-1336) where they capture and process antigens (Inaba, *et al.*, 1986, *J. Exp. Med.* 164:605-613; Streilein, *et al.*, 1989, *J. Immunol.* 143:3925-3933; Romani, *et al.*,

WO 02/06328

2

PCT/US01/22663

1989, *J. Exp. Med.* **169**:1169-1178; Puré, *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* **172**:1459-1469; Schuler, *et al.*, 1985, *J. Exp. Med.* **161**:526-546).

Antigen-loaded dendritic cells then migrate from the peripheral tissue via the lymphatics to the T cell rich area of lymph nodes, where the mature dendritic cells are called interdigitating cells (Austyn, *et al.*, 1988, *J. Exp. Med.* **167**:646-651; Kupiec-Weglinski, *et al.*, 1988, *J. Exp. Med.* **167**:632-645; Larsen, *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* **172**:1483-1494; Fossum, S. 1988, *Scand. J. Immunol.* **27**:97-105; Macatonia, *et al.*, 1987, *J. Exp. Med.* **166**:1654-1667; Kripke, *et al.*, 1990, *J. Immunol.* **145**:2833-2838). At this site, they present the processed antigens to naive T cells and generate an antigen-specific primary T cell response (Liu, *et al.*, 1993, *J. Exp. Med.* **177**:1299-1307; Sornasse, *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.* **175**:15-21; Hcuflcr, *et al.*, 1988, *J. Exp. Med.* **167**:700-705).

During their migration from peripheral tissues to lymphoid organs, dendritic cells undergo a maturation process encompassing dramatic changes in phenotype and functions (Larsen, *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* **172**:1483-1494; Strlelein, *et al.*, 1990, *Immunol. Rev.* **117**:159-184; De Smedt, *et al.*, 1996, *J. Exp. Med.* **184**:1413-1424). In particular, in contrast to immature dendritic cells such as fresh Langerhans cells, which capture and process soluble proteins efficiently and are effective at activating specific memory and effector T cells, mature dendritic cells such as interdigitating cells of lymphoid organs are poor in antigen capture and processing but markedly efficient in naive T cell priming (Inaba, *et al.*, 1986, *J. Exp. Med.* **164**:605-613; Strlelein, *et al.*, 1989, *J. Immunol.* **143**:3925-3933; Romani, *et al.*, 1989, *J. Exp. Med.* **169**:1169-1178; Puré, *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* **172**:1459-1469; Sallusto, *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* **182**:389-400; Cella, *et al.*, 1997, *Current Opin. Immunol.* **9**:10-16). The signals regulating complex trafficking and maturation patterns of dendritic cells are complex and not fully understood.

In addition to their function in antigen presentation and activation of T cells, tumor antigen loaded dendritic cells have been shown to prevent the development of tumors and even to induce the regression of established tumors. Moreover, there is now evidence that certain subpopulations of dendritic cells may induce a state of tolerance, a property that may prove very useful in the field of allotransplantation and possibly, xenotransplantation. It is thus critical to define which dendritic cell subset should be targeted in different pathologies.

WO 02/06328

3

PCT/US01/22663

Despite the importance of dendritic cells to immune system function and related tumor growth suppression, dendritic cells remain poorly characterized, in terms of their origin, in terms of the proteins they express and in terms of many of their functions. In particular, the processes and mechanisms related to the initiation of an immune response, including antigen processing and presentation are not well elucidated.

Dendritic cells originate from several sources including myeloid and non-myeloid derived cell types. Many of the dendritic cells identified thus far derive from monocyte (myeloid) origin. A heretofore-unclassified subset of dendritic cells putatively derived from lymphoid origin is particularly worthy of study and classification because this subset of dendritic cells produces vast amounts of interferon- α . Interferon- α is especially important in the suppression of viral pathogens and has also been implicated in cancer suppression.

There is thus a critical need in the art for the identification of genes and proteins involved in dendritic cell maturation, trafficking and function. In addition, there is a need for agents useful in the diagnosis and treatment of medical conditions caused by the inappropriate regulation, development, and/or physiology of these cells which are so crucial to immune system function.

Summary of The Invention

The present invention fulfills these needs by providing novel genes isolated from dendritic cells. This particular subset of dendritic cells are of putative lymphoid versus myeloid origin. The novel genes likely encode such molecules as cell surface receptors and secretory proteins. These genes can be used to study the presence, amount, distribution and normalcy of certain gene products produced by or expressed on dendritic cells. They can also be used to facilitate the discovery of compositions and methods useful for diagnosing and treating certain disease states.

In one embodiment, the invention provides isolated polypeptides comprising amino acid sequences derived from SEQ ID NOS: 2, 4 or 6. Polypeptides derived from SEQ ID NOS: 2, 4 or 6 comprise at least eight, preferably at least ten, and most preferably, at least about twelve or more consecutive amino acid residues from SEQ ID NOS: 2, 4 or 6 as well as sequence-and-function conservative variants of those

WO 02/06328

4

PCT/US01/22663

sequences. In a preferred embodiment, the amino acid sequences encode for a mature protein.

In a related embodiment, the invention provides isolated polypeptides comprising nucleic acid sequences encoding amino acid sequences derived from SEQ ID NOS: 2, 4 or 6. The isolated nucleic acid sequences comprise at least about 12, preferably, at least about 18, more preferably, at least about 20-35, and most preferably, 35-55 or more consecutive nucleotides from SEQ ID NOS: 2, 4 or 6. The nucleic acids may be DNA, RNA, DNA/RNA duplexes, protein-nucleic acids or derivatives thereof. In a preferred embodiment, the nucleic acid sequences comprise the nucleic acid sequences set forth in SEQ ID NOS: 1, 3 or 5.

The invention also encompasses recombinant DNA vectors, including DNA and expression vectors, comprising the nucleotide sequences of the invention; cells comprising such vectors, including bacterial, fungal, plant, insect, and mammalian cells and methods for producing expression products comprising RNA and polypeptides encoded by the sequences.

In still another embodiment, the invention provides a binding compound which specifically binds to the polypeptide of claim 1. Preferably, that binding compound is an antibody or antibody fragment. Most preferably, the binding compound is a monoclonal antibody.

The invention also provides methods for detecting the nucleic acids and polypeptides of the invention in a sample. A method for detecting nucleic acids of the invention comprises the steps of: (1) contacting the sample with a probe comprising a nucleic acid comprising at least eight consecutive nucleotides selected from SEQ ID NOS: 1, 3 or 5 under conditions where hybridization can occur; and (2) detecting hybridization, if any. A method for detecting the polypeptides of the invention comprises the steps of: (1) contacting the sample with an antibody or antibody fragment specific for the polypeptide to be detected; and (2) detecting the presence of an antigen-antibody complex.

Finally, the invention provides a method of screening for candidate therapeutic agents comprising the steps of: (1) selecting as a target a polypeptide having an amino acid sequence derived from SEQ ID NOS: 2, 4 or 6; and (2) contacting a test compound with the target sequence; and (3) selecting as candidate therapeutic agents test compounds which bind to the target sequence.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to nucleic acids and encoded proteins from dendritic cells. In addition, the invention relates to diagnostic and therapeutic methods utilizing these nucleic acids and proteins.

5 All patent applications, patents, and literature references cited in this specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

In practicing the present invention, many conventional techniques in molecular biology, microbiology, and recombinant DNA, are used. Such techniques are well known and are explained fully in, for example, Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II, 1985 (D.N. Glover ed.); *Oligonucleotide Synthesis*, 1984, (M.L. Gait ed.); *Nucleic Acid Hybridization*, 1985, (Hames and Higgins); *Transcription and Translation*, 1984 (Hames and Higgins eds.); *Animal Cell Culture*, 1986 (R.I. Freshney ed.); *Immobilized Cells and Enzymes*, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, the series, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, 1987 (J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory), and *Methods in Enzymology* Vol. 154 and Vol. 155 (Wu and Grossman, and Wu, eds., respectively).

20 Before describing the invention in detail, the following definitions are provided to aid in an understanding of the specification and claims:

A "dendritic-derived" nucleic acid or polypeptide refers to the source from which the sequence was originally isolated.

25 An "enriched gene product" is a protein produced in copious amounts by a particular cell type or tissue.

A "Nucleic acid" or "polynucleotide" refers to purine- and pyrimidine-containing polymers of any length, either polynucleotides or polydeoxyribonucleotides or mixed polyribo-polydeoxyribo nucleotides. This includes single- and double-stranded molecules, i.e., DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA hybrids, as well as "protein 30 nucleic acids" (PNA) formed by conjugating bases to an amino acid backbone. This also includes nucleic acids containing modified bases.

A "coding sequence" or a "protein-coding sequence" is a polynucleotide sequence capable of being transcribed into mRNA and/or capable of being translated

WO 02/06328

6

PCT/US01/22663

into a polypeptide. The boundaries of the coding sequence are typically determined by a translation start codon at the 5'-terminus and a translation stop codon at the 3'-terminus.

A "complement" of a nucleic acid sequence refers to the "antisense" sequence that participates in Watson-Crick base-pairing with the original sequence.

5 An "isolated" nucleic acid or polypeptide refers to a component that is removed from its original environment (for example, its natural environment if it is naturally occurring). An isolated nucleic acid or polypeptide preferably contains less than about 50%, more preferably less than about 75%, and most preferably less than about 90%, of the cellular components with which it was originally associated.

10 A nucleic acid or polypeptide sequence that is "derived from" a designated sequence refers to a sequence that corresponds to a region of the designated sequence. For nucleic acid sequences, this encompasses sequences that are homologous or complementary to the sequence, as well as "sequence-conservative variants" and "function-conservative variants." For polypeptide sequences, this encompasses
15 "function-conservative variants." Sequence-conservative variants are those in which a change of one or more nucleotides in a given codon position results in no alteration in the amino acid encoded at that position. Function-conservative variants are those in which a given amino acid residue in a polypeptide has been changed without substantially altering the overall conformation and function of the native polypeptide,
20 including, but not limited to, replacement of an amino acid with one having similar physico-chemical properties (such as, for example, acidic, basic, hydrophobic, and the like). "Function-conservative" variants also include any polypeptides that have the ability to elicit antibodies specific to a designated polypeptide.

25 A "probe" refers to a nucleic acid or oligonucleotide that forms a hybrid structure with a sequence in a target region due to complementarity of at least one sequence in the probe with a sequence in the target.

Nucleic acids are "hybridizable" to each other when at least one strand of nucleic acid can anneal to another nucleic acid strand under defined stringency conditions. Stringency of hybridization is determined, e.g., by a) the temperature at which
30 hybridization and/or washing is performed, and b) the ionic strength and polarity (e.g., formamide) of the hybridization and washing solutions, as well as other parameters. Hybridization requires that the two nucleic acids contain substantially complementary sequences; depending on the stringency of hybridization, however, mismatches may be tolerated. The appropriate stringency for hybridizing nucleic acids depends on the

WO 02/06328

PCT/US01/22663

7

length of the nucleic acids and the degree of complementarity, variables well known in the art.

An "immunogenic component" is a moiety that is capable of eliciting a humoral and/or cellular immune response in a host animal.

5 An "antigenic component" is a moiety that binds to its specific antibody with sufficiently high affinity to form a detectable antigen-antibody complex.

A "sample" refers to a biological sample, such as, for example, tissue or fluid isolated from an individual or from *in vitro* cell culture constituents, as well as samples obtained from laboratory procedures.

10 The invention provides nucleic acid sequences encoding mammalian proteins expressed by and/or on dendritic cells. While specific human dendritic cell-derived genes and gene products are described herein, the invention encompasses structurally (e.g., sequence) related embodiments from other sources or mammalian species, including polymorphic or individual variants. These will include, e.g., proteins which
15 exhibit relatively few changes in sequence, e.g., less than about 5%, and number, e.g., less than 20 residue substitutions, typically less than 15, preferably less than 10, and more preferably less than 5 substitutions. These will also include versions which are truncated from full length and fusion proteins containing substantial segments of these sequences.

20 The present inventors have isolated three genes from dendritic cells of putative lymphoid origin. Humans have two distinct subsets of dendritic cell precursors. Peripheral blood monocytes give rise to mature myeloid (type I) dendritic cells (DC1) after stimulation with several co-factors and/or appropriate processing in the body. Type II dendritic cells (DC2) arise from putative lymphoid origin. For example,
25 plasmacytoid cells (lymphoid) from human tonsils and blood differentiate into type II dendritic cells. (Rissoan, *et al.*, 1999, *Science* 283:1183). Type I and type II dendritic cells have different surface markers. Type II, CD3⁺CD4⁺CD11c⁺ dendritic cells are the main interferon- α producers in response to enveloped viruses, bacteria and tumor cells. (Siegal, *et al.*, 1999, *Science* 284:1835). Example I describes the isolation of these type
30 II dendritic cells.

WO 02/06328

8

PCT/US01/22663

EXAMPLE I**Purification of CD3⁺CD4⁺CD11c⁺Lin⁻ Cells**

CD3⁺CD4⁺CD11c⁺ cells were isolated from human tonsils. In brief, tonsils were
 5 cut into small pieces and digested for 12 min at 37°C with collagenase IV (1 mg/ml; Sigma) and deoxyribonuclease I (50 KU/ml, Sigma) in RPMI 1640. The cells, pooled from two rounds of tissue digestion, were centrifuged over 50% Percoll (Pharmacia Uppsala, Sweden) for 20 min at 400 g. CD3⁺ T cells, CD14⁺ monocytes, CD19⁺ and CD20⁺ B cells, and CD56⁺ NK cells were depleted from the resulting low density cells
 10 by immunomagnetic beads (sheet anti-mouse Ig-coated Dynabeads; Dynal, Oslo, Norway). The resulting cells were stained with mouse anti-CD4-PE-Cy5 (Immunotech), anti-CD11c-PE (Becton Dickinson), and a cocktail of FITC-labeled mAbs anti-CD3 and anti-CD34 (Immunotech), anti-CD20, anti-CD57, anti-CD7, anti-CD14, and anti-CD16 (Becton Dickinson), and anti-CD1a (Ortho). Then CD3⁺CD4⁺CD11c⁺Lin⁻ Cells were
 15 isolated by cell sorting. Reanalysis of the sorted cells confirmed a purity of 98%. (Grouard *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.*, **185**:1101-1111)

Three genes (hereinafter referred to as contigs 58, 92, and 20) produced primarily and/or exclusively by CD3⁺CD4⁺CD11c⁺ cells were isolated, sequenced, and functionally identified via cDNA subtraction. Contig 58 has a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1 and an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2. Contig
 20 92 has a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 3 and an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4. Contig 20 has a nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 5 and an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 6. Briefly, cDNA subtraction is a method for finding genes expressed in one mRNA population but reduced or absent in
 25 another. Example II describes the subtraction process.

EXAMPLE II**Construction of subtracted cDNA library**

30 cDNA made from mRNA isolated from 98% purified CD3⁺CD4⁺CD11c⁺ cells from tonsils was subtracted from cDNA made from mRNA isolated from monocyte-derived DC1s in order to determine gene products produced exclusively, or at least, showing enriched production by CD3⁺CD4⁺CD11c⁺ cells. The CD3⁺CD4⁺CD11c⁺ cells were cultured in IL-3 and CD40L fibroblasts overnight or 48 hours (the two subsets of
 35 cells were pooled). The monocyte-derived DC1s were cultured 6 days in GM-CSF and

WO 02/06328

9

PCT/US01/22663

IL4, activated with GM-CSF+CD40L overnight or for 48 hours. Complimentary DNA synthesis and subtraction was done utilizing the PCR-select kit (Clontech, Palo Alto, CA) using Advantage™ Klen Tag polymerase (Clontech). The first PCR reaction was done for 28 cycles and the second (nested) PCR for 12 cycles on a thermal cycler (480; Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT). To clone subtracted DC cDNA, 10 nested reactions were pooled and resolved on 2% low melting agarose. Aiming for individual bands, gel slices in the 0.7-1.4 kb size range were cut out; the DNA was eluted and cloned either directly or after reamplification into a T/A-vector (pCRII Invitrogen Corp., San Diego, CA). The inserts were sequenced in both directions by automatic sequencing.

Comparisons against GenBank and dbest databases as well as protein homology prediction were obtained from the NCBI blast server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Contig 58

Contig 58 is an enriched gene product of the plasmacytoid cells described in Example I, but is not exclusively produced by these cells. Contig 58 is encoded by SEQ ID NO: 1. The amino acid sequence of the protein encoded by contig 58 is shown in SEQ ID NO: 2.

After obtaining the complete sequence of contig 58, BLAST analysis was used to analyze the sequence in terms of homology to other genes. Example III describes this process.

EXAMPLE III **Sequence Comparison of Isolated Contigs to Known Genes**

For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated.

The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters.

Optical alignment of sequences for comparison can be conducted, e.g., by the local homology algorithm of Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, by

WO 02/06328

10

PCT/US01/22663

the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, by the search for similarity method of Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by visual inspection (see generally Ausubel et al., *supra*).

An example of an algorithm that is suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity is the BLAST algorithm, which is described in Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul, et al., *supra*). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are then extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T, and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLAST program uses as defaults a wordlength (W) of 11, the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:10915) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=4, and a comparison of both strands.

In addition to calculating percent sequence identity, the BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, e.g., Karlin and Altschul (1993) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a

WO 02/06328

11

PCT/US01/22663

comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

Conserved alignment patterns, discerned at several degrees of stringency, were drawn by the consensus program (internet URL <http://www.bork.embl-Leidelberg.de/Alignment/consensus.html>). The PRINTS library of protein fingerprints (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/PRINTS/PRINTS.html>) (Attwood, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:212-217) reliably identified the leucine-rich repeats (LRRs) present in the extracellular segment of contig 58 with a compound motif (PRINTS code Leurichrp1) that flexibly matches N- and C-terminal features of divergent LRRs. Two prediction algorithms whose three-state accuracy is above 72% were used to derive a consensus secondary structure for the intracellular domain alignment, as a bridge to fold recognition efforts (Fischer, et al. (1996) *FASEB J.* 10:126-136). Both the neural network program PHD (Rost and Sander (1994) *Proteins* 19:55-72) and the statistical prediction method DSC (King and Stomberg (1996) *Protein Sci.* 5:2298-2310) have internet servers (URLs http://www.embl-edeidelberg.de/predictprotein/phd_pred.html and http://bonsai.lif.ichnet.uk/bmm/dsc/dsc_read_align.html, respectively).

EXAMPLE IV Chromosomal localization of contigs

Chromosomal localization was performed with the Stanford G3 RH medium resolution panel (Research Genetics, Huntsville, AL, U.S.A.). PCR is performed using oligonucleotides which amplify specifically the gene of interest and which do not amplify the mouse equivalent. Results are scored by the presence or absence of a PCR fragment in genomic DNA from the different cell lines. This information is scored manually and analysis is performed using the RH mapper program (<http://shgc-www.stanford.edu>). Using this method, contig 58 has been localized to chromosome 19q13-q12, a region of the chromosome containing many genes encoding cell surface receptors of the immune system. Equally, by homology to the BAC clone AC008397, a similar chromosomal localization is indicated.

In addition to BLAST analysis, the predicted ORF of contig 58 was analyzed with respect to motifs and protein localization signals using pSORT.

35

EXAMPLE V
pSORT Analysis of Contigs

1. Recognition of Signal Sequences

5 In eukaryotes, proteins sorted through the so-called vesicular pathway (bulk flow) usually have a signal sequence (also called a leader peptide) in the N-terminus, which is cleaved off after the translocation through the ER membrane. Some N-terminal signal sequences are not cleaved off, remaining as transmembrane segments but it does not mean these proteins are retained in the ER; they can be further sorted including in vesicles. pSORT first predicts the presence of signal sequences by 10 McGeoch's method (D. J. McGeoch, *Virus Res.*, 3:271, 1985) modified by Nakai and Kanehisa, (*Proteins* 11(2):95-110 1991) and Nakai, 1996. It considers the N-terminal positively-charged region (N-region) and the central hydrophobic region (H-region) of signal sequences. A discriminant score is calculated from the three values: 15 length of H-region, peak value of H-region, and net charge of N-region. A large positive discriminant score means that there is a high possibility that the protein possess a signal sequence, but it is unrelated to the possibility of its cleavage. Next, pSORT applies von Heijne's method of signal sequence recognition (G. von Heijne, 20 *Nucl. Acids Res.*, 14:4683, 1986). It is a weight-matrix method and incorporates the information of consensus pattern around the cleavage sites (the (-3,-1)-rule) as well as the feature of the H-region. Thus it can be used to detect signal-anchor sequences. The output score of this "GvH" is the original weight-matrix score (for eukaryotes) subtracted by 3.5. A large positive output means a high possibility that it has a 25 cleavable signal sequence. The position of possible cleavage site, i.e., the most C-terminal position of a signal sequence, is also reported.

2. Recognition of Transmembrane Segments

The current version of pSORT assumes that all integral membrane proteins 30 have hydrophobic transmembrane segment(s) which are thought to be alpha-helices in membranes. pSORT employs Klein et al.'s method (ALOM, also called KKD) to detect potential transmembrane segments (P. Klein, M. Kanehisa, and C. DeLisi, *Biochim. Biophys. Acta*, 815:468, 1985) modified by Nakai and Kanehisa, (*Genomics*, 1992, 14(4):897-911 1992). It repeats to identify the most probable 35 transmembrane segment from the average hydrophobicity value of 17-residue

WO 02/06328

13

PCT/US01/22663

segments, if any. It predicts whether that segment is a transmembrane segment (INTEGRAL) or not (PERIPHERAL) comparing the discriminant score (reported as 'ALOM score') with a threshold parameter. For an integral membrane protein, the position(s) of transmembrane segment(s) are also reported. Their length is fixed to 17
 5 but their extension, i.e., the maximal range that satisfies the discriminant criterion, is also given in parentheses. The discrimination step mentioned above is continued after leaving out the detected segment until there remains no predicted transmembrane segment. The item 'number of TMSs' is the number of predicted transmembrane segments. Since this algorithm is applied to a predicted mature sequence, i.e.,
 10 cleavable signal sequence is not included, this number is expected to be the one for mature proteins. The modification by Nakai and Kanehisa, 1992 was to employ two kinds of threshold values because ALOM is not very accurate to predict the exact number of transmembrane segments of polytopic, i.e., multiple membrane-spanning, proteins. The rationale of the approach is that less hydrophobic segments are likely to
 15 be more easily integrated into the membrane once a part of the polypeptide is integrated. Specifically, pSORT first tentatively evaluates the number of transmembrane segments using less stringent value (0.5). Then, it re-evaluates the number by using a more stringent threshold (-2.0). If it is still predicted to have at least one transmembrane segment, the former threshold value is used.

20

3. Prediction of Membrane Topology

Every membrane protein has its own orientation to be integrated in the membrane. In other words, membrane proteins know at which side (cytoplasmic or
 25 exo-cytoplasmic) the N-terminus should be located. Such an orientation is called the membrane topology. Singer's classification for membrane topology (S. J. Singer, Ann. Rev. Cell Biol., 6:247, 1990) was utilized. Prediction of membrane topology is important because some sorting signals exist at specific positions, e.g., the cytoplasmic tail, in a certain topology (see below). pSORT uses Hartmann et al.'s
 30 method (B. Hartmann, T. A. Rapoport, and H. F. Lodish, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5786, 1989); called "MTOP" in pSORT) for the prediction of membrane topology. MTOP assumes that the overall topology of eukaryotic membrane proteins is determined by the net charge difference of 15 residues flanking the most N-terminal transmembrane segment on both sides. The central residue of such a segment is first reported. If a protein is predicted to have a cleavable signal sequence and one

WO 02/06328

14

PCT/US01/22663

transmembrane segment, its topology is '1a'. If a protein is predicted to have no cleavable signal sequence but has one transmembrane segment, its position is examined. If it exists near its C-terminus, its topology is assigned as 'Nt (N-tail)' (see U. Kutay et al., Trends Cell Biol., 3:72-75, 1993). Otherwise, its topology is assigned to '1b' or '2' depending on the charge difference reported by MTOP. For polytopic proteins, their topology is simply predicted by MTOP.

For contig 58, pSORT predicts a type 1 membrane protein i.e. a protein with a cleavable signal peptide on the N-terminal (from amino acids approximately 1-24) and a single transmembrane segment from approximately 166-182. The N-terminal end of the protein is outside the cell and the C-terminal end is inside the cell. The protein encoded by contig 58 is characterized as having several leucine-rich repeats. These repeats are often associated with protein/protein interactions. A wide range of potential ligands recognize these motifs, including members of the cysteine knot family of small, secreted cytokine-like molecules. This type of domain is also known to interact with non-protein ligands such as nucleic acid or lipopolysaccharide. Thus, the molecule encoded by contig 58 may represent a novel pattern-recognition receptor.

The predicted amino acid sequence also shows two tyrosine-based motifs, one for interaction with PI3 kinase (YENM), and an ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif: YXXI/L X(7/8) YXXI/L). These motifs are described in the following references: Biery M. Oicse *et al.*, "Early Signaling via Inhibitory and Activating NK Receptors," *Hum Immunol* 1:51-64 (Jan. 6, 2000); Gergely J. Pecht *et al.*, "Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing Receptors Regulate the Immunoreceptor Tyrosine-based activation motif-induced activation of Immune Competent Cells," *Immunol Lett* 1:3-15 (May 1999); Daeron, M., "Structural Bases of Fc Gamma R functions," *Int. Rev. Immunol* 16:1-27, (1997).

Contig 58 is believed to be a type of molecule which is a component of membrane complexes which, when cross-linked give signals that lead to cell activation. The ITAM type of motif is generally associated with immunoglobulin superfamily members or lectins, thus this molecule may represent a novel family of cell surface receptors.

Based on its structure as elucidated by pSORT, its homology to other genes as elucidated by BLAST, and its amino acid sequence, contig 58 might represent a novel

WO 02/06328

15

PCT/US01/22663

type of receptor involved in the danger-induced activation of the innate and acquired immune cells. Triggering the receptor encoded by contig 58 might stimulate or modulate immune function. Equally, blocking of this receptor might allow to reduce the effects of overstimulation in conditions such as auto-immunity, graft rejection, and toxic shock.

EXAMPLE VI Expression analysis by RT-PCR

The expression pattern of contig 58 was analyzed by Reverse Transcriptase Polymerase chain reaction (RT-PCR). mRNAs were isolated from cells, tissues or cell lines using oligo dT-coupled magnetic beads to isolate the polyA containing mRNAs and first strand cDNA synthesis was carried out using standard methods. The expression pattern of contig 58 was then analyzed. On freshly isolated cells contig 58 is expressed by non-activated B cells, monocytes and CD3-CD4+CD11c-DC. On cells generated *in vitro*, contig 58 is expressed by granulocytes and DC generated from CD34+ progenitors. Expression of the gene encoded by contig 58 is not seen in cell lines such as MRC5 (fetal lung fibroblast), CHA (kidney epithelial cell) JY (EBV-derived B cell line), Jurkat (T cell line), U937 (histiocytic myeloma) and TF1 (hematopoietic progenitor).

This new molecule encoded by contig 58 is down-regulated by CD40-ligand activation in hematopoietic cells. No mRNA was detected in PMA-Ionomycin activated hematopoietic and non-hematopoietic cell lines.

EXAMPLE VII Expression analysis by Tissue Northern Blot

Total RNA was used for the preparation of Northern blots and first strand cDNA. Northern blots were prepared using 10 µg total RNA separated on formaldehyde denaturing gels and blotted onto Hybond N⁺ membranes (Amersham, Les Ulis, France). Human adult and fetal tissue blots were also used (MTN blots 7760-1 and 7756-1 Clontech, Palo Alto, CA.). Genomic DNA was isolated from PBL using standard techniques, cut with restriction enzymes, separated on 1% agarose gels and blotted onto Hybond N⁺ membranes. Hybridization of Northern and Southern blots was with a DNA fragment corresponding to a specific cDNA labeled with [³²P]dCTP using the High

WO 02/06328

16

PCT/US01/22663

Prime Kit (Boehringer Mannheim, Meylan, France). High stringency washes were performed using 0.2 x SSC, 0.2% SDS twice for 30 min. First strand cDNA were prepared after Dnase I treatment of 5 µg total RNA using oligo (dT) primers (Pharmacia, Orsay, France) using the Superscript kit. Synthesis of cDNA was checked by RT-PCR using β-actin primers. RT-PCR was performed using the AmpliTaq enzyme and buffer (Perkin Elmer, Paris, France), 0.8 mM dNTP and DMSO at 5% final concentration.

The Northern-blot shows that contig 58 exhibits a strong expression in peripheral blood lymphocytes and a lower expression in the spleen and the lymph nodes. There is no detectable expression in cancer cell lines at 60 hours of exposition. After 18 days, there is weak expression in Burkitt's lymphoma Raji (EBV B cell line).

Contig 92

Contig 92 appears to be mainly produced by the plasmacytoid cells described in Example I. For contig 92, pSORT predicts a type II transmembrane protein with an uncleaved signal anchor sequence from approximately 57-74. The topology predicted for this protein is C-terminal extracellular, N-terminal cytosolic.

Expression analysis by RT-PCR:

See Example VI for a detailed protocol utilized to analyze the expression patterns of the protein encoded by contig 92. The expression pattern of contig 92 was analyzed by RT-PCR. This gene was extremely strongly expressed by CD3- CD4+ CD11c- DC, expressed by monocytes and DC derived from monocytes, weakly expressed in *in vitro* generated granulocytes and very weakly expressed in T, B cells, and the cell lines JY and Jurkat.

Expression analysis by Tissue Northern Blot:

See Example VII for a detailed protocol. Expression of the protein encoded by contig 92 is detected in all hematopoietic cells, very strongly in thymus and appendix, strongly in lymph node and spleen, fetal liver, bone marrow and more weakly on peripheral blood lymphocytes. In cancer cell lines, expression is found in melanoma, and in chronic leukemia MOLT-4.

WO 02/06328

17

PCT/US01/22663

Contig 20

For contig 20, pSORT predicts a secreted protein with a cleavable signal peptide.

Expression analysis by RT-PCR:

- 5 See Example VI for a detailed protocol. The expression pattern of contig 20 was analyzed by RT-PCR. This gene is expressed by freshly-isolated T and B cells, CD3- CD4+ Cd11c- DC, *in vitro* generated granulocytes and DC generated from CD34+ progenitors, and monocytes. In addition, it is expressed by the hematopoietic cell lines JY and Jurkat, but not U937 and TF1, and not in the non-hematopoietic cell
- 10 lines CHA and MRC5.

Expression analysis by Tissue Northern Blot (Clontech):

- See Example VII for a detailed protocol. The Northern blot shows one major band at 0.7 kb and two bands with higher molecular weights of 4, 4 and 7, 5kb.

- 15 The 0.7 kb band corresponds to the predicted cDNA sequence shown in SEQ ID NO: 6. The two bands of higher MW are probably the nuclear pre-mRNA (non-spliced). This new protein, contig 20, is highly expressed in human bone marrow, peripheral blood lymphocytes, spleen, and lymph node. In thymus, appendix and fetal liver the expression is reduced. Contig 20 is expressed in the human cancer cell lines of
- 20 Burkitt's lymphoma Raji and chronic leukemia MOLT-4.

Contig 20 likely encodes a putative secreted molecule which is expressed by hematopoietic cells. The protein expressed in contig 20 might be a cytokine, because it is secreted, it is in hematopoietic cells, and its large distribution suggests that the protein is important in cellular interactions.

- 25 The protein encoded by contig 20 may also be a defensin-like molecule because defensins are a family of small peptides with three or four intramolecular cysteine disulfide bonds, and defensins have antimicrobial activity based on their capacity to chemoattract immune cells, thereby promoting host immunity.

- Contig 20 might represent a novel broad range hematopoietic growth factor, and
- 30 autocrine factor for some cancer (leukemias). It may control both quantitatively and qualitatively the immune cells interactions and could be used as an immunostimulant or as an immunomodulator. Alternatively, contig 20 might represent a target for blocking agents in conditions of unwanted immune reactivity such as auto-immune diseases or graft rejection.

WO 02/06328

18

PCT/US01/22663

Mouse equivalents

The mouse homologs of the sequences described above were detected by using BLAST analysis (tBLASTn) of the ORF of each gene to detect mouse ESTs that potentially code for a protein with identical characteristics. Contigs were made with the resulting sequences and the predicted protein was analyzed as per the human proteins.

The mouse homolog of contig 58 is coded for by ESTs W85307 and A1430301.

The mouse homology of contig 92 is expressed in brain, ESTAB030199. [need cite?]

Multiple ESTs, over 80, were identified as mouse homologs to contig 20. The most 5' of these (and those containing in principle all the ORF) are AA968242, AA796464, AJ317775. The northern blot shows very strong expression in spleen, strong expression in heart, lung and liver and weak expression in kidney at a size of 2 kb. In testis, 2 bands are seen of 2 and 2.4 kb. The 2.4kb band is stronger. No expression is seen in skeletal muscle and brain.

Nucleic Acids, Vectors, and Host Cells

The invention provides nucleic acid sequences, in particular the nucleic acid sequences shown in SEQ ID NOS: 1, 3 or 5 or nucleic acid sequence which encode an amino acid sequences shown in SEQ ID NOS: 2, 4 or 6. The invention encompasses isolated nucleic acid fragments comprising all or part of the individual nucleic acid sequences disclosed herein. The nucleic acid sequences of the invention comprise at least about 12, preferably at least about 18, more preferably at least about 20-35 and most preferably at least about 35-55 or more consecutive nucleotides, including complete protein-coding sequences, or complements thereof. The invention encompasses sequence-conservative variants and function-conservative variants of these sequences.

Nucleic acids comprising any of the sequences disclosed herein or subsequences thereof can be prepared by standard methods using the nucleic acid sequence information provided in SEQ ID NOS: 1, 3 or 5. For example, nucleic acids can be chemically synthesized using, e.g., the phosphoramidite solid support method of Matteucci *et al.*, 1981, *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185, the method of Yoo *et al.*, 1989, *J.*

Biol. Chem. 764:17078, or other well known methods. This can be done by sequentially linking a series of oligonucleotide cassettes comprising pairs of synthetic oligonucleotides. The nucleic acids may be isolated directly from cells. Alternatively, the polymerase chain reaction (PCR) method can be used to produce the nucleic acids of the invention, using either chemically synthesized strands or genomic material as templates. Primers used for PCR can be synthesized using the sequence information provided herein and can further be designed to introduce appropriate new restriction sites, if desirable, to facilitate incorporation into a given vector for recombinant expression. Of course, due to the degeneracy of the genetic code, many different nucleotide sequences can encode polypeptides having the amino acid sequences defined by SEQ ID NOS: 2, 4 or 6 subsequences thereof. The codons can be selected for optimal expression in prokaryotic or eukaryotic systems. Such degenerate variants are also encompassed by this invention.

The encoded polypeptides may be expressed by using many known vectors such as pUC plasmids, pET plasmids (Novagen, Inc., Madison, WI), or pRSET or pRBP (Invitrogen, San Diego, CA), and many appropriate host cells such as *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and insect and mammalian cell lines using methods known to those skilled in the art. The particular choice of vector/host is not critical to the practice of the invention.

The nucleic acids of the present invention find use, e.g., as templates for the recombinant production of peptides or polypeptides, as probes and primers for the detection of the human genes described herein, for chromosome mapping, and as probes or to design PCR primers to identify homologous genes in other mammalian species. Homology may be determined experimentally. Alternatively, homology analysis may be performed computationally. In practicing the present invention, a gene that shares at least about 70% DNA sequence homology at the nucleotide level with the genome of another mammalian species is considered to be present in that species. The determination that a gene is present in another mammal may be achieved using any technique known in the art. Appropriate techniques include without limitation hybridization to genomic DNA, colony hybridization to a genomic or cDNA library, polymerase chain reaction (PCR) using degenerate primers or gene-specific primers and genomic DNA as a template, genetic complementation, antibody cross-reactivity, or biochemical complementation *in vitro*.

In applying these techniques, conditions are established that discriminate different levels of homology between probe and template. For example, for hybridization of a probe to immobilized DNA (whether in a Southern blot, dot blot, or colony hybridization format), varying the SSC concentration in the buffer allows the detection of hybrids having different levels of homology (1X SSC is 0.15 M NaCl - 0.015 M Na citrate). In a wash buffer containing 6M urea and 0.4% sodium dodecyl sulfate, the presence of 2X SSC, 0.5X SSC, 0.1X SSC, and 0.05X SSC allows the formation of hybrids having threshold homologies of at least 55% + 5%, 65% + 5%, 75% + 5%, and >85%, respectively. Preferably, once a gene has been identified in another organism by hybridization or PCR, the DNA sequence of the gene is determined directly.

It will be understood that some methods that detect homologous sequences may result in the identification or isolation of only a portion of the entire protein-coding sequence of a particular gene. The entire protein-coding sequence can be isolated and identified, for example, by using an isolated nucleic acid encoding the known portion of the sequence, or fragments thereof, to prime a sequencing reaction with cDNA as template; this is followed by sequencing the amplified product. The isolated nucleic acid encoding the disclosed sequence, or fragments thereof, can also be hybridized to appropriate cDNA libraries to identify clones containing additional complete segments of the protein-coding sequence of which the shorter sequence forms a part. Then, the entire protein-coding sequence, or fragments thereof, or nucleic acids encoding all or part of the sequence, or sequence-conservative or function-conservative variants thereof, may be employed in practicing the present invention.

In a similar manner, additional sequences derived from the 5' and 3' flanking regions of sequence encoding the protein, including regulatory sequences, may be isolated, and the nucleotide sequence determined.

Polypeptides

Both the naturally occurring and recombinant forms of the polypeptides described herein, including both glycosylated and non-glycosylated forms are encompassed by the invention. The polypeptides of the present invention, including function-conservative variants, may be isolated from human monocytes, or from heterologous organisms or cells (e.g., bacteria, fungi, insect, plant, and mammalian cells) into which a protein-coding sequence has been introduced and expressed. The

WO 02/06328

21

PCT/US01/22663

proteins described herein, or portions thereof, also may be expressed as fusions with other proteins. The polypeptides may be chemically synthesized by commercially available automated procedures, including, without limitation, exclusive solid phase synthesis, partial solid phase methods, fragment condensation or classical solution synthesis. The polypeptides can also, advantageously, be made by *in vitro* translation.

Methods for polypeptide purification are well known in the art, including, without limitation, preparative disc-gel electrophoresis, isoelectric focusing, sucrose density gradient centrifugation, HPLC, reversed-phase HPLC, gel filtration, ion exchange and partition chromatography, and countercurrent distribution. For some purposes, it is preferable to produce the polypeptide in a recombinant system in which the protein contains an additional sequence tag that facilitates purification, such as, but not limited to, a polyhistidine sequence. The polypeptide can then be purified from a crude lysate of the host cell by chromatography on an appropriate solid-phase matrix. Alternatively, antibodies produced against a protein or against peptides derived therefrom can be used as purification reagents. Other purification methods are possible.

The present invention also encompasses derivatives and homologues of the polypeptides specifically disclosed herein. For some purposes, nucleic acid sequences encoding the peptides may be altered by substitutions, additions, or deletions that provide for functionally equivalent molecules, i.e., function-conservative variants. For example, one or more amino acid residues within the sequence can be substituted by another amino acid of similar properties, such as, for example, positively charged amino acids (arginine, lysine, and histidine); negatively charged amino acids (aspartate and glutamate); polar neutral amino acids; and non-polar amino acids.

The isolated polypeptides may be modified by, for example, phosphorylation, sulfation, acylation, or other protein modifications. They may also be modified with a label capable of providing a detectable signal, either directly or indirectly, including, but not limited to, radioisotopes and fluorescent compounds.

The polypeptides of the invention find use, e.g., for binding studies, for construction and expression of modified molecules, for structure/function studies and for the preparation of polyclonal and monoclonal antibodies. Polypeptides useful as immunogenic components for preparing antibodies or as targets for binding agent studies are at least five or more residues in length. Preferably, the polypeptides comprise at least about 12, more preferably at least about 20, and most preferably at least about 30 or more residues. Methods for obtaining these polypeptides are well

known and are explained in *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, 1987 (Mayer and Waler, eds; Academic Press, London); Scopes, 1987, *Protein Purification: Principles and Practice*, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y.) and *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds.).

Having isolated one member of a binding partner of a specific interaction, methods exist for isolating the counter-partner. See, e.g., Gearing *et al.*, 1989, *EMBO J.* 8:3667-3676. Many methods of screening for binding activity are known by those skilled in the art and may be used to practice the invention. For example, an expression library can be screened for specific binding to the protein, e.g., by cell sorting, or other screening to detect subpopulations which express such a binding component. See, e.g., Ho *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11267-11271. Alternatively, a panning method may be used. See, e.g., Seed and Aruffo, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3365-3369. A two-hybrid selection system may also be applied making appropriate constructs with the available protein sequences. See, e.g., Fields and Song, 1989, *Nature* 340:245-246. Several methods of automated assays have been developed in recent years so as to permit screening of tens of thousands of compounds in a short period of time.

20 Physical Variants

This invention also encompasses proteins or peptides having substantial amino acid sequence similarity with an amino acid sequence of a SEQ ID NOS: 2, 4 or 6. Variants exhibiting substitutions, e.g., 20 or fewer, preferably 10 or fewer, and more preferably 5 or fewer substitutions, are encompassed. Where the substitutions are conservative substitutions, the variants will share immunogenic or antigenic similarity or cross-reactivity with a corresponding natural sequence protein. Natural variants include individual, allelic, polymorphic, strain, or species variants.

Amino acid sequence similarity, or sequence identity, is determined by optimizing residue matches, if necessary, by introducing gaps as required. This changes when considering conservative substitutions as matches. Conservative substitutions typically include substitutions within the following groups: glycine, alanine; valine, isoleucine, leucine; aspartic acid, glutamic acid; asparagine, glutamine; serine, threonine; lysine, arginine; and phenylalanine, tyrosine. Homologous amino acid sequences include natural allelic and interspecies variations in each respective protein

WO 02/06328

23

PCT/US01/22663

sequence. Typical homologous proteins or peptides will have from 50-100% similarity (if gaps can be introduced), to 75-100% similarity (if conservative substitutions are included) with the amino acid sequence of the relevant protein. Identity measures will be at least about 50%, generally at least 60%, more generally at least 65%, usually at least 70%, more usually at least 75%, preferably at least 80%, and more preferably at least 80%, and in particularly preferred embodiments, at least 85% or more. See also Needleham *et al.*, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoff *et al.*, 1983, *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison* Chapter One, Addison-Wesley, Reading, MA; and software packages from IntelliGenetics, Mountain View, CA; and the University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI.

Nucleic acids encoding the corresponding proteins will typically hybridize to SEQ ID NOS: 1, 3 or 5 under stringent conditions. For example, nucleic acids encoding the respective proteins will typically hybridize to the nucleic acid of SEQ ID NOS: 1, 3 or 5 under stringent hybridization conditions, while providing few false positive hybridization signals. Generally, stringent conditions are selected to be about 10° C lower than the thermal melting point (T_m) for the sequence being hybridized to at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. Typically, stringent conditions will be those in which the salt concentration in wash is about 0.02 molar at pH 7 and the temperature is at least about 50° C. Other factors may significantly affect the stringency of hybridization, including, among others, base composition and size of the complementary strands, the presence of organic solvents such as formamide, and the extent of base mismatching. A preferred embodiment will include nucleic acids that will bind to disclosed sequences in 50% formamide and 20-50 mM NaCl at 42° C.

An isolated nucleic acid can be readily modified by nucleotide substitutions, nucleotide deletions, nucleotide insertions, and inversions of nucleotide stretches. These modifications result in novel DNA sequences which encode these antigens, their derivatives, or proteins having highly similar physiological, immunogenic, or antigenic activity.

Modified sequences can be used to produce mutant antigens or to enhance expression. Enhanced expression may involve gene amplification, increased

WO 02/06328

24

PCT/US01/22663

transcription, increased translation, and other mechanisms. Such mutant protein derivatives include predetermined or site-specific mutations of the respective protein or its fragments. "Mutant protein" encompasses a polypeptide otherwise falling within the homology definition of the proteins as set forth above, but having an amino acid sequence which differs from that of the protein as found in nature, whether by way of deletion, substitution, or insertion. In particular, "site specific mutant protein" generally includes proteins having significant similarity with a protein having a sequence of SEQ ID NOS: 2, 4 or 6. Generally, the variant will share many physicochemical and biological activities, e.g., antigenic or immunogenic, with those sequences, and in preferred embodiments, contain most or all of the disclosed sequence.

Glycosylation alterations are included, e.g., made by modifying the glycosylation patterns of a polypeptide during its synthesis and processing, or in further processing steps. Particularly preferred means for accomplishing this are by exposing the polypeptide to glycosylating enzymes derived from cells that normally provide such processing, e.g., mammalian glycosylation enzymes. Deglycosylation enzymes are also contemplated. Also embraced are versions of the same primary amino acid sequence which have other minor modifications, including phosphorylated amino acid residues, e.g., phosphotyrosine, phosphoserine, or phosphothreonine, or other moieties, including ribosyl groups or cross-linking reagents. Also, proteins comprising substitutions are encompassed, which should retain substantial immunogenicity, to produce antibodies that recognize a protein of SEQ ID NOS: 2, 4 or 6. Typically, these proteins will contain less than 20 residue substitutions from the disclosed sequence, more typically less than 10 substitutions, preferably less than 5, and more preferably less than three. Alternatively, proteins that begin and end at structural domains will usually retain antigenicity and cross immunogenicity.

A major group of derivatives are covalent conjugates of the proteins described herein or fragments thereof with other proteins or polypeptides. These derivatives can be synthesized in recombinant culture such as N- or C-terminal fusions or by the use of agents known in the art for their usefulness in cross-linking proteins through reactive side groups. Preferred protein derivatization sites with cross-linking agents are at free amino groups, carbohydrate moieties, and cysteine residues.

Fusion polypeptides between these proteins and other homologous or heterologous proteins are also provided. Heterologous polypeptides may be fusions between different surface markers, resulting in, e.g., a hybrid protein. Likewise,

WO 02/06328

25

PCT/US01/22663

heterologous fusions may be constructed which would exhibit a combination of properties or activities of the derivative proteins. Typical examples are fusions of a reporter polypeptide, e.g., luciferase, with a segment or domain of a protein, e.g., a receptor-binding segment, so that the presence or location of the fused protein may be easily determined. See, e.g., U.S. Patent No. 4,859,609. Other gene fusion partners include bacterial β -galactosidase, trpE, Protein A, β -lactamase, alpha amylase, alcohol dehydrogenase, and yeast alpha mating factor. See, e.g., Godowski *et al.*, 1988, *Science* 241:812-816.

Such polypeptides may also have amino acid residues that have been chemically modified by phosphorylation, sulfonation, biotinylation, or the addition or removal of other moieties, particularly those that have molecular shapes similar to phosphate groups. In some embodiments, the modifications will be useful labeling reagents, or serve as purification targets, e.g., affinity ligands.

This invention also contemplates the use of derivatives of these proteins other than variations in amino acid sequence or glycosylation. Such derivatives may involve covalent or aggregative association with chemical moieties. These derivatives generally fall into the three classes: (1) salts, (2) side chain and terminal residue covalent modifications, and (3) adsorption complexes, for example with cell membranes. Such covalent or aggregative derivatives are useful as immunogens, as reagents in immunoassays, or in purification methods such as for affinity purification of ligands or other binding ligands. For example, a protein antigen can be immobilized by covalent bonding to a solid support such as cyanogen bromide-activated Sepharose, by methods which are well known in the art, or adsorbed onto polyolefin surfaces, with or without glutaraldehyde cross-linking, for use in the assay or purification of antibodies. The proteins can also be labeled with a detectable group, e.g., radioiodinated by the chloramine T procedure, covalently bound to rare earth chelates, or conjugated to another fluorescent moiety for use in diagnostic assays. Purification of these proteins may be accomplished by immobilized antibodies.

30 Antibodies

The immunogenic components of this invention, as described above, are useful as antigens for preparing antibodies by standard methods. Such immunogenic components can be produced by proteolytic cleavage of larger polypeptides or by chemical synthesis or recombinant technology and are thus not limited by proteolytic

cleavage sites. Preferably, smaller immunogenic components will first be rendered more immunogenic by cross-linking or by coupling to an immunogenic carrier molecule (i.e., a macromolecule having the property of independently eliciting an immunological response in a host animal, to which the immunogenic components of the invention can be covalently linked). Cross-linking or conjugation to a carrier molecule may be required because small polypeptide fragments sometimes act as haptens (molecules which are capable of specifically binding to an antibody but incapable of eliciting antibody production, i.e., they are not immunogenic). Conjugation of such fragments to an immunogenic carrier molecule renders them immunogenic through what is commonly known as the "carrier effect".

Antibodies according to the present invention include polyclonal and monoclonal antibodies. The antibodies may be elicited in an animal host by immunization with immunogenic components of the invention or may be formed by *in vitro* immunization (sensitization) of immune cells. The immunogenic components used to elicit the production of antibodies may be isolated from human cells (e.g., human dendritic cells) or chemically synthesized. The antibodies may also be produced in recombinant systems programmed with appropriate antibody-encoding DNA. Alternatively, the antibodies may be constructed by biochemical reconstitution of purified heavy and light chains.

The antibodies of this invention can be purified by standard methods, including but not limited to, preparative disc-gel electrophoresis, isoelectric focusing, HPLC, reversed-phase HPLC, gel filtration, ion exchange and partition chromatography, and countercurrent distribution. Purification methods for antibodies are disclosed, e.g., in *The Art of Antibody Purification*, 1989, Amicon Division, W.R. Grace & Co. General protein purification methods are described in *Protein Purification: Principles and Practice*, R.K. Scopes, Ed., 1987, Springer-Verlag, New York, NY.

Suitable adjuvants for the vaccination of animals include but are not limited to Adjuvant 65 (containing peanut oil, mannide monooleate and aluminum monostearate); Freund's complete or incomplete adjuvant; mineral gels such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate and alun; surfactants such as hexadecylamine, octadecylamine, lysolecithin, dimethyldioctadecyl-ammonium bromide, N,N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxymethyl) propane-diamine, methoxyhexadecylglycerol and pluronic polyols; polyanions such as pyran, dextran sulfate, poly IC, polyacrylic acid and carbopol; peptides such as muramyl dipeptide, dimethylglycine and tuftsin; and oil emulsions.

The immunogenic components could also be administered following incorporation into liposomes or other microcarriers. Information concerning adjuvants and various aspects of immunoassays are disclosed, e.g., in the series by P. Tijssen, 1987, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, 3rd Edition, Elsevier, New York.

- 5 Serum produced from animals thus immunized can be used directly. Alternatively, the IgG fraction can be separated from the serum using standard methods such as plasmaphoresis or adsorption chromatography using IgG specific adsorbents such as immobilized Protein A.

- 10 Hybridomas of the invention used to make monoclonal antibodies against the immunogenic components of the invention are produced by well-known techniques. Usually, the process involves the fusion of an immortalizing cell with a B-lymphocyte that produces the desired antibody. Alternatively, non-fusion techniques for generating immortal antibody-producing cell are possible, and come within the purview of the present invention, e.g., virally-induced transformation, Casali *et al.*, 1986, *Science*
15 234:476. Immortalizing cell are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine, and human origin. Most frequently, rat or mouse myeloma cell lines are employed as a matter of convenience and availability.

- Techniques for obtaining the appropriate lymphocytes from mammals injected with the immunogenic components are well known. Generally, peripheral blood
20 lymphocytes (PBLs) are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. A host animal is injected with repeated dosages of a preferably purified immunogenic component, and the animal is permitted to generate the desired antibody-producing cells before these are harvested for fusion with the immortalizing cell line. Techniques for fusion are also
25 well known in the art, and in general involve mixing the cells with a fusing agent, such as polyethylene glycol.

- Hybridomas are selected by standard procedures, such as HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) selection. From among these hybridomas, those secreting the desired antibody are selected by assaying their culture medium by standard
30 immunoassays, such as Western blotting, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), RIA (radioimmunoassay), or the like. Antibodies are recovered from the medium using standard protein purification techniques, Tijssen, 1985, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Elsevier, Amsterdam.

Many references are available for guidance in applying any of the above techniques: Kohler *et al.*, 1980, *Hybridoma Techniques*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Tijssen, 1985, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Elsevier, Amsterdam; Campbell, 1984, *Monoclonal Antibody Technology*, Elsevier, Amsterdam; Hurrell, 1982, *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Boca Raton, FL. Monoclonal antibodies can also be produced using well-known phage library systems.

The use and generation of antibody fragments is also well known, e.g., Fab fragments: Tijssen, 1985, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Elsevier, Amsterdam; Fv fragments: Hochman *et al.*, 1973, *Biochemistry* 12:1130; Sharon *et al.*, 1976, *Biochemistry* 15:1591; Ehrlich *et al.*, U.S. Patent No. 4,355,023; and antibody half molecules: Audittore-Hargreaves, U.S. Patent No. 4,470,925. These also may be useful in immunoassays.

These antibodies, whether polyclonal or monoclonal, can be used, e.g., in an immobilized form bound to a solid support by well known methods, to isolate and purify the immunogenic components by immunoaffinity chromatography. The antibodies are useful as probes to distinguish tissue and cell type distribution. The antibodies may be used to screen expression libraries for particular expression products. Usually the antibodies used in such a procedure will be labeled with a moiety allowing easy detection of presence of antigen by antibody binding. Antibodies to proteins may be used for the analysis or, or identification of specific cell population components which express the respective protein. By assaying the expression products of cells expressing the proteins described herein it is possible to diagnose disease, e.g., immune-compromised conditions, monocyte-depleted conditions, or overproduction of monocytes. Antibodies raised against the proteins will also be useful to raise anti-idiotypic antibodies. These will be useful in detecting or diagnosing various immunological conditions related to expression of the respective antigens. The present invention encompasses antibodies that specifically recognize monocyte-derived immunogenic components. Such antibodies can be used conventionally, e.g., as reagents for purification of monocyte cell components, or in diagnostic applications.

Diagnostic Applications

The invention encompasses compositions, methods, and kits useful in clinical settings for the qualitative or quantitative diagnosis, i.e., detection of specific components in a biological sample. These applications utilize nucleic acids,

peptides/polypeptides, or antibodies specific for the components described herein. Both antibody-based and nucleic acid-based diagnostic methods, including PCR-based diagnostic methods are contemplated. Detection of the level of certain types of dendritic cells present in a sample could be important for diagnosis of certain aberrant disease conditions. For instance, in breast carcinoma tissues, markers specific for maturation stages of dendritic cells showed that dendritic cells present within the tumor were frozen in an immature stage thus illustrating a possible mechanism for tumor escape Bell D., *et al.* "In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas." *J Exp Med.* 1999 Nov 15, 190(10):1417-26.

Both the naturally occurring and the recombinant form of the proteins of this invention are particularly useful in kits and assay methods which are capable of screening compounds for binding activity to the proteins.

In nucleic-acid-type diagnostic methods, the sample to be analyzed may be contacted directed with the nucleic acid probes. Probes include oligonucleotides at least 12 nucleotides, preferably at least 18, and most preferably 20-35 or more nucleotides in length. Alternatively, the sample may be treated to extract the nucleic acids contained therein. It will be understood that the particular method used to extract DNA will depend on the nature of the biological sample. The resulting nucleic acid from the sample may be subjected to gel electrophoresis or other size separation techniques, or, the nucleic acid sample may be immobilized on an appropriate solid matrix without size separation or used for PCR.

Kits suitable for antibody-based diagnostic applications typically include one or more of the following components:

(i) Antibodies: The antibodies may be pre-labeled; alternatively, the antibody may be unlabelled and the ingredients for labeling may be included in the kit in separate containers, or a secondary, labeled antibody is provided; and

(ii) Reaction components: The kit may also contain other suitably packaged reagents and materials needed for the particular immunoassay protocol, including solid-phase matrices, if applicable, and standards.

Kits suitable for nucleic acid-based diagnostic applications typically include the following components:

(i) *Probe DNA*: The probe DNA may be pre-labeled; alternatively, the probe DNA may be unlabelled and the ingredients for labeling may be included in the kit in separate containers; and

5 (ii) *Hybridization reagents*: The kit may also contain other suitably packaged reagents and materials needed for the particular hybridization protocol, including solid-phase matrices, if applicable, and standards.

PCR based diagnostic kits are also contemplated and are encompassed by the invention.

The kits referred to above may include instructions for conducting the test.
10 Furthermore, in preferred embodiments, the diagnostic kits are adaptable to high-throughput and/or automated operation.

Therapeutic Applications

The invention also provides reagents that may exhibit significant therapeutic
15 value. The proteins (naturally occurring or recombinant), fragments thereof, and antibodies thereto, along with compounds identified as having binding affinity to the proteins, may be useful in the treatment of conditions associated with abnormal physiology or development. For example, a disease or disorder associated with
20 abnormal expression or abnormal signaling by a dendritic cell, e.g., as an antigen-presenting cell, is a target for an agonist or antagonist of the protein. The proteins likely play a role in regulation or development of hematopoietic cells, e.g., lymphoid cells, which affect immunological responses, e.g., antigen presentation and the resulting effector functions.

Recombinant dendritic cell-derived proteins or antibodies of the invention may
25 be purified and then administered to a patient. These reagents can be combined for therapeutic use with additional active or inert ingredients, e.g., in conventional pharmaceutically acceptable carriers or diluents, e.g., immunogenic adjuvants, along with physiologically innocuous stabilizers and excipients. In particular, these may be
30 useful in a vaccine context, where the antigen is combined with one of these therapeutic versions of agonists or antagonists. These combinations can be sterile filtered and placed into dosage forms as by lyophilization in dosage vials or storage in stabilized aqueous preparations. This invention also contemplates use of antibodies or binding fragments thereof, including forms which are not complement binding.

Drug screening using antibodies or receptor or fragments thereof can identify compounds having binding affinity to these dendritic cell-derived proteins, including isolation of associated components. Subsequent biological assays can then be utilized to determine if the compound blocks or antagonizes the activity of the protein. Likewise, a compound having intrinsic stimulating activity might activate the cell through the protein and is thus an agonist. This invention further contemplates the therapeutic use of antibodies to the proteins as antagonists.

The quantities of reagents necessary for effective therapy will depend upon many different factors, including means of administration, target site, physiological state of the patient, and other medicaments administered. Thus, treatment dosages should be titrated to optimize safety and efficacy. Typically, dosages used *in vitro* may provide useful guidance in the amounts useful for *in situ* administration of these reagents. Animal testing of effective doses for treatment of particular disorders will provide further predictive indication of human dosage. Various considerations are described, e.g., in Gilman, et al. (eds.) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics* (8th ed.) Pergamon Press; and (1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences* (17th ed.) Mack Publishing Co., Easton, PA. Methods for administration are discussed therein and below, e.g., for oral, intravenous, intraperitoneal, or intramuscular administration, transdermal diffusion, and others. Pharmaceutically acceptable carriers will include water, saline, buffers, and other compounds described, e.g., in the *Merck Index*, Merck & Co., Rahway, NJ. Dosage ranges would ordinarily be expected to be in amounts lower than 1 mM concentrations, typically less than about 10 μ M concentrations, usually less than about 100 nM, preferably less than about 10 pM (picomolar), and most preferably less than about 1 fM (femtomolar), with an appropriate carrier. Slow release formulations, or a slow release apparatus will often be utilized for continuous administration.

The proteins, antagonists, and agonists could be administered directly to the host to be treated or, depending on the size of the compounds, it may be desirable to conjugate them to carrier proteins such as ovalbumin or serum albumin prior to their administration. Therapeutic formulations may be administered in many conventional dosage formulations. While it is possible for the active ingredient to be administered alone, it is preferable to present it as a pharmaceutical formulation. Formulations typically comprise at least one active ingredient, as defined above, together with one or more acceptable carriers thereof. Each carrier should be both pharmaceutically and

WO 02/06328

32

PCT/US01/22663

physiologically acceptable in the sense of being compatible with the other ingredients and not injurious to the patient. Formulations include those suitable for oral, rectal, nasal, or parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous and intradermal) administration. The formulations may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any methods well known in the art of pharmacy. See, e.g., Gilman, et al. (eds.) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics* (8th ed.) Pergamon Press; and (1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences* (17th ed.) Mack Publishing Co., Easton, PA; Avis, et al. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, NY; 5 Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Dekker, NY; 10 and Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, NY. The therapy of this invention may be combined with or used in association with other chemotherapeutic or chemopreventive agents.

Many modifications and variations of this invention can be made without departing from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. The specific embodiments described herein are offered by way of example only, and the invention is to be limited only by the terms of the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled.

WO 02/06328

33

PCT/US01/22663

What is Claimed is:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence derived from SEQ ID NOS: 2,4 or 6.
- 5 2. The polypeptide of claim 1 comprising the amino acid sequence of the mature protein.
3. An isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence derived from SEQ ID NO: 2, 4 or 6.
4. The nucleic acid of claim 3 wherein the nucleotide sequence encodes the mature protein.
- 10 5. The nucleic acid of claim 4 comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1, 3 or 5.
6. A fusion protein comprising the polypeptide of claim 1.
7. A binding compound which specifically binds to the polypeptide of claim 1.
- 15 8. The binding compound of claim 7 wherein said binding compound is an antibody or antibody fragment.
9. The binding compound of claim 8 wherein said antibody is a monoclonal antibody.
10. An expression vector comprising the nucleic acid of claim 3.
- 20 11. An expression vector comprising the nucleic acid of claim 5.
12. A host cell comprising the vector of claim 10.
13. A process for recombinantly producing a polypeptide comprising culturing the host cell of claim 12 under conditions in which said polypeptide is expressed.
14. A method for detecting a specific nucleic acid sequence in a sample, said method comprising the steps of:
- 25

WO 02/06328

34

PCT/US01/22663

- a) contacting a sample suspected to contain a specific nucleic acid sequence with a probe comprising a nucleic acid sequence comprising at least 8 consecutive nucleotides selected from SEQ ID NO: 1, 3 or 5 under conditions in which a hybrid can form between said probe and the specific nucleic acid in said sample;
- 5 b) detecting any hybrid formed in step (a), wherein detecting of said hybrid indicates the presence of the specific nucleic acid sequence in said sample.
15. The method of claim 14 further comprising amplifying said specific sequence in said sample prior to said detecting step.
- 10 16. A method for detecting a specific antigenic component in a sample, said method comprising the steps of:
- a) contacting a sample suspected to contain a specific antigenic component encoded by an amino acid sequence derived from SEQ ID NO: 2, 4 or 6 with an antibody or antibody fragment specific for said component under
- 15 conditions in which a stable antigen-antibody complex can form between said antibody or said antibody fragment and said antigenic component in said sample; and
- b) detecting any antigen-antibody complex formed in step (a), wherein detection of an antigen-antibody complex indicates the presence of said antigenic
- 20 component in said sample.
17. A method of screening for candidate therapeutic agents comprising:
- a) selecting as a target sequence a polypeptide having an amino acid sequence derived from SEQ ID NO: 2, 4 or 6.
- b) contacting a test compound with said target sequence; and
- 25 c) selecting as said candidate therapeutic agent those test compounds which bind to the target sequence.

WO 02/06328

PCT/US01/22663

1

SEQUENCE LISTING

<110> Schering Corp.

<120> Dendritic Cell-Derived Nucleic Acids and Related Compositions and Methods

<130> SF01190

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 728

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (104)..(448)

<400> 1

aacgtagtrtt catttggttg agattctctc ccaggccaca agacatttcc tgctcggaac 60

cttggttact aatttccact gcttttaagg ccttgcactg aaa atg caa gct cag 115

Met Gln Ala Gln

1

gag cag gtc gtc gtt gtc acc caa cct gga gtc ggt ccc ggt cag gcc 163

Ala Pro Val Val Val Thr Gln Pro Gly Val Gly Pro Gly Pro Ala

5 10 15 20

ccc cag aac tcc aac tgg cag aca ggc atg tgt gac tgt ttc agc gac 211

Pro Gln Asn Ser Asn Trp Gln Thr Gly Met Cys Asp Cys Phe Ser Asp

25 30 35

tgc gga gtc tgt ctc tgt ggc aca ttt tgt ttc cag tgc ctt ggg tgt 259

Cys Gly Val Cys Leu Cys Gly Thr Phe Cys Phe Pro Cys Leu Gly Cys

40 45 50

caa gtt gca gct gat atg aat gaa tgc tgt ctg tgt gga aca agc gtc 307

Gln Val Ala Ala Asp Met Asn Glu Cys Cys Leu Cys Gly Thr Ser Val

55 60 65

gca atg ags act ctc tac ags acc cga tat ggc atc cct gga tct att 355

Ala Met Arg Thr Leu Tyr Arg Thr Arg Tyr Gly Ile Pro Gly Ser Ile

70 75 80

tgt gat gac tat atg gca act ctt tgc tgt cct cat tgt act ctt tgc 403

Cys Asp Asp Tyr Met Ala Thr Leu Cys Cys Pro His Cys Thr Leu Cys

85 90 95 100

caa atc aag aga gat atc aac aga agg aga gcc atg cgt act ttc 448

Gln Ile Lys Arg Asp Ile Asn Arg Arg Arg Ala Met Arg Thr Phe

105 110 115

taaaaactga tggtagaaag ctcttaccga agcaacaaaa ttcagcagac accttttcag 508

WO 02/06328

PCT/US01/22663

2

cttgagttct tcaccatctt ttgcaactga aatatgatgg atatgettaa gtacaactga 568
 tggcatgaaa aaaatcaaat ttttgattta ttataaatga atgtgtccc tgaacttagc 628
 taaatgggagc aacttagttt ctcttgctt tcataatttc gaatttcctg gcttataaac 688
 tttttaaatt acatttgaaa tataaaccaa atgaaatatt 728

<210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Gln Ala Gln Ala Pro Val Val Val Val Thr Gln Pro Gly Val Gly
 1 5 10 15
 Pro Gly Pro Ala Pro Gln Asn Ser Asn Trp Gln Thr Gly Met Cys Asp
 20 25 30
 Cys Phe Ser Asp Cys Gly Val Cys Leu Cys Gly Thr Phe Cys Phe Pro
 35 40 45
 Cys Leu Gly Cys Gln Val Ala Ala Asp Met Asn Glu Cys Cys Leu Cys
 50 55 60
 Gly Thr Ser Val Ala Met Arg Thr Leu Tyr Arg Thr Arg Tyr Gly Ile
 65 70 75 80
 Pro Gly Ser Ile Cys Asp Asp Tyr Met Ala Thr Leu Cys Cys Pro His
 85 90 95
 Cys Thr Leu Cys Gln Ile Lys Arg Asp Ile Asn Arg Arg Arg Ala Met
 100 105 110
 Arg Thr Phe
 115

<210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 3
 ccaaagagta caatgagga 19

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

PCIT/US01/22663

3

<400> 4	gocacaagagac atttcctgc	19
<210> 5		
<211> 2101		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> CDS		
<222> (330)..(1244)		
<400> 5	aggcacaacgc ttaatttgcat aggggtccctg cctggccaac gagggcgccc caaatgttca 60	
	ggacatataga gaaggggggta actgggccctg attctctctct cgccttccaa gcccgctaaag 120	
	cactgggggtt attcaaccat tctccacagag gggagactga ggcagcccac cagcccaagg 180	
	aggcgaccag actggggctg cgttttacca ttccagaagc ggcttggagt ggtctgagct 240	
	ataaataata acactggcgg tggaggcgag ggcgaccaca ggctgaggst cagggctagg 300	
	attccgggtg ctctactgtg gttgcttga atg ggg ggc acc ctg gca tgg acg 353	
	Met Gly Gly Thr Leu Ala Trp Thr	
	1 5	
ctg ctg ttg ccg ctg ctg ctg cgg gag tca gac agc cta gaa cgg ctg 401		
Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Asp Ser Leu Ala Trp Ser		
10 15 20		
tgc acc gtg tcc tcc cgg gat gtg gac tgg aac gcg gag ttc agt gcc 449		
Cys Thr Val Ser Ala Asp Val Asp Trp Asn Ala Glu Phe Ser Ala		
25 30 35 40		
acg tgc ctg aaw ttc agt ggc ctc agc ctg agc ctg cct cac aac cag 497		
Thr Cys Leu Xaa Phe Ser Gly Leu Ser Leu Ser Leu Pro His Asn Glu		
45 50 55		
ttc ctg cgg gcc acc aac gtg awt ctc ctt gac ctg tct ggg aac ggc 545		
Ser Leu Arg Leu Leu Ser Asn Val Xaa Leu Leu Ser Leu Ser Gly Asn Gly		
60 65 70		
ctg cga gag ctt cca gtg acc ttc ttt ggc acc ctg aag aag ctt gag 593		
Leu Arg Glu Leu Pro Val Thr Phe Phe Gly His Leu Gln Lys Leu Glu		
75 80 85		
gtc ctg aac gtg cta cgc aac ccc ttg tct cgt gtg gat ggg cgg ctg 641		
Val Leu Asn Val Leu Arg Asn Pro Leu Ser Arg Val Asp Gly Ala Leu		
90 95 100		
gcc cgc cgc tgt gac ctt gac ctg cag gcc gac tgc aac tgt gcc ctg 689		
Ala Ala Arg Cys Asp Leu Asp Leu Gln Ala Asp Cys Asn Cys Ala Leu		
105 110 115		
gag tcc tgg cac gaa atc cgc cga gac aac tgc tct gcc cag aag cct 737		
Glu Ser Trp His Asp ile Arg Arg Asp Asn Cys Ser Gly Gln Lys Pro		
120 125 130 135		

WO 02/06328

PCT/US01/22663

4

ctg ctc tgc tgg gac aca acc agc tcc cag cac aac ctc tct gcc ttc 785
 Leu Leu Cys Trp Asp Thr Thr Ser Ser Gln His Asn Leu Ser Ala Phe
 140 145 150

ctg gag gtc agc tgc gcc cct gcc ctg gcc tct gca act atc ggg gca 833
 Leu Glu Val Ser Cys Ala Pro Gly Leu Ala Ser Ala Thr Ile Gly Ala
 155 160 165

gtg stg gtc agc ggg tgc ctg ctt ctt gga ctt gcc atc gct ggc cct 881
 Val Val Val Ser Gly Cys Leu Leu Leu Gly Leu Ala Ile Ala Gly Pro
 170 175 180

gtg ctg gcc tgg aga ctc tgg cga tgc cga gtg gcc aga agc cgg gag 929
 Val Leu Ala Trp Arg Leu Trp Arg Cys Arg Val Ala Arg Ser Arg Gly
 185 190 195 200

ctg aac aaa ccc tgg gct gct cag gat ggg ccc aag ccc ggt tta ggc 977
 Leu Asn Lys Pro Trp Ala Ala Gln Asp Gly Pro Lys Pro Gly Leu Gly
 205 210 215

ttg cag cca cgg tac gcc agc cgg agc gcc ccc aag ccc caa gtg gcc 1025
 Leu Gln Pro Arg Tyr Gly Ser Arg Ser Ala Pro Lys Pro Gln Val Ala
 220 225 230

gtg cca tcc tgc ccc tcc act ccc gac tat gag aac atg ttt gtg ggc 1073
 Val Pro Ser Cys Pro Ser Thr Pro Asp Tyr Glu Asn Met Phe Val Gly
 235 240 245

cag cca gca gcc gag cac cag tgg gat gaa caa ggg gct cag cct tca 1121
 Gln Pro Ala Ala Glu His Gln Trp Asp Glu Gln Gly Ala His Pro Ser
 250 255 260

gag gac aat gac ttt tac atc aac tac aag gac atc gac ctg gct tcc 1169
 Glu Asp Asn Asp Phe Tyr Ile Asn Tyr Lys Asp Ile Asp Leu Ala Ser
 265 270 275 280

cag cct gtc tac tgt aac ctg cag tca ctg gcc cag gcc taa atg gat 1217
 Glu Pro Val Tyr Cys Asn Leu Gln Ser Leu Gly Gln Ala Ser Met Asp
 285 290 295

gaa gag gag tac gtg atc ccc ggg cac tgaagcctaac atgtcctaac 1264
 Glu Glu Glu Tyr Val Ile Pro Gly His
 300 305

ctccaccag aacccttca gtccctgtg ggtgaatcag ggcgtcctaa ctccctcatg 1324

gccctcagttt ccccatctga agaattggga caggaagga ttgtccttga ggcaccagga 1384

agctctgccc cccctccct gtccctcatg ccgtctctca gctccctcag ctccctagagg 1444

gggagaggga gagaccccca acaaggggac aggagggtca ctgtgcctaat cctgtcctca 1504

cctctctgtg gatgtacagg cagtgtctaa taaatgcttc gaggtctgat aggtctgtgg 1564

ctcaagggtgc gtgggttccct caagggtggg atttctgagt tctaagaacca agtctccatc 1624

tgagactccc aaattgtccc caacctccca tccctgtttt tttttgttgt tttgttttgt 1684

ttgtttgttt ttgaaactga gtatcactct gtcaaccagg ctggagtgca atgtctgctt 1744

ctccagctcac tgaacctcc gccyctggg ttcaagtgat tctgctgtcc tgaagctct 1804

WO 02/06328

PCT/US01/22663

5

gagtagctgg gattacagca cccgccacca tgcgagcta atttttgtat ttataataga 1864
 gatgggggttt egdaatgttg gccaggctgg tctcgaactc ctgacctcaa gcgactctgc 1924
 cgcctcggcc tectgaagtg ctgggattac aggcgtggcc actgcgccca ggcacattcc 1984
 tccctctgc cctctcagg gcccttccc aggtccctga tctccaggct tggectccag 2044
 agcagccac accaaccoca aaataaawa atgtatatat tcmwwaaaa aaaaaaa 2101

<210> 6
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Gly Gly Thr Leu Ala Trp Thr Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Arg
 1 5 10 15
 Glu Ser Asp Ser Leu Glu Pro Ser Cys Thr Val Ser Ser Ala Asp Val
 20 25 30
 Asp Trp Asn Ala Glu Phe Ser Ala Thr Cys Leu Xaa Phe Ser Gly Leu
 35 40 45
 Ser Leu Ser Leu Pro His Asn Gln Ser Leu Arg Ala Ser Asn Val Xaa
 50 55 60
 Leu Leu Asp Leu Ser Gly Asn Gly Leu Arg Glu Leu Pro Val Thr Phe
 65 70 75 80
 Phe Gly His Leu Gln Lys Leu Glu Val Leu Asn Val Leu Arg Asn Pro
 85 90 95
 Leu Ser Arg Val Asp Gly Ala Leu Ala Ala Arg Cys Asp Leu Asp Leu
 100 105 110
 Gln Ala Asp Cys Asn Cys Ala Leu Glu Ser Trp His Asp Ile Arg Arg
 115 120 125
 Asp Asn Cys Ser Gly Gln Lys Pro Leu Leu Cys Trp Asp Thr Thr Ser
 130 135 140
 Ser Gln His Asn Leu Ser Ala Phe Leu Glu Val Ser Cys Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 Leu Ala Ser Ala Thr Ile Gly Ala Val Val Val Ser Gly Cys Leu Leu
 165 170 175
 Leu Gly Leu Ala Ile Ala Gly Pro Val Leu Ala Trp Arg Leu Trp Arg
 180 185 190
 Cys Arg Val Ala Arg Ser Arg Glu Leu Asn Lys Pro Trp Ala Ala Gln
 195 200 205
 Asp Gly Pro Lys Pro Gly Leu Gly Leu Gln Pro Arg Tyr Gly Ser Arg
 210 215 220
 Ser Ala Pro Lys Pro Gln Val Ala Val Pro Ser Cys Pro Ser Thr Pro

WO 02/06328

PCT/US01/22663

6

225	230	235	240
Asp Tyr Glu Asn Met Phe Val Gly Gln Pro Ala Ala Glu His Gln Trp			
	245	250	255
Asp Glu Gln Gly Ala His Pro Ser Glu Asp Asn Asp Phe Tyr Ile Asn			
	260	265	270
Tyr Lys Asp Ile Asp Leu Ala Ser Gln Pro Val Tyr Cys Asn Leu Gln			
	275	280	285
Ser Leu Gly Gln Ala Ser Met Asp Glu Glu Glu Tyr Val Ile Pro Gly			
	290	295	300

His
305

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 7
cgagagcttc cagtgacatt ct 22

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 8
catgtttctca tagtggggag tg 22

<210> 9
<211> 1256
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (114)..(1010)

<400> 9
ctttccaagg gactggttgt gtgacgcca ttttagggaa aagatgttct cgtccgtngc 60

gcacctggcg cgggcgaacc cttcaacac gccacatctg cagctggtgc acg atg 116
Met
1

gtc tcg ggg acc tcc gca gag ctc gga gcg gcg gag gca gag acc gag 164
Val Ser Gly Thr Ser Ala Glu Leu Gly Ala Ala Glu Ala Glu Thr Glu

WO 02/06328

PCT/US01/22663

7

5	10	15	
gct gca cgc gca gag gct ggc ggc cgc cgc ggc cgc cgc cgc atg			212
Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ala His Met			
20	25	30	
gtg aag att agc ttc cag ccc gcc gtg gct ggc atc aag ggc gac aag			260
Val Lys Ile Ser Phe Gln Pro Ala Val Ala Gly Ile Lys Gly Asp Lys			
35	40	45	
gct gac aag cgc tgc ggc tgc gcc cct ggc cgc gcc tgc gcc acc gag			308
Ala Asp Lys Ala Ser Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ala Ser Ala Thr Glu			
50	55	60	
atc ctg ctg acg cgc gct agc gag gag cag ccc cca caa cat cga tcc			356
Ile Leu Leu Thr Pro Ala Arg Glu Glu Gln Pro Pro Gln His Arg Ser			
70	75	80	
aag agc ggc agc tca gtg ggc gcc gtg tgc tac ctg tgc atg ggc atg			404
Lys Arg Gly Ser Ser Val Gly Gly Val Cys Tyr Leu Ser Met Gly Met			
85	90	95	
gtc gtg ctg ctc atg ggc ctc gtg ttc gcc tct gtc kac atc tac aga			452
Val Val Leu Leu Met Gly Leu Val Phe Ala Ser Val Tyr Ile Tyr Arg			
100	105	110	
tac ttc tty ctt gcr cag ctg gcc cga gat aac ttc ttc cgc tgt ggt			500
Tyr Phe Phe Leu Xaa Gln Leu Ala Arg Asp Asn Phe Phe Arg Cys Gly			
115	120	125	
gtg ctg tat gag gac tcc ctg tcc tcc cag gtc cgc act cag atg gag			548
Val Leu Tyr Glu Asp Ser Leu Ser Ser Gln Val Arg Thr Gln Met Glu			
130	135	140	
ctg gaa gag gat gtg aaa atc tac ctc gac gag aac tac gag cgc atc			596
Leu Glu Glu Asp Val Lys Ile Tyr Leu Asp Glu Asn Tyr Glu Arg Ile			
150	155	160	
aac gtg cct gtg ccc cag ttt ggc ggc ggt gac cct gca gac atc atc			644
Asn Val Pro Val Pro Gln Phe Gly Gly Gly Asp Pro Ala Asp Ile Ile			
165	170	175	
cat gac ttc cag cgc ggt ctg act ggc tac cat gat atc tcc ctg gac			692
His Asp Phe Gln Arg Gly Leu Thr Ala Tyr His Asp Ile Ser Leu Asp			
180	185	190	
aag tgc tat gtc atc gaa ctc aac acc acc att gtg ctg ccc cct cgc			740
Lys Cys Tyr Val Ile Glu Leu Asn Thr Thr Ile Val Leu Pro Pro Arg			
195	200	205	
aac ttc tgg gag ctc ctc atg aac gtg aag agc ggc acc tac ctg cgc			788
Asn Phe Trp Glu Leu Leu Met Asn Val Lys Arg Gly Thr Tyr Leu Pro			
210	215	220	
cag acg tac atc atc cag gag gag atg gtg gtc acg gag cat gtc agt			836
Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Glu Met Val Val Thr Glu His Val Ser			
230	235	240	
gac aag gag gcc ctg ggc tcc ttc atc tac cgc ctg tgc aac ggc aaa			884
Asp Lys Glu Ala Leu Gly Ser Phe Ile Tyr His Leu Cys Asn Gly Lys			
245	250	255	

WO 02/06328

PCT/US01/22663

8

```

gac acc tac cgg ctc cgg cgc cgg gca acg cgg agc cgr atc aac aag 912
Aap Thr Tyr Arg Leu Arg Arg Arg Ala Thr Arg Arg Xaa Ile Asn Lys
      360      265      270

cgt ggg gcc aag aac tgc aat gcc atc cgc cac ttc gag aac acc ttc 980
Arg Gly Ala Lys Asn Cys Asn Ala Ile Arg His Phe Glu Asn Thr Phe
      275      280      285

gtg gtg gag acg ctc atc tgc cgg gtg gtg tgaggccctc ctccccaga 1030
Val Val Glu Thr Leu Ile Cys Gly Val Val
      290      295

aacccttgc gtgttctct tttttctttt cgggtgctc tctggccctc ctccctccc 1090

ctgcttagct tgtaacttgg acgcgtttct atcagaggtg acatgtctct ccattctct 1150

ccaaacctgc ccaactccct gtaccagagc tgtgactctc cggtaggggg cccatytctg 1210

ctgacctggg tgttgaggag gagagggcgt tgtncsaagt gttttt 1256

<210> 10
<211> 299
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Met Val Ser Gly Thr Ser Ala Glu Leu Gly Ala Ala Glu Ala Glu Thr
  1          5          10          15

Glu Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ala His
  20          25          30

Met Val Lys Ile Ser Phe Gln Pro Ala Val Ala Gly Ile Lys Gly Asp
  35          40          45

Lys Ala Asp Lys Ala Ser Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ala Ser Ala Thr
  50          55          60

Glu Ile Leu Leu Thr Pro Ala Arg Glu Glu Gln Pro Pro Gln His Arg
  65          70          75          80

Ser Lys Arg Gly Ser Ser Val Gly Gly Val Cys Tyr Leu Ser Met Gly
  85          90          95

Met Val Val Leu Leu Met Gly Leu Val Phe Ala Ser Val Tyr Ile Tyr
 100          105          110

Arg Tyr Phe Phe Leu Xaa Gln Leu Ala Arg Asp Asn Phe Phe Arg Cys
 115          120          125

Gly Val Leu Tyr Glu Asp Ser Leu Ser Ser Gln Val Arg Thr Gln Met
 130          135          140

Glu Leu Glu Glu Asp Val Lys Ile Tyr Leu Asp Glu Asn Tyr Glu Arg
 145          150          155          160

Ile Asn Val Pro Val Pro Gln Phe Gly Gly Gly Asp Pro Ala Asp Ile
 165          170          175

```

WO 02/06328

PCT/US01/22663

9

Ile His Asp Phe Gln Arg Gly Leu Thr Ala Tyr His Asp Ile Ser Leu
 180 185 190
 Asp Lys Cys Tyr Val Ile Glu Leu Asn Thr Thr Ile Val Leu Pro Pro
 195 200 205
 Arg Asn Phe Trp Glu Leu Leu Met Asn Val Lys Arg Gly Thr Tyr Leu
 210 215 220
 Pro Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Glu Met Val Val Thr Glu His Val
 225 230 235 240
 Ser Asp Lys Glu Ala Leu Gly Ser Phe Ile Tyr His Leu Cys Asn Gly
 245 250 255
 Lys Asp Thr Tyr Arg Leu Arg Arg Arg Ala Thr Arg Arg Xaa Ile Asn
 260 265 270
 Lys Arg Gly Ala Lys Asn Cys Asn Ala Ile Arg His Phe Glu Asn Thr
 275 280 285
 Phe Val Val Glu Thr Leu Ile Cys Gly Val Val
 290 295

<210> 11
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11
 gataaacttcc gctgtgg 17

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12
 agtcagacccc cgctggaagt 20

【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
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/006328 A3

(51) International Patent Classification: C07K 14/435

(21) International Application Number: PCT/US01/22663

(22) International Filing Date: 17 July 2001 (17.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00309087.8 18 July 2000 (18.07.2000) LT(71) Applicant (for all designated States except US): SCIEN-
ING CORPORATION (US/US-E: 2000 Gallopig Hill
Road, Kailworth, NJ 07033-0530 (US).

(72) Inventors and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **RISSOAN, Marie-Claude** (FR/FR); 8 place Saint Jean, F 69005
Lyon (FR); **BRIDON, Jean-Michel** (FR/FR); 24 avenue
du Chânet, F-69540 Fraicheville (FR); **DU HEN, Thomas**
(FR/FR); 40 Boulevard Baptiste Cayol, Villa Paulis-Ba-
tiraent C, F 13008 Marseille (FR); **BRJERE, Francine**
(FR/FR); Chemin du cimetière, le Hoirg, F-69210 St. Cher-
main Sur L'Arbresle (FR); **BATES, Elizabeth** (GB/FR);
14 Place Gabriel Roudand, F-69001 Lyon (FR)(81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AU, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, HU,
ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LC, LK, LR, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO,
RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UZ, UA, US, UZ,
VN, YU, ZA.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, 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, LI, MC, NL, PT, SI, TR); OAPI patent (BF, BI, CI,
CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, TD,
TG).

Declaration under Rule 4.17:

as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(ii)) for all designations

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
30 May 2002(74) Agent: MC LAUGHLIN, Jaye, P., Schering-Plough Cor-
poration, Patent Dept., K 611, 1900, 2000 Gallopig Hill
Road, Kailworth, NJ 07033-0530 (US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/006328 A3

(54) Title: TYPE 2 DENDRITIC CELL PRECURSOR DERIVED CODING NUCLEIC ACIDS AND RELATED COMPO-
SITIONS AND METHODS(57) Abstract: Genes related to dendritic cells of the immune system have been isolated, cloned, sequenced, and functionally iden-
tified. Those nucleic acids and encoded proteins can be used for diagnostic and therapeutic purposes.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter- national Application No. PC1/US 01/22663
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/53		
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) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
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) EPO-Internal, NPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, CMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document(s), with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 99 53051 A (GENSET) 21 October 1999 (1999-10-21) abstract page 2, line 36 - page 3, line 10 page 3, line 19 - line 29 page 6, line 25 - page 7, line 26 page 8, line 24 - line 26 page 9, line 18 - page 10, line 22 page 10, line 37 - page 14, line 19 page 15, line 23 - line 33 page 16, line 22 - line 37 page 51; table 4 page 52; example 17 page 68; table 5 page 79; table 6 page 71 - page 98; examples 18-25 page 102 - page 103; example 29 page 104 - page 119; examples 31-45 -/-	1-4, 6, 8-10, 12-17 5, 11
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special features of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "P" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may show double or priority claiming or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to specify) "O" document referring to oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date in priority date and not in conflict with the application but related to one or more of the products or theory underlying the invention "C" document of particular relevance which is cited to support an invention step when the document is taken alone "R" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to be obvious in view of the document(s) combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "X" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 April 2002		02.05.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818, Patentstrasse 2 8001 Zurich, Switzerland Tel. (+41-70) 340-3040, Fax (+41-70) 340-3010		Authorized officer Fuchs, U

Form PCT/ISA/19 (second sheet) July 2002

Internal Application No
PCT/US 01/22663

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	page 121 -page 128; examples 48-52 page 137 -page 138; examples 59,60 page 150 -page 152; claims 1-7,11,20,21 SEQ ID NO: 770 page 571 SEQ ID NO: 1558 page 819 ---	
X	DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] 18 April 2000 (2000-04-18) ZHAO, M. ET AL.: "homo sapiens BM-004 mRNA, complete cds" Database accession no. AF208846 XP002155016 ---	1-4,10
A P,X	the whole document -& DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] 1 October 2000 (2000-10-01) ZHAO, M. ET AL.: "BM-004" retrieved from HOMO SAPIENS Database accession no. Q9NZF1 XP002197032 the whole document ---	5,11 1-4,10
X	DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] 8 February 2000 (2000-02-08) NIH-MGC: "UI-1IF-BLG-acc-a-02-0-UI.r1 NIH NGC 37 Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 3060170.5", mRNA sequence" Database accession no. AW406457 XP002197033 ---	1-4,10
A	the whole document ---	5,11
P,X	WO 00 58473 A (CURAGEN CORPORATION) 5 October 2000 (2000-10-05) abstract ORF ID NO: 2330 page 300; table 1 tissue ID NOS: 264685, 265617, 60432113 and 264088 page 415 -page 419; table 2 SEQ ID NO: 4659 page 3854 -page 3855 page 5563 -page 5585; claims 1-9,13,14,17,19 ---	1-4,10, 12-15
E	WO 01 77291 A (GENETICS INSTITUTE, INC.) 18 October 2001 (2001-10-18) abstract SEQ ID NO: 537 clone ID NO: YL146.1 page 2, line 27 -page 55, line 34; tables 2,3 page 56 -page 68; claims 1-18 page 282 ---	1-4,6, 8-10, 12-17

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/22663

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 64835 A (HYSEQ, INC.) 7 September 2001 (2001-09-07) abstract SEQ ID NO: 6788 page 109 -page 127; table 1 page 311; table 2 page 1396 -page 1398; claims 1-15	1-4,6, 8-16, 12-16
A	RISSOAN, M.C. ET AL.: "Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation" SCIENCE, vol. 283, no. 5405, 19 February 1999 (1999-02-19), pages 1183-1186, XP002182908 cited in the application abstract page 1183, column 1, line 13 - line 26; figure 1	1-6,8-17
A	GROUARD, G. ET AL.: "The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 185, no. 6, 17 March 1997 (1997-03-17), pages 1101-1111, XP002136140 cited in the application the whole document	1-6,8-17
A	KADOWAKI, N. ET AL.: "Natural Interferon alpha/beta-producing Cells Link Innate and Adaptive Immunity" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 192, no. 2, 17 July 2000 (2000-07-17), pages 219-225, XP002197031 the whole document	1-6,8-17
A	SIEGAL, F.P. ET AL.: "The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood" SCIENCE, vol. 284, no. 5421, 11 June 1999 (1999-06-11), pages 1836-1837, XP002155015 cited in the application the whole document	1-6,8-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/22663
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 54206 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 3 December 1998 (1998-12-03) abstract page 2, line 10 -page 5, line 23 gene ID NO: 3C page 26, line 15 -page 27, line 2 page 31; table 1 page 32, line 1 -page 64, line 5 SEQ ID NO: 40 page 137 -page 138 page 179 -page 182; claims 1-10,??	1-6,8-17
A	DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] 7 March 2000 (2000-03-07) NCI-CGAP: "xx94e03.x1 NCI CGAP Lym12 Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 2851324 3', mRNA sequence" Database accession no. AW518368 XP002197034 the whole document	1-6,8-17
A	DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] 24 March 1999 (1999-03-24) NCI-CGAP: "th09b01.x1 NCI CGAP CLL1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 2117737 3', mRNA sequence" Database accession no. AI524101 XP002197035 the whole document	1-6,8-17
P,A	BENDRIS-VERMARE, N. ET AL.: "Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c-, myeloid CD11c+, and mature interdigitating dendritic cells" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 107, no. 7, April 2001 (2001-04), pages 835-844, XP001000450 the whole document	1-6,8-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/22663
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. ☒ Claims Nos.: 7 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescriptive requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ 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. ☒ 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.: 1-6, 8-17 partially	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01/22663

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-6, 8-17 partially

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence derived from SEQ ID NO: 2, an isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence derived from SEQ ID NO: 2, said nucleic acid comprising the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1, a fusion protein comprising said polypeptide, a binding compound which specifically binds to said polypeptide, expression vectors comprising said nucleic acids, a host cell comprising said vector, a process for recombinantly producing a polypeptide comprising culturing said host cell, a method for detecting a specific nucleic acid sequence in a sample involving a nucleic acid sequence comprising at least 8 consecutive nucleotides selected from said nucleic acid, a method for detecting a specific antigenic component in a sample involving an amino acid sequence derived from said polypeptide and a method of screening for candidate therapeutic agents involving said polypeptide;

2. Claims: 1-6, 8-17 partially

Idem as subject 1 but limited to SEQ ID NOS: 3 and 4;

3. Claims: 1-6, 8-17 partially

Idem as subject 1 but limited to SEQ ID NOS: 5 and 6;

International Application No. PCT/US 01/22663

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 7

Present claim 7 relates to a binding compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "... which specifically binds to the polypeptide of claim 1".

The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds, namely for antibodies or antibody fragments as claimed in claims 8 and 9 (see description, page 4, lines 16-19 and page 25, line 30 - page 28, line 31). In the present case, the claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, no search has been carried out for a binding compound as claimed in claim 7.

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				International Application No. PC1/US 01/22663	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9953651	A	21-10-1999	AU 3050199 A	01-11-1999	
			CA 2319089 A1	21-10-1999	
			EP 1068312 A2	17-01-2001	
			WO 9953051 A2	21-10-1999	
			JP 2002511259 T	16-04-2002	
WO 0058473	A	05-10-2000	AU 3774500 A	16-10-2000	
			EP 1165784 A2	02-01-2002	
			WO 0058473 A2	05-10-2000	
WO 0177291	A	18-10-2001	AU 5119901 A	23-10-2001	
			WC 0177291 A2	18-10-2001	
WO 0164835	A	07-09-2001	AU 3834701 A	12-09-2001	
			AU 3995501 A	12-09-2001	
			AU 4151101 A	12-09-2001	
			AU 4187301 A	12-09-2001	
			WO 0164834 A2	07-09-2001	
			WO 0164835 A2	07-09-2001	
			WO 0164839 A2	07-09-2001	
			WO 0164840 A2	07-09-2001	
WO 9854206	A	03-12-1998	AU 7801998 A	30-12-1998	
			EP 1015477 A1	05-07-2000	
			JP 2002512521 T	23-04-2002	
			WO 9854206 A1	03-12-1998	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,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,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,US,UZ,VN,YU,ZA

(72)発明者 リソアン, マリーークロティルド
フランス国 エフー６９００５ リヨン, プラス サン ジャン ８
(72)発明者 ブリドン, ジャンーミシェル
フランス国 エフー６９３４０ フランシュビル, アヴニユ デュ シャテ ２４
(72)発明者 デュアン, トマ
フランス国 エフー１３００８ マルセイユ, ヴィラ ポーリアーパティマン セー, ブルバール バプティスタン カヨル ４０
(72)発明者 ブリエール, フランシヌ
フランス国 エフー６９２１０ サン ジュルマン スユル ラルブルスル, ル ブール, シュマン デュ シティエール
(72)発明者 ベイツ, エリザベス
フランス国 エフー６９００１ リヨン, プラス ガブリエル ランボー １４

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37
DA77 FB02 FB05
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA11 CA12 HA14 HA17
4B063 QA13 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA93Y AB01 CA24 CA44 CA46
4H045 AA10 AA20 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	来自2型树突细胞前体的编码核酸和相关组合物和方法		
公开(公告)号	JP2004504020A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002512228	申请日	2001-07-17
[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	リソアンマリークロティルド ブリドンジャンミシエル デュアントマ ブリエールフランスイヌ ベイツエリザベス		
发明人	リソアン, マリー-クロティルド ブリドン, ジャン-ミシエル デュアン, トマ ブリエール, フランスイヌ ベイツ, エリザベス		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/435 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12Q1/6876 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6876 C07K14/47 C07K2319/02 C12Q2600/158 G01N2500/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA13 4B063 /QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2000306087 2000-07-18 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

已经分离，克隆，测序和功能鉴定了与免疫系统的树突细胞相关的基因。这些核酸和编码的蛋白质可用于诊断和治疗目的。

