

(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2004-511254

(P2004-511254A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(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	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	U 4 B O 5 0
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 174 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-536339 (P2002-536339)	(71) 出願人	591063187
(86) (22) 出願日	平成13年10月12日 (2001.10.12)		バイエル アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月16日 (2003.4.16)		ドイツ連邦共和国 レーフエルクーゼン (
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011812		番地なし)
(87) 国際公開番号	W02002/032958		D-51368 Leverkusen,
(87) 国際公開日	平成14年4月25日 (2002.4.25)		Germany
(31) 優先権主張番号	60/240,096	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成12年10月16日 (2000.10.16)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100103230
(31) 優先権主張番号	60/314,661		弁理士 高山 裕貢
(32) 優先日	平成13年8月27日 (2001.8.27)	(74) 代理人	100087114
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 齋藤 みの里

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト樹状細胞免疫受容体の調節

(57) 【要約】

ヒト樹状細胞免疫受容体を調節する試薬およびヒト樹状細胞免疫受容体遺伝子産物と結合する試薬は、癌、喘息、肥満症、糖尿病、CNS障害、および心臓血管障害を含むがこれに限られない、機能不全または疾患の阻止、改善、修正において役割を担うことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30% 一致するアミノ酸配列；

配列番号 2 に示すアミノ酸配列；

配列番号 15 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30% 一致するアミノ酸配列；および

配列番号 15 に示すアミノ酸配列

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

b) 配列番号 1 または 14 に記載の配列を含むポリヌクレオチド；

c) (a) および (b) に明記するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

d) 遺伝コードの縮重のため、その配列が (a) ~ (c) に明記するポリヌクレオチド配列から逸脱しているポリヌクレオチド；並びに

e) (a) ~ (d) に明記するポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体を表すポリヌクレオチド、

から成る群より選択されるポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

20

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされている、実質上精製された樹状細胞免疫受容体ポリペプチド。

【請求項 5】

a) 請求項 3 に記載の宿主細胞を、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの発現に好適な条件下で培養する工程；および、

b) 該宿主細胞培養から樹状細胞免疫受容体ポリペプチドを回収する工程、

を含む、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドを産生する方法。

【請求項 6】

a) 請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを生物試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させる工程；および、

b) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程、

を含む、生物試料中の樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するための方法。

30

【請求項 7】

ハイブリダイゼーション前に、生物試料の核酸材料を増幅させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

生物試料を、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと特異的に相互作用する試薬と接触させる工程を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の樹状細胞免疫受容体ポリペプチドを検出するための方法。

40

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の方法を実施するための診断キット。

【請求項 10】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによってコードされている任意の樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと接触させる工程；

該樹状細胞免疫受容体ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、

を含む樹状細胞免疫受容体の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法であって、

50

該ポリペプチドと結合する被験化合物を、樹状細胞免疫受容体の活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項 1 1】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによってコードされる樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと接触させる工程；および、
該ポリペプチドの樹状細胞免疫受容体活性を検出する工程、
を含む樹状細胞免疫受容体の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、樹状細胞免疫受容体活性を増大させる被験化合物を樹状細胞免疫受容体の活性を増大させる可能性のある治療物質として同定し、そして該ポリペプチドの樹状細胞免疫受容体活性を減少させる被験化合物を樹状細胞免疫受容体の活性を減少させる可能性のある治療物質として同定する方法。

10

【請求項 1 2】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドと接触させ、該ポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合を検出する工程を含む、樹状細胞免疫受容体の活性を減少させる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリヌクレオチドに結合する被験化合物を樹状細胞免疫受容体の活性を減少させる可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項 1 3】

細胞を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の任意の樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと特異的に結合する試薬と接触させ、それにより樹状細胞免疫受容体の活性を減少させる工程を含む、樹状細胞免疫受容体の活性を減少させる方法。

20

【請求項 1 4】

請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の方法によって同定される、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調整する試薬。

【請求項 1 5】

請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 に記載の試薬および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 1 6】

疾患において樹状細胞免疫受容体の活性を調整する医薬の製造のための、請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 に記載の試薬能使用。

【請求項 1 7】

該疾患が、癌、喘息、肥満、糖尿病、CNS 障害あるいは心臓血管障害である、請求項 1 6 に記載の使用。

30

【請求項 1 8】

配列番号 2 または 1 5 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする cDNA。

【請求項 1 9】

配列番号 1 または 1 4 を含む、請求項 1 8 に記載の cDNA。

【請求項 2 0】

配列番号 1 または 1 4 から成る、請求項 1 8 に記載の cDNA。

【請求項 2 1】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

40

【請求項 2 2】

該ポリヌクレオチドが配列番号 1 または 1 4 から成る、請求項 2 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 3】

配列番号 2 または 1 5 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 4】

該ポリヌクレオチドが配列番号 1 または 1 4 から成る、請求項 2 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 5】

50

配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド。

【請求項 26】

配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列から成る、請求項 25 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 27】

配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 28】

配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクターを含む宿主細胞を、該ポリペプチドが発現される条件下で培養し；そして該ポリペプチドを単離する工程を含む、該ポリペプチドを産生する方法。

10

【請求項 29】

該発現ベクターが配列番号 1 または 14 を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

配列番号 1 または 14 に記載の 11 個の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、生物試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させ；そして、該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程を含む、配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出する方法。

【請求項 31】

ハイブリダイズさせる工程の前に、該核酸材料を増幅させる工程をさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

20

【請求項 32】

配列番号 1 または 14 に記載の 11 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；および、

請求項 30 に記載の方法についての説明書、

を含む、配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出するためのキット。

【請求項 33】

生物試料を、配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する試薬と接触させて、試薬 - ポリペプチド複合体を形成させる工程；および、

該試薬 - ポリペプチド複合体を検出する工程、

を含む、該ポリペプチドを検出する方法。

30

【請求項 34】

該試薬が抗体である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体；および

請求項 33 に記載の方法についての説明書、

を含む、該ポリペプチドを検出するためのキット。

【請求項 36】

被験化合物を、(1) 配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30% 一致するアミノ酸配列、および(2) 配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列、から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させる工程；および

該ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、

を含むヒト樹状細胞免疫受容体の活性を調整することができる物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物をヒト樹状細胞免疫受容体の活性を調節する可能性のある物質として同定する方法。

40

【請求項 37】

接触させる工程が細胞においてである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

細胞がインビトロである、請求項 36 に記載の方法。

50

【請求項 39】

接触させる工程が無細胞系においてである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

該ポリペプチドが検出可能な標識を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

被験化合物が検出可能な標識を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】

被験化合物が該ポリペプチドと結合している標識化リガンドに取って代わる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 43】

該ポリペプチドが固体支持体と結合している、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 44】

被験化合物が固体支持体と結合している、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 45】

被験化合物を、(1) 配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30% 一致するアミノ酸配列、および、(2) 配列番号 2 または 15 に示すアミノ酸配列、から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させる工程；および該ポリペプチドの活性を検出する工程、

を含むヒト樹状細胞免疫受容体の活性を調整する物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドの活性を増大させる被験化合物をヒト樹状細胞免疫受容体の活性を増大させる可能性のある物質として同定し、該ポリペプチドの活性を減少させる被験化合物をヒト樹状細胞免疫受容体の活性を減少させる可能性のある物質として同定する方法。

【請求項 46】

接触させる工程が細胞においてである、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

細胞がインビトロである、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

接触させる工程が無細胞系においてである、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 49】

被験化合物を、配列番号 1 または 14 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物と接触させる工程；および

該産物に対する被験化合物の結合を検出する工程、を含むヒト樹状細胞免疫受容体の活性を調整する物質をスクリーニングする方法であって、該産物に結合する被験化合物をヒト樹状細胞免疫受容体の活性を調節する可能性のある物質として同定する方法。

【請求項 50】

該産物がポリペプチドである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

該産物が RNA である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

細胞を、配列番号 1 または 14 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物と特異的に結合する試薬と接触させ、それによりヒト樹状細胞免疫受容体の活性を減少させる工程を含む、ヒト樹状細胞免疫受容体の活性を減少させる方法。

【請求項 53】

該産物がポリペプチドである、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

該産物が抗体である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

該産物が RNA である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 56】

10

20

30

40

50

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

該試薬がリボザイムである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

細胞がインビトロである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 9】

細胞がインビボである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 0】

配列番号 2 または 1 5 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する試薬；および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

10

【請求項 6 1】

該試薬が抗体である、請求項 6 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 2】

配列番号 1 または 1 4 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの産物と特異的に結合する試薬；および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 6 3】

該試薬がリボザイムである、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 4】

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 5】

該試薬が抗体である、請求項 6 2 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 6 6】

配列番号 2 または 1 5 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクター；および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 6 7】

該発現ベクターが配列番号 1 または 1 4 を含む、請求項 6 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 8】

癌、喘息、肥満、糖尿病、CNS 障害あるいは心臓血管障害より選択される樹状細胞免疫受容体機能障害関連疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、ヒト樹状細胞免疫受容体の機能を調整する試薬の治療的有効量を投与し、それにより樹状細胞免疫受容体機能障害関連疾患の症状を回復させる工程を含む方法。

30

【請求項 6 9】

該試薬が請求項 3 6 に記載の方法によって同定される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

該試薬が請求項 4 5 に記載の方法によって同定される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

該試薬が請求項 4 9 に記載の方法によって同定される、請求項 6 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

40

本発明は、受容体調節の分野に関する。より具体的には、本発明はヒト樹状細胞免疫受容体の調節に関する。

【0002】

発明の背景

樹状細胞 (DC) は、免疫学的にナイーブな T 細胞 (Steinman、1991 年) を活性化するそれらの強力な能力によって、抗原提示細胞 (APC) に独特である。米国特許第 6,046,158; Bancheureau & Steinman, Nature 1998 Mar 19; 392(6673): 245-52。DC の本質的にあるいは成熟の後に、物理的な相互作用を解決させるいくつかの分子、また T 細胞に応答することによって活性化信号を配達する。これらはクラス I およびクラス II MHC 分子; C

50

DSO (B7-1) および CD86 (B7-2)、CD40、CD11a/CD18 (LFA-1)、および CD54 (ICAM-1) を含む (Steinman, 1991; Steinman et al., 1995)。CD40、CD11a/CD18 (LFA-1) および CD54 (ICAM-1) (Steinman (1991年)。DC、さらに IL1 (IL-6) を含むいくつかの T 細胞刺激的なサイトカインを分泌する。IL-8 および マクロファージ炎症性の蛋白質 1 (MIP1) および MIP-1。Matsue et al., 1992; Kitajima et al., 1995; Ariizumi et al., 1995; Caux et al., 1994; Heufler et al., 1992; Schreiber et al., 1992; Enk et al., 1992; Mohamadzadeh et al., 1996。これらの特性、接着分子発現およびサイトカイン生産は両方とも、他の APC (例えば活性化されたマクロファージおよび B 細胞) (それは名 T 細胞の活性化で本質的にそれほど能力がない) によって共有される。

【0003】

T 細胞活性化は環境中の病原性の微生物 (例えばウイルス、バクテリアおよび寄生動物)、外来蛋白質および有害な化学物質に対する保護免疫の重要なステップである。T 細胞は、抗原提示細胞の表面で抗原が示したことを認識する、それらの表面 (つまり T 細胞受容体) 上の受容体を発現する。正常な免疫反応中に、T 細胞受容体にこれらの抗原を結合することによって、T 細胞活性化に結びつく細胞内の変更を開始する。DC の発現、T 細胞を備えたそれらの相互作用を解決させるいくつかの異なる付着また共刺激分子。DC 上の受容体、およびこの役割を果たすと知られている T 細胞上の反受容体の組合せは、次のものを含む: a) クラス I MHC、b) クラス II MHC、c) CD54、d) ICAM-3 および CD11a/CD18、e) LFA-3、f) CD80 (B7-1) および CD28 (また CTLA4) および CD2 (ICAM-1) および CD11a/CD18 (LFA-1) および CD4 および CD8、g) CD86 (B7-2) および CD28 (また CTLA4)、および h) CD40 および CD40L (Steinman, 1995 年)。重要なことには、これらの分子の結合だけでなく、DC と T 細胞の間の物理的な結合を促進する、さらに、それは活性化信号を変換する。

【0004】

C-型レクチンはそれらの炭水化物認識領域 (CRD) にアミノ酸配列類似性を提示し、Ca²⁺ファミリー依存的に選択された炭水化物に結合する糖タンパク質である。C 型レクチンは、4つのカテゴリー (Vastaら、1994年; Spiess 1990) の中の第1のグループは、アジア糖タンパク質受容体、マクロファージ・ガラクトースおよび N-アセチルグルコサミン (GlcNac) のようなタイプの II の薄膜を統合された蛋白質を含む。レクチンおよび CD23 (FcRII) またはガラクトース/フコースに特異的なこのグループ中の多くのメンバーが、ガラクトサミン/GalNac 用特異性を示す。第2のグループは繊維芽細胞のプロテオグリカン中核蛋白質あるいは GlcNac 残留物軟骨を含む。第3のグループは、血清のようないわゆる「コレクシオンズ (collectins)」をマンノースを結合力のある蛋白質、肺の界面活性剤蛋白質 SP-A および コングルチニンを含む。第4のグループは、LEC-CAM (例えばメル-14、GMP-140 および ELAM-1) として知られているある付着分子を含む。

【0005】

C 型レクチンは、凝集素、オプソニン、補足活性剤および細胞を関連する認識分子 (Vastaら、1994年; Spiess 1990; Kery、1991年) として機能に知られている。例えば、マクロファージ・マンノース受容体はスカベンジャー機能 (Shepherd、1990年) に役立ち、Pneumocystis carinii (Ezekowitz、1991年)、Candida albicans (Ezekowitz、1990年) を含む病原性の有機体の取りこみを媒介する。血清、マンノースを結合蛋白質は、慣用的な方法で活性化するその能力によって Clq を模倣する。重要なことには、このレクチン中の遺伝子突然変異は回帰性の感染、厳しい再現する伝染

病、下痢（リード、1994年ら）に供する。したがって、C型レクチンは、生物学の重要性を備えた種々の機能を示す。

【0006】

重要なことには、炭水化物部分は、必ずしも、C型レクチン用の「自然な」リガンドとして供しない。例えば、CD23（FCRII）（Gal-Gal-Nac（Kijimoto - 落合、1994年ら）のその結合により、およびそのCRD配列により確認されるようなC型レクチンファミリーが共有している）は炭水化物独立的な方法で免疫グロブリンEを認識することが知られている。大腸菌の中で生産された再結合物（糖鎖形成しなかった）免疫グロブリンEと同様に免疫グロブリンEの酵素で脱グリコシル化された形式も両方とも、CD23（ヴェルチェリ、1989年ら）に結合する。したがって、いくつかのC型レクチンは、それらの自然なリガンド中のポリペプチド・配列を認識する。さらに極端、任意のポリペプチドから同定によって示唆されるように、レクチンの主な生物学の機能が炭水化物の代わりに、ポリペプチドの認識であるというのが最近の仮説である。反対に、植物レクチン（オルデンバーグ、1992年ら）のためのいくつかのポリペプチドリガンドのペプチドライブラリーがある。

10

【0007】

最近、2つのCタイプレクチンがDCの表面上で同定された。最初に、蔣らは、NLDC-145 mAb、ネズミ科のDC（蔣、1995年ら）に対する最も広く用いられているmAbのうちの一つによって認識された蛋白質のクローンを作成した。このDEC-205と名付けられた蛋白質は、10の別個のCRDを含む一つであるC型レクチン・ファミリーの新しいメンバーであると分かった。次に、Salustoらは複合のCRD（Salusto、1995年ら）を含むヒトDCを発現したマクロファージ・マンノース受容体（MMR）を報告した。両方の受容体はDCによって糖鎖形成した分子のエンドシトーシスを解決させるために提案された、観察では： a）DCの表面上のDEC-205にDEC-205に対するポリクローナルウサギ抗体、b）ウサギ免疫グロブリンGに反応するT細胞系の有効な活性化； DCによるFITCデキストランの吸収、c）、マンナン、マンノース受容体アンタゴニスト（Jiang et al., 1995年； Salustoら、1995年）で有効にブロックされた。細胞タイプ特異性に関して、より低いレベルでは、胸腺中のB細胞および上皮の細胞によって、腸および肺（Witmer-Pack et al., 1995年； Inabaraら、1995年）およびMMRも、マクロファージ（Stahl 1992）によってさらに十分に発現されるとはいえ、DEC-205は発現されると知られている。したがって、C型レクチンはDCに特有の方式で発現する。

20

30

【0008】

Fournierらは、ヒト樹状細胞と脊髄細胞によって発現されるFDF03（免疫グロブリン上の抑制する受容体）を同定した。Immunol. 165（3），1197-209，2000。ベイツらは、免疫受容体のチロシンに基づいた抑制するモチーフを含んでいる斬新なC型レクチン表面受容体である樹木細胞免疫受容体（DCIR）を同定しました。Journal of Immunology 163，1973-1983，1999。

40

【0009】

免疫学的にナイーブなT細胞を活性化することは知られているので、それらの能力中の他のAPCよりはるかに有力である、DCが蛋白質を発現することは可能性が高い機能を活性化し、T細胞、そしてそれは他のAPCによって発現されない。そのような蛋白質の構造についての知識は、多くのエリアにおいて全く価値があると分かるであろう。例えば、T細胞によって発現されたそのあるいはそれらリガンドを同定するために精製された蛋白質を使用することができる。さらに、精製された蛋白質に対して抗体を惹起し、DCを媒介としたT細胞活性化を抑制するために使用することができる。

【0010】

発明の要旨

50

本発明の課題は、ヒト樹状細胞免疫受容体を調節する試薬および方法を提供することである。本発明のこの課題および他の課題は、以下に記載の1またはそれ以上の態様によって提供される。

【0011】

本発明の一態様は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む樹状細胞免疫受容体ポリペプチドである：

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%一致するアミノ酸配列；

配列番号2に示すアミノ酸配列；

配列番号15に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%一致するアミノ酸配列；および

配列番号15に示すアミノ酸配列。

10

【0012】

本発明のさらに別の態様は、細胞外基質分解を減少させる物質のスクリーニング方法である。試験（被験）化合物を、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと接触させる：

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%一致するアミノ酸配列；

配列番号2に示すアミノ酸配列；

配列番号15に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%一致するアミノ酸配列；および

配列番号15に示すアミノ酸配列。

【0013】

試験化合物および樹状細胞免疫受容体ポリペプチド間の結合を検出する。樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと結合する試験化合物は、これにより、細胞外基質分解を減少させるのに有望な物質として同定される。この物質は樹状細胞免疫受容体の活性を減少させることによって機能し得る。

20

【0014】

本発明の別の態様は、細胞外基質分解を減少させる物質のスクリーニング方法である。試験化合物を、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと接触させる：

配列番号1に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約50%の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号1に示されるヌクレオチド配列；

配列番号14に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約50%の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号14に示されるヌクレオチド配列。

30

【0015】

このポリヌクレオチドに対する試験化合物の結合を検出する。このポリヌクレオチドと結合する試験化合物は、細胞外基質分解を減少させるのに有望な物質として同定される。この物質は樹状細胞免疫受容体mRNAと相互作用することを介し、樹状細胞免疫受容体の量を減少させることによって機能し得る。

【0016】

本発明の別の態様は、細胞外基質分解を調節する物質をスクリーニングする方法である。試験化合物を、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと接触させる：

配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも約30%の同一性を有するアミノ酸配列；ならびに、

配列番号2に示されるアミノ酸配列；

配列番号15に示されるアミノ酸配列と少なくとも約30%の同一性を有するアミノ酸配列；ならびに、

配列番号2に示されるアミノ酸配列。

40

【0017】

ポリペプチドの樹状細胞免疫受容体活性を検出する。このポリペプチドの樹状細胞免疫受

50

容体活性を、試験化合物の不存在的下における樹状細胞免疫受容体活性と比較して増大させる試験化合物は、これにより、細胞外基質分解の増大に関して有望な物質として同定される。

【0018】

本発明のさらに別の態様は、細胞外基質分解を減少させる物質のスクリーニング方法である。試験化合物を、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの樹状細胞免疫受容体産物と接触させる：

配列番号1に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約50%の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号1に示されるヌクレオチド配列。

配列番号14に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約50%の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号14に示されるヌクレオチド配列。

【0019】

樹状細胞免疫受容体産物に対する試験化合物の結合を検出する。樹状細胞免疫受容体産物と結合する試験化合物は、これにより、細胞外基質分解の減少に関して有望な物質として同定される。

【0020】

本発明のさらに別の態様は、細胞外基質分解を減少させる方法である。細胞を、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはこのポリヌクレオチドによってコードされる産物と特異的に結合する試薬と接触させる：

配列番号1に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約50%の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号1に示されるヌクレオチド配列。

配列番号14に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約50%の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号14に示されるヌクレオチド配列。

【0021】

細胞内の樹状細胞免疫受容体活性はこれにより減少する。

【0022】

したがって本発明は、例えばこの酵素の活性部位におけるアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る試験化合物を同定するのに使用可能なヒト樹状細胞免疫受容体を提供する。ヒト樹状細胞免疫受容体およびその断片はまた、この酵素をブロックし、効率的にその活性を減少させることができる特異的抗体を生じさせるのに有用である。

【0023】

本発明の詳しい説明

本発明は、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%一致するアミノ酸配列；

配列番号2に示すアミノ酸配列；

配列番号15に示すアミノ酸配列と少なくとも約30%一致するアミノ酸配列；および

配列番号15に示すアミノ酸配列

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

b) 配列番号1または14に記載の配列を含むポリヌクレオチド；

c) (a) および (b) に明記するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

d) 遺伝コードの縮重のため、その配列が (a) ~ (c) に明記するポリヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列から逸脱しているポリヌクレオチド；並びに

e) (a) ~ (d) に明記するポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体を表すポリヌクレオチド、

から成る群より選択されるポリヌクレオチドに関する。

【0024】

さらに、新規の樹状細胞、(特にヒト樹状細胞免疫受容体)が、本発明の発見であることが本願出願によって発見された。ヒト樹状細胞免疫受容体は、配列番号2および15に示されるアミノ酸配列を含む。樹状細胞免疫受容体をコードする配列は、配列番号1および14に示される。関連するEST(配列番号4~13)は、肺と肝臓中で表現する。

【0025】

ヒト樹状細胞免疫受容体は、“p d b | 1 D V 8 | 1 D V 8 - A”(図17)と注釈されるタンパク質と132アミノ酸にわたって28%の同一性を有する。ヒト樹状細胞免疫受容体はさらに、C型レクチンドメイン(図18)を含む。

【0026】

ヒト樹状細胞免疫受容体は、癌、喘息、肥満、糖尿病、CNS障害あるいは心臓血管障害の処置および診断に有用であることが予想される。また、ヒト樹状細胞免疫受容体および遺伝子は、ヒト樹状細胞免疫受容体および遺伝子アゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングするのに用いることもできる。

【0027】

ポリペプチド

本発明に係る樹状細胞免疫受容体ポリペプチドには、配列番号2に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125または134個の連続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明の樹状細胞免疫受容体ポリペプチドは、樹状細胞免疫受容体タンパク質の一部、完全長の樹状細胞免疫受容体タンパク質、又は樹状細胞免疫受容体タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。さらに、本発明に係る樹状細胞免疫受容体ポリペプチドには、配列番号2に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125または148個の連続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明の樹状細胞免疫受容体ポリペプチドは、樹状細胞免疫受容体タンパク質の一部、完全長の樹状細胞免疫受容体タンパク質、又は樹状細胞免疫受容体タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。

【0028】

生物学的に活性な変異体

生物学的活性がある、即ちセリンプロテアーゼ、および、好ましくはトリプシンセリンプロテアーゼ活性を保持している樹状細胞免疫受容体ポリペプチド変異体もまた、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドである。天然または非天然樹状細胞免疫受容体ポリペプチド変異体は、配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも約30、35、40、45、50、55、60、65または70%、好ましくは、約75、80、85、90、96、97または98%一致するアミノ酸配列またはその断片を有することが好ましい。推定される樹状細胞免疫受容体ポリペプチド変異体と配列番号2に記載のアミノ酸配列との間の一致(同一性)パーセントは、Blast2整列(アライメント)プログラム(Blosom62, Expect 10, standard genetic codes)を用いて決定される。

【0029】

一致パーセントの変異は、例えばアミノ酸置換、挿入または欠失に起因し得る。アミノ酸置換は1対1のアミノ酸の置き換えとして定義される。置換されたアミノ酸が類似の構造のおよび/または化学的性質を有する場合、置換は事実上保存的である。保存的置換の例は、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの置換、グルタメートによるアスパルテートの置換、またはセリンによるスレオニンの置換である。

10

20

30

40

50

【0030】

アミノ酸挿入または欠失はアミノ酸配列への、またはその内部での変化である。これらは典型的には約1～5アミノ酸の範囲で起こる。樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの生物学的または免疫学的活性を破壊することなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失できるかを決定する際の指針は、当分野で周知のコンピュータプログラム、例えばDNASTARソフトウェアを用いて見出すことができる。あるアミノ酸変化が生物学的に活性な樹状細胞免疫受容体ポリペプチドに影響するか否かは、例えば以下の実施例に記載のように、セリンプロテアーゼ活性を検定することにより容易に決定できる。

【0031】

融合タンパク質

融合タンパク質は、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドアミノ酸配列に対する抗体の作製に、そして様々な検定系での使用に有用である。例えば、融合タンパク質は、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの一部と相互作用するタンパク質の同定に使用できる。タンパク質親和クロマトグラフィーまたはタンパク質-タンパク質相互作用のためのライブラリーに基づく検定、例えば酵母2-ハイブリッドまたはファージディスプレイ系をこの目的のために使用できる。このような方法は当分野で周知であり、薬物スクリーニングとしても使用できる。

【0032】

樹状細胞免疫受容体ポリペプチド融合タンパク質は、ペプチド結合により互いに融合した二つのポリペプチドセグメントを含んでいる。第一のポリペプチドセグメントは、配列番号2または上記のような生物学的に活性な変異体の少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125または134個の連続アミノ酸を含む。第一のポリペプチドセグメントはまた、完全長樹状細胞免疫受容体タンパク質を含み得る。

樹状細胞免疫受容体ポリペプチド融合タンパク質は、ペプチド結合により互いに融合した二つのポリペプチドセグメントを含んでいる。さらに第一のポリペプチドセグメントは、配列番号15または上記のような生物学的に活性な変異体の少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125または134個の連続アミノ酸を含む。第一のポリペプチドセグメントはまた、完全長樹状細胞免疫受容体タンパク質を含み得る。

【0033】

第二のポリペプチドセグメントは完全長タンパク質またはタンパク質断片であってよい。融合タンパク質の構築に一般的に使用するタンパク質は、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、自己蛍光タンパク質(青色蛍光タンパク質(BFP)を包含する)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を包含する。さらに、融合タンパク質の構築には、ヒスチジン(His)標識、FLAG標識、インフルエンザヘマグルチニン(HA)標識、Myc標識、VSV-G標識、およびチオレドキシニン(Trx)標識を包含するエピトープ標識を使用する。その他の融合構築は、マルトース結合タンパク質(MBP)、S-標識、Lexa DNA結合ドメイン(DBD)融合物、GAL4 DNA結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス(HSV)BP16タンパク質融合物を包含する。また、融合タンパク質はさらに、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドコード配列と非相同タンパク質配列の間に位置する開裂部位を含むよう組み立てることができ、その結果、この樹状細胞免疫受容体ポリペプチドは、開裂され、非相同部分を無くすように精製できる。

【0034】

融合タンパク質は当分野で周知のように化学合成できる。好ましくは、融合タンパク質は二つのポリペプチドセグメントを共有結合で連結することにより、または分子生物学分野で標準的な方法により調製する。例えば、当分野で知られているように、第二のポリペプチドセグメントをコードしているヌクレオチドを有する適切なリーディングフレームに配列番号1または14より選ばれるコード配列を含むDNA構築物を作製し、このDNA構築物を宿主細胞で発現させることによる組換えDNA法を用いて、融合タンパク質を調製

10

20

30

40

50

できる。融合タンパク質構築用の多くのキットが、Promega Corporation (Madison, WI)、Stratagene (La Jolla, CA)、CLONTECH (Mountain View, CA)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA)、および Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS) といった企業から入手できる。

【0035】

種相同体の同定

樹状細胞免疫受容体ポリペプチドのポリヌクレオチド(下記)を使用して他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングするために好適なプローブまたはプライマーを作製し、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの相同体をコードしているcDNAを同定し、そして当分野で周知のようにこのcDNAを発現させて、ヒト樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの種相同体を得ることができる。

【0036】

ポリヌクレオチド

樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖であってよく、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドのコード配列又はその相補物を含んでいてもよい。ヒト樹状細胞免疫受容体のコード配列を、配列番号1または14に示す。

【0037】

ヒト樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードしている縮重ヌクレオチド配列、および、配列番号1に示すヌクレオチド配列と少なくとも約50、好ましくは約75、90、96または98%一致するホモローガスなヌクレオチド配列もまた、樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドである。二つのポリヌクレオチド配列間の配列一致パーセントは、ALIGNのようなコンピュータープログラムを用いて決定するが、これは、ギャップオープンペナルティー-12およびギャップエクステンションペナルティー-2によるアフィンギャップ検索を用いるFASTAアルゴリズムを使用するものである。相補的DNA(cDNA)分子、種相同体および生物学的に活性な樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードしている樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドの変異体もやはり樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドである。

【0038】

ポリヌクレオチド変異体および相同体の同定

上記の樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチド変異体および相同体もまた樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドである。典型的には、相同樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチド配列は、当分野で周知のように、ストリンジェントな条件下で候補ポリヌクレオチドを既知の樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドにハイブリダイズさせることにより同定できる。例えば、以下の洗浄条件 - - 2X SSC (0.3M NaCl、0.03Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.1% SDS、室温 2回、各々30分間；次いで2x SSC、0.1% SDS、50 1回、30分間；次いで2x SSC、室温 2回、各々10分間 - - を使用して、最大約25-30%の塩基対ミスマッチ(不対合)を含む相同配列を同定できる。より好ましくは、相同核酸鎖は15-25%の塩基対ミスマッチを、さらに好ましくは5-15%の塩基対ミスマッチを含む。

【0039】

本明細書に開示する樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドの種相同体はさらに、適当なプローブまたはプライマーを作製し、他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって同定できる。樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドのヒト変異体は、例えばヒトcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることにより同定できる。二本鎖DNAのT_mは相同性が1%低下する毎に1-1.5 低下することがよく知られている(Bonnerら、J. Mol. Biol. 81, 123 (1973))。故にヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドの変異体また

10

20

30

40

50

は他の種の樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドは、推定の相同樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドを、配列番号1に記載のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズさせて被験ハイブリッドを作製することによって同定できる。被験ハイブリッドの融解温度を完全に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含むハイブリッドの融解温度と比較し、被験ハイブリッド中の塩基対ミスマッチの数またはパーセントを算出する。

【0040】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件に従い樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズするヌクレオチド配列もまた樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドである。ストリンジェントな洗浄条件は当分野で周知且つ理解されており、例えばSambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., 1989, 9.50-9.51頁に開示されている。

10

【0041】

典型的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のためには、温度と塩濃度の組み合わせを、検討中のハイブリッドの理論的 T_m よりおよそ12-20低くなるよう選択すべきである。配列番号1または6に示すヌクレオチド配列を有する樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドまたはその相同体と、それらのヌクレオチド配列のいずれか1つと少なくとも約50、55、60、65、70、好ましくは約75、90、96、または98%一致するポリヌクレオチド配列とのハイブリッドの T_m は、例えばBoltonおよびMcCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1390 (1962)の式:

20

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - 0.63 (\%ホルムアミド) - 600/l,$$

[式中、 l = 塩基対で表したハイブリッドの長さ]

を用いて算出できる。

ストリンジェントな洗浄条件としては例えば、 $4 \times SSC$ (65)、または50%ホルムアミド、 $4 \times SSC$ (42)、または $0.5 \times SSC$ 、0.1%SDS (65)が挙げられる。高度ストリンジェントな洗浄条件は、例えば $0.2 \times SSC$ (65)などである。

30

【0042】

ポリヌクレオチドの調製

天然に存在する樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドは、膜構成成分、タンパク質および脂質といった他の細胞成分を含まないよう単離できる。ポリヌクレオチドは細胞から調製でき、標準的核酸精製技術を用いて単離、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような増幅技術を用いて合成、若しくは自動合成機を用いることによって調製できる。ポリヌクレオチドを単離する方法は機械的であり、当分野で知られている。ポリヌクレオチドを取得するためこのような任意の技術を用いて、単離された樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドを得ることができる。例えば、制限酵素およびプローブを用いて樹状細胞免疫受容体ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド断片を単離できる。単離したポリヌクレオチドは他の分子を含まないか、あるいは少なくとも70、80、または90%含まない調製物である。

40

【0043】

樹状細胞免疫受容体cDNA分子は、樹状細胞免疫受容体mRNAを鋳型に用いて標準的分子生物学技術にて調製できる。その後樹状細胞免疫受容体cDNA分子は、当分野で周知でありSambrookら、(1989)のようなマニュアルに開示される分子生物学技術を用いて複製できる。ヒトゲノムDNAまたはcDNAのいずれかを鋳型として使用して本発明に係るポリヌクレオチドのさらなるコピーを得るため、PCRのような増幅技術を用いることができる。

【0044】

50

別法として、合成化学技術を用いて樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドを合成することもできる。遺伝コードの縮重により、例えば配列番号2に示すアミノ酸配列を有する樹状細胞免疫受容体ポリペプチドまたはその生物学的に活性化変異体をコードする別のヌクレオチド配列の合成を可能にする。

【0045】

ポリヌクレオチド伸長

PCRに基づく様々な方法を用いて、配列番号1および9に開示した核酸配列を伸長させ、プロモーターおよび調節要素といった上流配列を検出することができる。例えば制限部位PCRは、既知の座に隣接する未知配列を検索するため、ユニバーサルプライマーを使用する(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., eds., Elsevier Press, N. Y., 1986)。まず、ゲノムDNAを、リンカー配列に対するプライマーと既知領域に特異的なプライマーの存在下で増幅する。次に、増幅させた配列を、同じリンカープライマーと最初のもの内部にある別の特異的プライマーを用いて、第二回目のPCRを行なう。各回のPCR産物を適当なRNAポリメラーゼで転写し(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037)逆転写酵素を行って配列決定する(Sambrook et al., 1989, pg. 1.20)。

10

【0046】

既知領域に基づく異なるプライマーを用いて配列を増幅または伸長するために、逆PCRを使用することもできる(Davis et al., 1986)。市販ソフトウェアを用いて、標的配列とアニーリングするプライマーを設計できる。この方法は、幾つかの制限酵素を用いて、遺伝子の既知領域に適当な断片を作り出細胞。次いでこの断片を分子内ライゲーションにより環化し、PCR鑄型として使用する。生じる放射能画像のプレートを複写するために比較する。各スポットは、ポジティブなコロニーかブランクに相当する。コロニーあるいはブランクは選択され拡張される。また、DNAは詳しい分析および配列用のコロニーから分離する。

20

【0047】

ポジティブなcDNAクローンはそれらが、部分的な配列からの1つのプライマーおよびベクターからの別のプライマーを備えたPCRを使用して含んでいる、補足配列の量を決定すると分析される。クローンで、1つの、より大きな、オリジナルの部分的な配列よりPCR産物をベクター挿入する、mRNAサイズがノーザンブロットティング分析から決定するとともに、それらが同じ大きさのインサートを含むかどうか決めるために順番に並べる、制限消化およびDNAによって分析されるか類似している。

30

【0048】

使用できるもう一つの方法は、ヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む、エキソヌクレアーゼIIIである(McCombie et al., Methods 3, 33-40, 1991)。この方法では、作製した二本鎖配列を、PCRの実施前に当該DNA分子の未知断片中に入れるため、さらに複数の制限酵素消化とライゲーションを行うことができる。

【0049】

様々なPCRに基づいた方法はプロモーターおよび規定する要素のように上流に検知するキナーゼ様蛋白質が順番に並べる、ヒトスフィンゴシンの示された部分をコード化する核酸配列を拡張するために使用することができた。例えば、制限部位PCRは、既知の軌跡(SarkarおよびPCR方法Applic. 2, 318-322, 1993年)に隣接している未知の配列を検索するために普遍的なプライマーを使用する。ゲノムのDNAは、結合物配列へのプライマーおよび既知の領域への効薬がある状態で最初に増幅される。その後、増幅された配列は、同じ結合物プライマー、および第1のものに内部別の特定のプライマーを備えたPCRの第2ラウンドにさらされる。PCRの各丸の産物は適切なRNAポリメラーゼで転写され、逆転写酵素を使用して順番に並べられる。

40

【0050】

50

さらに逆PCRは、既知の領域 (Triglia et al., Nucleic Acids Res. 16, 8186, 1988) に基づいた分岐するプライマーを使用して、配列を増幅するか拡張するために使用することができた。プライマーはOLIGO 4.06のように、商業的に利用可能なソフトウェアを使用して、設計することができた、分析ソフトウェア (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn)、50%以上のGCの内容を持っており、かつ緩冷するために長さで22 - 30のヌクレオチドであるために、約68 - 72の温度で目標配列をアニールする。方法は、遺伝子の既知の領域の適切な破片を生成するためにいくつかの制限酵素を使用する。その後、分子内の酵素によって破片に切断される。また、その破片はPCRテンプレートとして使用される。

10

【0051】

未知配列を回収するために使用できるもう一つの方法はPCR (それはヒトとイーストの中の既知の配列に隣接しているDNA破片のPCR増幅を含んでいる) を捕らえる、人工染色体DNA (Lagerstromら、Applic PCR法。1, 111-119, 1991年) である。この方法では、多数の制限酵素消化がPCRを実行する前に、DNA分子の未知の破片に巧みに計画された二重らせん構造の配列を入れるために使用される。

【0052】

未知配列を回収するために使用できるもう一つの方法はParkerら、Nucleic Acids Res. 19, 3055-3060, 1991の方法である。さらに、PCR、ネステッド (nested) プライマー、およびPROMOTER FINDER ライブラリー (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) を用いてゲノムDNA歩行を行なうことができる (CLONTECH, Palo Alto, Calif.)。このプロセスはライブラリーをスクリーニングする必要性を排除し、イントロン/エクソン接合点の発見に有用である。

20

【0053】

スクリーニングで完全長cDNAを求める場合、より大きなcDNAを含むようサイズ選択したライブラリーを使用するのが望ましい。遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含んでいるという点で、無作為プライミングしたライブラリーが好ましい。無作為プライミングしたライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを産生しない状況で特に好ましいであろう。ゲノムライブラリーは、配列を5'非転写調節領域へと伸長させるのに有用な場合がある。

30

【0054】

市販品が入手可能な毛細管電気泳動系を用いて、PCRまたは配列決定産物のサイズを分析、またはヌクレオチド配列を確認することができる。例えば、毛細管配列決定は、電気泳動分離用の流動性ポリマー、レーザー励起する4種の異なる蛍光色素 (各ヌクレオチドにつき1種ずつ)、および電荷結合素子カメラによる放射された波長の検出を利用することができる。出力/光強度は適当なソフトウェア (例えばGENOTYPERおよびSequence NAVIGATOR、Perkin Elmer) を用いて電気シグナルに変換でき、試料のロードからコンピューター分析および電子的データ表示に至る全プロセスをコンピューター管理することができる。毛細管電気泳動は、特定の試料中に限られた量で存在するかも知れないDNAの小片を配列決定するのに特に好ましい。

40

【0055】

ポリペプチドの取得

ヒト樹状細胞免疫受容体は、例えばヒト細胞からの精製によって、ヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドの発現によって、または直接的化学合成によって取得できる。

【0056】

タンパク質精製

ヒト樹状細胞免疫受容体を、その酵素を発現する任意の細胞 (HCT 116, DLD 1, HT 29, Caco 2, SW 837, SW 480, およびRKO, 乳癌細胞系 2

50

1 - P T , 2 1 - M T , M D A - 4 6 8 , S K - B R 3 , および B T - 4 7 4 , A 5 4 9 を含む) から精製することができる。ヒト正常上皮細胞および初期癌細胞は、セリンプロテアーゼ D E S C 1 ヒト樹状細胞免疫受容体の特に有用なソースを提供する。精製ヒト樹状細胞免疫受容体は、当分野で周知の方法を用いて、細胞内でヒト樹状細胞免疫受容体と通常会合している他の化合物、例えば特定のタンパク質、炭水化物または脂質から分離される。そのような方法には、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび調製用ゲル電気泳動が挙げられるが、これらに制限されない。精製ヒト樹状細胞免疫受容体の調製は、少なくとも 8 0 % 純粋 ; 9 0 %、9 5 % または 9 9 % 純粋な調製であることが好ましい。調製物の純度は当分野で周知の任意の方法、例えば L i n e t a l . , B i o l . C h e m . 2 7 4 , 1 8 2 3 1 - 3 6 , 1 9 9 9 に記載の S D S ポリキャピラリーゲル電気泳動によって評価できる。

10

20

30

40

50

【0057】

ポリヌクレオチドの発現

ヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドを発現させるため、挿入されたコード配列の転写と翻訳に必要な要素を含む発現ベクター中にそのポリヌクレオチドを挿入することができる。当業者に周知の方法を利用して、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列および適当な転写および翻訳調節要素を含む発現ベクターを構築できる。これらの方法には、インビトロ組換え DNA 技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えがある。このような技術は、例えば S a m b r o o k ら、(1 9 8 9) および A u s u b e l ら、C U R R E N T P R O T O C O L S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y , J o h n W i l e y & S o n s , N e w Y o r k . , 1 9 8 9 に記載されている。

【0058】

ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列を含み、そして発現する様々な発現ベクター/宿主系が利用できる。これらには、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミド DNA 発現ベクターにより形質転換された細菌 ; 酵母発現ベクターにより形質転換された酵母、ウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) により感染を受けた昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター (例えばカリフラワーモザイクウイルス、C a M V ; タバコモザイクウイルス、T M V)、若しくは細菌発現ベクター (例えば T i または p B R 3 2 2 プラスミド) により形質転換された植物細胞系、または動物細胞系が包含されるがこれらに限定される訳ではない。

【0059】

調節要素または調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写と翻訳を実行するベクターの非翻訳領域 - エンハンサー、プロモーター、5' および 3' 非翻訳領域 - である。かかる要素はその強さと特異性において異なっている。利用するベクター系および宿主に応じて、構成的および誘導的プロモーターを包含する、多数の好適な転写および翻訳要素を使用できる。例えば、細菌系でクローニングを行う場合、B L U E S C R I . P . T ファージミド (S t r a t a g e n e , L a J o l l a , C a l i f .) または p S P O R T 1 プラスミド (L i f e T e c h n o l o g i e s) 等のハイブリッド l a c Z プロモーターのような誘導的プロモーターを使用できる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞に使用できる。植物細胞のゲノムから誘導したプロモーターまたはエンハンサー (例えば熱ショック、R U B I S C O、および貯蔵タンパク質遺伝子)、または植物ウイルスから誘導したプロモーターまたはエンハンサー (例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列) を該ベクター中にクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来の、または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしているヌクレオチド配列を複数コピー含む細胞系を作製する必要がある場合は、S V 4 0 または E B V に基づくベクターを適当な選択マーカーと共に使用することができる。

【0060】

細菌および酵母発現系

細菌系では、ヒト樹状細胞免疫受容体に対して意図する用途に応じて幾つかの発現ベクターを選択できる。例えば、抗体の誘導のため、大量のヒト樹状細胞免疫受容体が必要な場合は、容易に精製できる融合タンパク質の高レベル発現を指令するベクターが使用できる。このようなベクターは、BLUESCRI.P.T (Stratagene) のような多機能E.coliクローニングおよび発現ベクターを包含するが、これに限定される訳ではない。BLUESCRI.P.Tベクターにおいては、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列を、 β -ガラクトシダーゼのアミノ末端Metとこれに続く7残基の配列と共にフレーム内で該ベクター中にライゲーションすることができ、その結果ハイブリッドタンパク質が産生される。pINベクター (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264, 5503-5509, 1989) または pGEXベクター (Promega, Madison, Wis.) もまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) を伴う融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるのに使用できる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させ、その後遊離グルタチオンの存在下で溶離することにより、溶菌させた細胞から容易に精製できる。このような系で調製したタンパク質は、ヘパリン、トロンピン、または第Xa因子プロテアーゼ開裂部位を含むよう設計でき、その結果、目的とするクローンポリペプチドをGST部分から随意に解放することができる。

【0061】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、 α 因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHのような構成的または誘導的プロモーターを含む幾つかのベクターが使用できる。総説としてAusubelら、(1989) およびGrantら、*Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987を参照されたい。

【0062】

植物および昆虫発現系

植物発現ベクターを使用する場合、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列の発現は、幾つかのプロモーターのうち任意のものにより駆動できる。例えば、CaMVの35Sおよび19Sプロモーターのようなウイルスプロモーターを、単独で、またはTMV由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用できる (Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, 1987)。別法として、RUBISCOの小サブユニットのような植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを使用することもできる (Coruzziら、*EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglieら、*Science* 224, 838-843, 1984; Winterら、*Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991)。これらの構築物は、直接DNA形質転換または病原体媒介トランスフェクションにより植物細胞中に導入できる。このような技術は、幾つかの一般に入手可能な総説に記載されている (例えば、HobbsまたはMurray、*McGraw Hill Yearbook of Science and Technology*, McGraw Hill, New York, N.Y., pp191-196, 1992)。

【0063】

昆虫系もまたヒト樹状細胞免疫受容体の発現に使用できる。例えば、かかる系の1つ *Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcNPV) は、*Spodoptera frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* の幼虫で外来遺伝子を発現させるベクターとして使用する。ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列を、ポリヘドリン遺伝子のような該ウイルスの非必須領域中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの調節下に置くことができる。ヒト樹状細胞免疫受容体をうまく挿入すると、ポリヘドリン遺伝子は不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが生成する。次いでこの組換えウイルスを *S. frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* の幼虫への感染に使用し、そこでヒト樹状細胞免疫受容体を発現させることができる (Engelhardら、*Proc. Nat. Acad. Sci.* 40

. 91, 3224 - 3227, 1994)。

【0064】

哺乳動物発現系

ウイルスに基づく多くの発現系を用いて哺乳動物宿主細胞でヒト樹状細胞免疫受容体を発現させることができる。例えば、発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列は、後期プロモーターおよび3部に分かれたリーダー配列を含むアデノウイルス転写/翻訳複合体中にライゲーションできる。該ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域における挿入を用いて、感染宿主細胞においてヒト樹状細胞免疫受容体を発現できる生存ウイルスを取得できる(Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3655 - 3659, 1984)。所望によりラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーのような転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞での発現を増大させることができる。

10

【0065】

ヒト人工染色体(HAC)もまた、プラスミドが内包し発現するDNA断片よりも大きなDNA断片の運搬に使用できる。6Mから10MのHACを組み立て、常套的送達法により細胞に到達させる(例えば、リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、または小胞)。

【0066】

さらに、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列のより効率的な翻訳を達成するために、特異的開始シグナルを使用できる。かかるシグナルはATG開始コドンおよび連続配列を包含する。ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクター中に挿入した場合、さらなる転写または翻訳調節シグナルは必要ないであろう。しかしながら、コード配列またはその断片のみを挿入した場合は、外因性の翻訳調節シグナル(ATG開始コドンを包含する)を供給すべきである。開始コドンは挿入物全体を確実に翻訳させるために、正しいリーディングフレームになればならない。外因性翻訳要素および開始コドンは天然および合成両者の様々な起源であってよい。発現の効率は、使用する特定の細胞系に対し適切なエンハンサーを存在させることにより増強できる(Scharfら、Results Probl. Cell Differ. 20, 125 - 162, 1994)。

20

【0067】

宿主細胞

宿主細胞菌株は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現されたヒト樹状細胞免疫受容体を所望の方法で処理できる能力を目的として選択できる。該ポリペプチドのこのような修飾には、アセチル化、カルボキシ化、グリコシル化、燐酸化、脂質化、およびアシル化が包含されるがこれらに限定されない。該ポリペプチドの「プレプロ」型を開裂する翻訳後プロセッシングもまた、正しい挿入、折り畳み、および/または機能を促進するために使用できる。翻訳後活性のための特異的な細胞機構および特徴的メカニズムを持つ異なる宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293およびWI38)が、American Type Culture Collection(ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 - 2209)から入手でき、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選択できる。

30

40

【0068】

組換えタンパク質の長期高収量産生のために、安定な発現が好ましい。例えば、ヒト樹状細胞免疫受容体を安定に発現する細胞系を、ウイルス複製起点および/または内因性発現要素、および同じまたは別のベクター上にある選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターを用いて形質転換することができる。該ベクターの導入に続いて、細胞を強化培地で1 - 2日間生育させた後、培地を選択培地に交換することができる。選択マーカーの目的は選択に対する抵抗性を付与することであり、その存在が、導入されたヒト樹状細胞免疫受容体配列をうまく発現する細胞の生育と回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性

50

クローンは、その細胞型にとって適当な組織培養技術を用いて増殖させることができる。例えば、ANIMAL CELL CULTURE, R. I. Freshney, ed., 1986を参照されたい。

【0069】

幾つかの選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収できる。

【0070】

これらには、それぞれ tk⁻ または apr^t- 細胞で使用できる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら、Cell 11, 223-32, 1977) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら、Cell 22, 817-23, 1980) 遺伝子が包含されるが、これらに限定される訳ではない。さらに、代謝拮抗物質、抗生物質、または除草剤耐性を選択の基準に用いることができる。例えば、dhfr はメソトレキサートに対する耐性を付与し (Wiglerら、Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3567-70, 1980) npt はアミノグリコシド、ネオマイシンおよび G-418 に対する耐性を付与し (Colbere-Garapinら、J. Mol. Biol. 150, 1014, 1981)、そして als および pat はそれぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する (Murray, 1992, 上記)。さらなる選択遺伝子が記載されている。例えば、trpB は細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用するようにさせ、hisD は細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用するようにさせる (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8047-51, 1988)。アントシアニンのような可視マーカー、 β -グルクロニダーゼとその基質 GUS、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンは、形質転換体を同定し、特異的ベクター系に帰すことのできる一過性または安定なタンパク質発現の量を定量するために使用できる (Rhodesら、Methods Mol. Biol. 55, 121-131, 1995)。

【0071】

発現の検出

マーカー遺伝子発現の存在はヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドが存在することも示唆しているが、ヒト樹状細胞免疫受容体の存在と発現は確認する必要がある。例えば、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列がマーカー遺伝子配列内部に挿入されている場合、誘導または選択に应答して、通常、ヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドの発現を示す。

【0072】

これとは別に、ヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドを含み、PI-ヒト樹状細胞免疫受容体を発現する宿主細胞は、当業者に知られる様々な方法によって同定できる。これらの方法には、DNA-DNA または DNA-RNA ハイブリダイゼーションおよびタンパク質生検またはイムノアッセイ技術 (核酸またはタンパク質の検出および/または定量のための膜、溶液、またはチップに基づく技術を包含する) が包含されるがこれらに限定されない。例えば、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしているポリヌクレオチド配列の存在は、プローブまたは断片またはヒト樹状細胞免疫受容体をコードしているポリヌクレオチドの断片を使用する DNA-DNA または DNA-RNA ハイブリダイゼーションまたは増幅によって検出できる。核酸増幅に基づく検定は、ヒト樹状細胞免疫受容体を含む形質転換体を検出するための、ヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドをコードしている配列から選択されるオリゴヌクレオチドの使用を含む。

【0073】

ヒト樹状細胞免疫受容体に対し特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを使用して該ポリペプチドの発現を検出および測定するための様々なプロトコルが当分野で知られている。例として、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、および蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) がある。ヒト樹状細胞免疫受容体上の2個の非干渉性エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる、

2部位のモノクローナルに基づくイムノアッセイが使用でき、または、競合的結合検定を使用することができる。これらのおよびその他の検定はHamptomら、SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990およびMaddoxら、J. Exp. Med. 158, 1211-1216, 1983に記載されている。

【0074】

多岐にわたる標識およびコンジュゲーション技術が当業者に知られており、様々な核酸およびアミノ酸検定に使用できる。ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしているポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識化ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを調製する手段は、標識したヌクレオチドを使用する、オリゴ標識化、ニック翻訳、末端標識化、またはPCR増幅を包含する。これとは別に、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列を、mRNAプローブの産生のためのベクター中にクローニングすることもできる。このようなベクターは当分野で既知であり、市販品が入手でき、標識化ヌクレオチドおよび適当なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3、またはSP6を添加することによりインビトロでのRNAプローブの合成に使用することができる。これらの方法は、市販の様々なキットを用いて実施できる(Amersham Pharmacia Biotech、Promega、およびUS Biochemical)。検出を容易にするために使用できる適当なリポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、および蛍光、化学ルミネセント、または色素生成物質、ならびに基質、補助因子、インヒビター、磁性粒子などが包含される。

10

20

【0075】

ポリペプチドの発現および精製

ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしているヌクレオチド配列で形質転換させた宿主細胞は、発現と、細胞培養からのタンパク質の回収に適した条件下で培養できる。形質転換細胞により産生されたポリペプチドは、その配列および/または使用したベクターに応じて分泌されまたは細胞内に貯留され得る。当業者には理解できるであろうが、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通った可溶性ヒト樹状細胞免疫受容体の分泌を指令する、または膜結合ヒト樹状細胞免疫受容体の膜挿入を指令する、シグナル配列を含むよう設計できる。

30

【0076】

上に論じたように、他の構築物を用いて、ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードしているヌクレオチド配列と結合させることができる。このような精製促進ドメインは、金属キレート化ペプチド、例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするタンパク質Aドメイン、およびFLAG伸長/親和精製系で利用するドメインが包含されるが、これらに限定されない(Immunex Corp., Seattle, Wash.)。精製ドメインとヒト樹状細胞免疫受容体との間に開裂可能リンカー配列、例えば第Xa因子またはエンテロキナーゼに特異的なリンカー配列を入れること(Invitrogen, San Diego, CA)もまた、精製を促進するために利用できる。このような発現ベクターの1つは、ヒト樹状細胞免疫受容体と、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ開裂部位に先立つ6個のヒスチジン残基とを含む融合タンパク質の発現を提供する。このヒスチジン残基はIMAC(Porathら、Prot. Exp. Purif. 3, 263-281, 1992に記載の固定化金属イオン親和クロマトグラフィー)による精製を促進し、一方エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からのヒト樹状細胞免疫受容体の精製手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターはKrollら、DNA Cell Biol. 12, 441-453, 1993に開示されている。

40

【0077】

化学合成

ヒト樹状細胞免疫受容体をコードしている配列は、その全体または一部を、当分野で周知

50

の化学的方法を用いて合成できる (Caruthersら、Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, 1980; Hornら、Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980)。これとは別に、ヒト樹状細胞免疫受容体自身を、そのアミノ酸配列を合成するための化学的方法、例えば固相技術を用いる直接ペプチド合成を用いて調製できる (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Robergeら、Science 269, 202-204, 1995)。タンパク質合成は手動技術またはオートメーションを用いて実施できる。自動化合成は、例えばApplied Biosystems 431Aペプチド合成機 (Perkin Elmer) を用いて達成できる。所望により、ヒト樹状細胞免疫受容体の断片を別々に合成し、化学的方法を用いて合して完全長の分子を調製することもできる。 10

【0078】

新たに合成したペプチドは、調製用高速液体クロマトグラフィー (例えばCreighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman and Co., New York, N. Y., 1983) により実質的に精製できる。合成ヒト樹状細胞免疫受容体の組成はアミノ酸分析または配列決定により確認できる (例えばエドマン分解法; Creighton、上記を参照されたい)。さらに、直接合成中にヒト樹状細胞免疫受容体のアミノ酸配列の任意の部分を改変させ、そして/または化学的方法を用いて他のタンパク質由来の配列と合して、変異体ポリペプチドまたは融合タンパク質を調製することができる。 20

【0079】

改変ポリペプチドの調製

当業者には理解できるであろうが、天然に存在しないコドンをもつヒト樹状細胞免疫受容体コード化ヌクレオチドを調製することは有利であり得る。例えば、特定の原核または真核宿主が好むコドンを選択して、タンパク質発現の速度を増大させ、または所望の性質、例えば天然に存在する配列から産み出される転写物の半減期より長い半減期を持つRNA転写物を調製することができる。

【0080】

本明細書に開示するヌクレオチド配列は、当分野で一般的に知られる方法を用いて、ヒト樹状細胞免疫受容体またはmRNA産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を修飾する改変を包含する (但しこれらに限定される訳ではない) 様々な理由で、該ポリペプチドコード配列を改変させるように設計できる。無作為断片化によるDNAシャッフリングと遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再集合を用いてヌクレオチド配列を設計できる。例えば、位置指定突然変異誘発を用いて、新たな制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変え、コドンの優先性を変え、スプライス変異体を調製し、突然変異を導入する等を実施できる。 30

【0081】

抗体

当分野で知られているいかなる型の抗体も、ヒト樹状細胞免疫受容体のエピトープに特異的に結合するよう作製できる。本明細書で使用する「抗体」とは、無傷の免疫グロブリン分子、およびその断片、例えばFab、F(ab')₂、およびFvを包含し、これらはヒト樹状細胞免疫受容体のエピトープに結合できる。典型的には、エピトープを形成するためには少なくとも6、8、10、または12の連続するアミノ酸が必要である。しかしながら、非連続アミノ酸を含むエピトープはより多くの、例えば少なくとも15、25、または50のアミノ酸を必要とするかも知れない。 40

【0082】

ヒト樹状細胞免疫受容体のエピトープに特異的に結合する抗体は治療に使用でき、そして免疫化学検定、例えばウェスタンブロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学検定、免疫沈降、またはその他の当分野で既知の免疫化学的検定に使用できる。所望の特異性を有する抗体の同定のため、様々なイムノアッセイが使用できる。競合的結合 50

または免疫放射検定のための多数のプロトコルが当分野でよく知られている。このようなイムノアッセイは典型的には、免疫原と、その免疫原に特異結合する抗体との間の複合体形成の測定を含んでいる。

【0083】

典型的には、ヒト樹状細胞免疫受容体に特異的に結合する抗体は、免疫化学検定に使用する時、他のタンパク質が提供する検出シグナルより少なくとも5、10、または20倍高い検出シグナルを提供する。好ましくは、ヒト樹状細胞免疫受容体に特異結合する抗体は、免疫化学検定で他のタンパク質を検出せず、ヒト樹状細胞免疫受容体を溶液から免疫沈降させることができる。

【0084】

ヒト樹状細胞免疫受容体は、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、またはヒトを免疫してポリクローナル抗体を産生させるのに使用できる。所望により、ヒト樹状細胞免疫受容体は、担体タンパク質、例えば牛血清アルブミン、チログロブリン、およびスカシガイヘモシアニンとコンジュゲートさせることができる。宿主の種に応じて、免疫学的反応を増大させるために種々のアジュバントを使用できる。このようなアジュバントは、フロイントアジュバント、鉍物性ゲル（例えば水酸化アルミニウム）、および界面活性物質（例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、およびジニトロフェノール）を包含するがこれらに限定されない。ヒトに使用するアジュバントの中ではBCG (*Bacillus Calmette - Guerin*) および *Corynebacterium parvum* が特に有用である。

【0085】

ヒト樹状細胞免疫受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養中の連続的細胞系により抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いて調製できる。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術があるがこれらに限定されない (Kohlerら、*Nature* 256, 495-497, 1985; Kozborら、*J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Coteら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Coleら、*Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984)。

【0086】

さらに、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライシングして適当な抗原特異性と生物活性を持つ分子を得る、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術が利用できる (Morrissonら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neubergerら、*Nature* 312, 604-608, 1984; Takedaら、*Nature* 314, 452-454, 1985)。モノクローナルおよびその他の抗体はまた、これを治療に使用した場合に患者が該抗体に対する免疫反応を起こすのを防ぐため、「ヒト化」することができる。このような抗体は、治療に直接使用できるほど配列が充分ヒトに類似しているかも知れず、または幾つかの重要残基の変更を必要とするかも知れない。齧歯類の抗体とヒト配列の間の配列相違は、個々の残基の位置指定突然変異誘発により、または相補性決定領域全体の格子により、ヒト配列内の残基と相違する残基を置き換えることによって最小化することができる。別法として、ヒト化抗体はGB2188638Bに記載のように組換え法を用いて調製できる。ヒト樹状細胞免疫受容体に特異的に結合する抗体は、U.S. 5565332に開示のように、部分的または完全にヒト化した抗原結合部位を含むことができる。

【0087】

これに代わり、当分野で既知の方法を用いて、一本鎖抗体の調製のために記載した技術を適合させ、ヒト樹状細胞免疫受容体に特異結合する一本鎖抗体を調製することができる。関連する特異性を持つが別個のイデオタイプ組成を有する抗体を、無作為組み合わせ免疫グロブリンライブラリーから鎖シャフリングによって調製することができる (Burt

10

20

30

40

50

on, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 11120-23, 1991)。

【0088】

一本鎖抗体はまた、ハイブリドーマcDNAを鋳型に用いて、PCRのようなDNA増幅法を用いて組み立てることができる(Thirionら、1996, Eur. J. Cancer Prev. 5, 507-11)。一本鎖抗体は単一または二重特異性であり得、また、二価または四価であり得る。四価二重特異性一本鎖抗体の組み立ては例えばColoma & Morrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 159-63に教示されている。二価二重特異性一本鎖抗体の組み立てはMallender & Voss, 1994, J. Biol. Chem. 269, 199-206に 10

【0089】

下記のように、一本鎖抗体をコードしているヌクレオチド配列を手動または自動ヌクレオチド合成を用いて組み立て、標準的組換えDNA法を用いて発現構築物中にクローニングし、そして細胞中に導入してコード配列を発現させることができる。別法として、一本鎖抗体を、例えば糸状ファージ技術を用いて直接調製することもできる(Verhaarら、1995, Int. J. Cancer 61, 497-501; Nichollら、1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91)。

【0090】

ヒト樹状細胞免疫受容体に特異結合する抗体はまた、リンパ球集団においてインビボ産生を誘導することによって、または、文献に開示されている極めて特異的な結合試薬のパネルまたは免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって調製することもできる(Orlandiら、Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winterら、Nature 349, 293-299, 1991)。

【0091】

その他の型の抗体を、本発明方法において組み立て、治療に使用することができる。例えば、WO93/03151に開示のように、キメラ抗体を組み立てることができる。免疫グロブリンから誘導され多価且つ多重特異的である結合タンパク質、例えばWO94/13804に記載の「diabodies」もまた調製できる。 30

【0092】

本発明に係る抗体は当分野で周知の方法により精製できる。例えば、抗体は、ヒト樹状細胞免疫受容体が結合しているカラムを通過させることにより親和精製できる。次いで、結合した抗体を、高い塩濃度の緩衝液を用いてカラムから溶出することができる。

【0093】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のDNAまたはRNA配列に対し相補的なヌクレオチド配列である。いったん細胞中に導入されるとこの相補的ヌクレオチドは、該細胞が産生した天然配列と結合して複合体を形成し、転写または翻訳のいずれかを遮断する。好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも11ヌクレオチド長であるが、 40
少なくとも12、15、20、25、30、35、40、45、若しくは50またはそれ以上のヌクレオチド長であってもよい。より長い配列もまた使用できる。アンチセンスオリゴヌクレオチド分子をDNA構築物に提供し、上記のように細胞中に導入して、その細胞におけるヒト樹状細胞免疫受容体遺伝子産物のレベルを低下させることができる。

【0094】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはこの両者の組み合わせであってよい。オリゴヌクレオチドは、1つのヌクレオチドの5'末端を、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホノチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロアミデート、燐酸エステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシメチルエステル、カルボネート、および燐 50

酸トリエステルといった非ホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する別のヌクレオチドの3'末端と共有結合させることにより、手動で、または自動合成機によって合成できる。Brown, Meth. Mol. Biol. 20, 1-8, 1994; Sonveaux, Meth. Mol. Biol. 26, 1-72, 1994; Uhlmannら、Chem. Rev. 90, 543-583, 1990を参照されたい。

【0095】

ヒト樹状細胞免疫受容体遺伝子の制御、5'、または調節領域と二本鎖を形成するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することにより、ヒト樹状細胞免疫受容体遺伝子発現の修飾が得られる。転写開始部位、例えば開始部位から-10および+10位の間から誘導されるオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、「三重らせん」塩基対合法を用いて阻害を達成できる。三重らせん対合は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子またはシャペロンの結合に対して十分に開くという能力の阻害を引き起こすため、有用である。三本鎖DNAを用いる治療上の進歩が文献に記載されている(例えばGeerら、Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994)。転写物がリボソームに結合するのを防ぐことによりmRNAの翻訳を遮断するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた設計できる。

10

【0096】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドの相補配列との間に好結果の複合体を形成させるためには、正確な相補性は必要ない。例えばヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドに対し正確に相補的である2、3、4、若しくは5またはそれ以上の長さの連続するヌクレオチドを含み、その各々が、隣接するヒト樹状細胞免疫受容体ヌクレオチドとは相補的ではない連続するある長さのヌクレオチドによって隔てられているアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒト樹状細胞免疫受容体mRNAに対して十分な標的化特異性を提供できる。好ましくは、相補的な連続ヌクレオチドの長さはそれぞれ少なくとも4、5、6、7若しくは8またはそれ以上のヌクレオチド長である。非相補的な介在配列は、好ましくは1、2、3、または4ヌクレオチド長である。当業者は、アンチセンス-センスの対の算出融点を容易に使用して、特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドと特定のヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチド配列間で寛容されるミスマッチの程度を決定できるであろう。

20

30

【0097】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドとハイブリダイズする能力に影響を及ぼすことなく修飾できる。これらの修飾は該アンチセンス分子の内部、または一端若しくは両端である。例えば、ヌクレオシド間の燐酸結合は、アミノ基と末端リボースの間にいるいるな数の炭素残基を有するコレステリルまたはジアミン部分を加えることによって修飾できる。修飾された塩基および/または糖、例えばリボースの代わりにアラビノース、または3'ヒドロキシ基または5'燐酸基が置換されている3', 5'-置換オリゴヌクレオチドもまた修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドに使用できる。これらの修飾オリゴヌクレオチドは当分野で周知の方法により調製できる。例えば、Agrawalら、Trends Biotechnol. 10, 152-158, 1992; Uhlmannら、Chem. Rev. 90, 543-584, 1990; Uhlmannら、Tetrahedron. Lett. 215, 3539-3542, 1987を参照されたい。

40

【0098】

リボザイム

リボザイムは触媒活性を有するRNA分子である。例えば、Cech, Science 236, 1532-1539; 1987; Cech, Ann. Rev. Biochem. 59, 543-568; 1990, Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 605-609; 1992, Couture & Stinchcomb, Trends Genet. 12, 510-515, 1996を参照されたい

50

。当分野で知られるように、リボザイムは、RNA配列を開裂することにより遺伝子機能を阻害するのに使用できる（例えば、Haseloffら、米国特許5641673）。リボザイムの作用機構は、相補的標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後のエンドヌクレオ分解的（endonucleolytic）開裂を含む。例には、特異的ヌクレオチド配列のエンドヌクレオ分解的な開裂を特異的且つ効果的に触媒できる、設計されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子がある。

【0099】

ヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドのコード配列を用いて、ヒト樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドから転写されたmRNAに特異結合するリボザイムを作製できる。他のトランスのRNA分子を極めて配列特異的に開裂できるリボザイムを設計し組み立てる方法が開発され、当分野で記載されている（Haseloffら、Nature 334, 585-591, 1988）。例えば、リボザイムの開裂活性は、別個の「ハイブリダイゼーション」領域を該リボザイム中に組み入れることによって、特定のRNAを標的とさせることができる。このハイブリダイゼーション領域は標的RNAに対し相補的な配列を含んでおり、したがってその標的と特異的にハイブリダイズする（例えばGerlachら、EP321201を参照されたい）。

10

【0100】

ヒト樹状細胞免疫受容体RNA標的内部の特異的リボザイム開裂部位は、この標的分子を、以下の配列：GUA、GUU、およびGUCを包含するリボザイム開裂部位についてスキャンすることにより同定できる。同定できたならば、該開裂部位を含む標的RNAの領域に対応する、15および20の間のリボヌクレオチドを有する短いRNA配列を、標的を非機能的にし得る二次構造の特徴について評価できる。さらに、候補のヒト樹状細胞免疫受容体RNA標的の適合性を、リボヌクレアーゼ防護検定を用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する利用可能性を試験することによって評価できる。より長い相補配列を用いて、標的に対するハイブリダイゼーション配列の親和性を増大させることができる。リボザイムのハイブリダイズおよび開裂する領域は、相補領域を介して標的RNAにハイブリダイズする時、リボザイムの触媒領域が標的を開裂し得るといったように、完全に相関している。

20

【0101】

リボザイムはDNA構築物の一部として細胞内に導入できる。マイクロ注入、リボソーム媒介トランスフェクション、電気穿孔、または燐酸カルシウム沈殿といった機械的方法を用いて、ヒト樹状細胞免疫受容体発現の低下が望まれる細胞中にリボザイム含有DNA構築物を導入することができる。これとは別に、細胞がDNA構築物を安定的に保持することが望まれる場合は、該構築物をプラスミド上で供給し、当分野で知られるように、別個の要素として維持するか、または細胞のゲノム中に組み込むことができる。リボザイムコード化DNA構築物は、細胞中のリボザイムの転写を調節するために、プロモーター要素、エンハンサーまたはUAS要素、および転写ターミネーターシグナルといった転写調節要素を含み得る。

30

【0102】

リボザイムはDNAの構築物するとともに細胞へ導入することができた。顕微鏡下注射、リボソームを媒介としたトランスフェクション、エレクトロポレーションあるいはリン酸カルシウム沈殿のような機械的方法はリボザイムを含んでいるDNAを導入するために使用することができた。構築物を、それがスフィンゴシンを減少させると望まれる細胞へ、キナーゼ様蛋白質を発現させる。二者択一で、細胞が安定してDNAを保持することが望まれる場合、構築する、それはプラスミド上で供給することができ、個別の要素として維持する。あるいは当分野で知られている細胞のゲノムへ統合される。DNA、構築する、細胞のリボザイムの転写のコントロールのためにプロモーター要素、エンハンサー、UAS要素、およびターミネーターシグナルのような規定する要素を含むことができた。

40

【0103】

Haseloffら、米国特許5641673に教示のように、リボザイムは、標的遺伝

50

子の発現を誘導する因子に応答してリボザイムの発現が起こるように設計することができる。リボザイムはまた、追加レベルの調節を提供するよう設計でき、その結果、mRNAの破壊はリボザイムと標的遺伝子の両者が細胞に誘導された時にのみ起こる。

【0104】

示差的に発現した遺伝子

産物が蛋白質キナーゼのようなヒトスフィンゴシンと対する遺伝子の同定用方法はここに記述される。そのような遺伝子は、含んでいる障害で示差的に発現されるが、制限されない遺伝子を発現し得る、癌、アレルギーを含んでいるが喘息、中枢障害および末梢神経系障害また自己免疫疾患に制限されていなかった。さらに、そのような遺伝子は、そのような疾病の進行か治療に適切な操作に応じて差別的に調節される遺伝子を発現し得る。さらに、そのような遺伝子は増加し、一時的に調節された発現を行っているかもしれないか、あるいは組織か有機物の異なる段階で減少する。示差的に発現された遺伝子は、さらにコントロール対実験の条件の下でその発現を調節し得る。さらに、ヒトスフィンゴシン、キナーゼ様遺伝子あるいは遺伝生成物それ自体差異の発現に関して試験する。

10

【0105】

病気の状態において発現が異なる程度は、差異のディスプレイ技術のような標準の特性を記述する技術によって視覚化されるように単に十分に大きい必要がある。発現差が視覚化されるかもしれないような他の標準の特性記述技術としては量的RT、PCR（逆転写酵素）、またノーザン分析が含まれるがこれに制限されない。

【0106】

示差的発現した遺伝子の同定

示差的発現した遺伝子の同定示差的に発現された遺伝子を同定するために、RNAあるいは総rmRNAを目的組織から分離する。例えば、RNAサンプルは、実験の組織およびコントロールの対応組織から得られる。mRNA分離に対して選択しないどんなRNA隔離技術もそのようなRNAサンプルの精製のために利用し得る（例えばAusubel et al., ed. "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993）。多くの組織サンプルは、例えばChomczynski, U.S. 特許4,843,155の単一のステップのRNA隔離プロセスのように、当業者に周知の技術を使用して、容易に処理される。

20

30

【0107】

示差的に発現された遺伝子によって酸性されたRNAを集めたRNAサンプル内の記録は、当業者に周知の方法によって同定される。それらは例えば、差異ふるい分け（Teder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 208-12, 1988）をがふくまれる。Sci. U.S.A. 85, 208-12, 1988年、ハイブリダイゼーション（Hedrick et al., Nature 308, 149-53; Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 2825, 1984）および示差的ディスプレイ（Liang & Pardee, Science 257, 967-71, 1992; U.S. Patent 5,262,311）特許5,262,311が含まれる。

40

【0108】

それ自体、ヒトスフィンゴシンを含む病気の治療用の適切な方法を示唆する、キナーゼ様蛋白質。例えば、処理は、示差的に発現された遺伝子および（または）蛋白質キナーゼのようなヒトスフィンゴシンをコード化する遺伝子の発現の調節を含んでいるかもしれない。示差的発現の情報は示すかもしれない、かどうか、発現か活性、その、示差的に発現された遺伝子か遺伝生成物、あるいは遺伝子か遺伝生成物キナーゼのようなヒトスフィンゴシンは上の調節されるか下方調節される。

【0109】

スクリーニング方法

本発明は、調節物質、即ち、それはスフィンゴシンにキナーゼ様蛋白質ポリペプチドある

50

いはポリヌクレオチドを結合、または、例えばスフィンゴシンの発現あるいは活性に刺激のか抑制する効果があるする候補または試験化合物を同定する方法を提供する。被験化合物は樹状細胞免疫受容体ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する。より好ましくは、被験化合物は、樹状細胞免疫受容体活性を、被験化合物の不在時に比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下または増大させる。

【0110】

被験化合物

被験化合物は当分野で既知の薬理的物質であってよく、または薬理活性を持っていることが前もって分かっている化合物であってよい。この化合物は天然に存在する、または実験室で設計されたものであってよい。これらは、微生物、動物、または植物から単離されたものであってよく、そして組換え的に調製され、または当分野で既知の化学的方法により合成されたものであってよい。所望により被験化合物は、生物学的ライブラリー、空間的アドレス特定可能な並行固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを要する合成ライブラリー法、「一ビーズ化合物」ライブラリー法、および親和クロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を包含する（但しこれらに限定される訳ではない）当分野で既知の数多くの組み合わせライブラリー法のいずれかを用いて取得できる。生物学的ライブラリーアプローチはポリペプチドライブラリーに限定されているが、他の4種のアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用できる。Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997を参照されたい。

10

20

【0111】

分子ライブラリーの合成法は当分野でよく知られている（例えば、DeWittら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erbら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermannら、*J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Choら、*Science* 261, 1303, 1993; Carellら、*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carellら、*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallopら、*J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994を参照されたい）。化合物のライブラリーは溶液で（例えば、Houghten, *Biotechniques* 13, 412-421, 1992）、またはビーズ（Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991）、チップ（Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993）、細菌または孢子（Ladner, 米国特許5223409）プラスミド（Cullら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992）、またはファージ（Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990); Cwirllaら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; およびLadner, 米国特許5223409)上に提供できる。

30

40

【0112】

ハイスループットスクリーニング

被験化合物は、高（ハイ）スループットスクリーニングを用いて、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する能力、または樹状細胞免疫受容体活性若しくは樹状細胞免疫受容体遺伝子発現に影響を及ぼす能力についてスクリーニングできる。ハイスループットスクリーニングを使用して、多くの個別的化合物を並行して試験でき、その結果多数の被験化合物を迅速にスクリーニングできる。最も広範に確立されている技術は96ウェル微量定量プレートを利用するものである。この微量定量プレートのウェルは、典型的には50から500 μ lの範囲の検定容量を必要とする。このプレートに加えて、96ウェルフォーマットに適合させた多くの機器、材料、ピペット、ロボット、プレ

50

ート洗浄機、およびプレート読み取り機が市販されている。

【0113】

別法として、「自由フォーマット検定」、または試料間に物理的障壁を持たない検定が使用できる。例えば、組み合わせペプチドライブラリーのための、単純な均質検定で色素細胞（メラノサイト）を用いる検定が、Jayawickremeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19, 1614-18 (1994)に記載されている。ペトリ皿中のアガロースの下にこの細胞を入れ、次いで組み合わせ化合物を伴っているビーズをアガロースの表面に載せる。組み合わせ化合物はこのビーズから化合物を部分的に放出する。化合物がゲルマトリックス中へと局所的に拡散するにつれて活性化化合物が細胞の色の变化を惹起するため、活性化化合物を暗色色素領域として視覚化することができる。

10

【0114】

自由フォーマット検定のもう一つの例は、生体分子スクリーニング学会第1回年次総会（Philadelphia, Pa., 1995年11月7-10日）で報告されたChelsky、「組み合わせライブラリーのスクリーニングのための戦略：新規な、そして伝統的なアプローチ」により記載されている。Chelskyは、カルボニックアンヒドラーゼのための単純な均質酵素検定をアガロースゲルの内部に入れ、その結果ゲル中の酵素がゲル全体に色の变化を惹起するようにさせた。その後、光リンカーを介して組み合わせ化合物を持つビーズをゲル内部に入れ、すると該化合物はUV光により部分的に放出された。酵素を阻害する化合物は、色の变化がより少ない局所阻害領域として観察された。

20

【0115】

さらに別の例がSalmonら、Molecular Diversity 2, 57-63 (1996)に記載されている。この例では、組み合わせライブラリーを、寒天中で生育する癌細胞への細胞毒性効果を有する化合物についてスクリーニングした。

【0116】

もう一つのハイスルーブットスクリーニング法がBeutelら、米国特許5976813に記載されている。この方法では、被験試料を多孔性マトリックスに入れる。次に1またはそれ以上の検定成分を、マトリックス、例えばゲル、プラスチックシート、フィルター、またはその他の形の容易に操作できる固体担体の内部、上、または底に入れる。試料がこの多孔性マトリックスに導入されるとこれらは充分ゆっくりと拡散し、その結果、被験試料が混ざらずに検定が遂行できる。

30

【0117】

結合検定

結合検定について、被験化合物は、例えば本酵素のATP/GTP結合部位または樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの活性部位に結合してこれを占有する結果、正常な生物活性を妨げるような、小分子であることが好ましい。このような小分子の例は、小ペプチドまたはペプチド様分子を包含するが、これらに限定される訳ではない。

【0118】

結合検定では、被験化合物または樹状細胞免疫受容体ポリペプチドのいずれかが検出可能な標識、例えば蛍光、放射性同位元素、化学ルミネセント、または酵素標識（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼ）を含むことができる。そこで、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドに結合している被験化合物の検出は、例えば放射能の放出を直接計数することにより、またはシンチレーション計数により、または検出可能産物への適当な基質の変換を測定することにより、達成できる。

40

【0119】

別法として、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドへの被験化合物の結合を、反応体のいずれをも標識せずに測定することができる。例えば、マイクロフィジオメーターを用いて、被験化合物と樹状細胞免疫受容体ポリペプチドとの結合を検出できる。マイクロフィジオメーター（例えばサイトセンサーTM）とは、細胞がその環境を酸性化する速度を光アドレッシابل電位差センサー（LAPS）を用いて測定する分析機器である。この酸性化速度

50

の変化は、被験化合物と樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの相互作用の指標として使用できる (McConnellら、Science 257, 1906-1912, 1992)。

【0120】

被験化合物が樹状細胞免疫受容体ポリペプチドに結合する能力の測定はまた、実時間 Bimolecular Interaction Analysis (BIA) のような技術を用いて達成できる (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338-2345, 1991、および Szaboら、Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705, 1995)。BIAは、いかなる反応体をも標識せずに、生体特異的相互作用を実時間で研究するための技術である (例えば BIAcore (登録商標))。光学的現象表面プラズモン共鳴 (SPR) の変化を、生体分子間の実時間反応の指標に使用できる。

10

【0121】

本発明のさらに別の態様では、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドを二ハイブリッド検定または三ハイブリッド検定 (例えば、米国特許 5283317; Zervosら、Cell 72, 223-232, 1993; Maduraら、J. Biol. Chem. 268, 12046-12054, 1993; Bartelら、Biotechniques 14, 920-924, 1993; Iwabuchiら、Oncogene 8, 1693-1696, 1993; および Brent WO94/10300) における「おとりタンパク質」として使用し、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドに結合またはこれと相互作用してその活性を調節する他のタンパク質を同定することができる。

20

【0122】

二ハイブリッド系は殆どの転写因子のモジュラー的性格に基づくものであり、それは、分離可能な DNA 結合および活性化ドメインから成っている。簡潔に述べると、この検定は二種の異なる DNA 構築物を利用する。例えば、一方の構築物においては、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドが、既知の転写因子の DNA 結合ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる (例えば GAL-4)。別の構築物においては、未同定タンパク質 (「餌」または「試料」) をコードしている DNA 配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる。もし「おとり」および「餌」タンパク質がインピボで相互作用してタンパク質依存複合体を形成できたならば、該転写因子の DNA 結合および活性化ドメインは極めて近位に招来される。この近位性が、転写因子に応答する転写調節部位と機能的に結合しているリポーター遺伝子 (例えば LacZ) の転写を可能にする。リポーター遺伝子の発現が検出でき、機能的転写因子を含む細胞コロニーを単離し、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと相互作用するタンパク質をコードしている DNA 配列取得に使用することができる。

30

【0123】

反応体の一方または両方の非結合型からの結合型の分離を促進するため、そして検定の自動化の便宜を図るため、樹状細胞免疫受容体ポリペプチド (またはポリヌクレオチド) または被験化合物のいずれかを固定化することが望ましいかも知れない。したがって、樹状細胞免疫受容体ポリペプチド (またはポリヌクレオチド) または被験化合物のいずれかを固体支持体に結合させることができる。好適な固体支持体は、ガラスまたはプラスチックスライド、組織培養プレート、微量定量ウェル、管、シリコンチップ、またはビーズ (ラテックス、ポリスチレン、またはガラスビーズを包含するがこれらに限定されない) のような粒子を包含するがこれらに限定されない。共有および非共有結合、受動吸収、またはそれぞれポリペプチド (またはポリヌクレオチド) または被験化合物に付着させた結合部分と固体支持体の対、の使用を包含する、当分野で既知の任意の方法を用いて樹状細胞免疫受容体ポリペプチド (またはポリヌクレオチド) または被験化合物を固体支持体に付着させることができる。被験化合物は好ましくは整列して固体支持体に結合させ、その結果個々の被験化合物の位置を追跡することができる。樹状細胞免疫受容体ポリペプチド (またはポリヌクレオチド) への被験化合物の結合は、反応体を入れるのに適した任意の容器

40

50

で達成できる。かかる容器の例には微量定量プレート、試験管、および微量遠沈管がある。

【0124】

一つの態様において、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドは、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドを固体支持体に結合させるドメインを含む融合タンパク質である。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) 上またはグルタチオン誘導体化微量定量プレート上に吸着させ、次いでこれを被験化合物または被験化合物および非吸着樹状細胞免疫受容体ポリペプチドに合し; 次にこの混合物を複合体形成が行われる条件下でインキュベートする (例えば、塩および pH に関して生理的条件)。インキュベーションの後、ビーズまたは微量定量プレートのウェルを洗浄して未結合成分を除去する。反応体の結合は上記のように直接的または間接的に測定できる。別法として、複合体を固体支持体から解離させた後に結合を測定することもできる。本発明に係るスクリーニング検定には、タンパク質またはポリヌクレオチドを固体支持体上に固定化するためのその他の技術を使用することもできる。例えば、樹状細胞免疫受容体ポリペプチド (またはポリヌクレオチド) または被験化合物のいずれかを、ビオチンとストレプトアビジンのコンジュゲーションを利用して固定化できる。当分野で周知の技術 (例えばビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) を用いて、ビオチニル化した樹状細胞免疫受容体ポリペプチド (またはポリヌクレオチド) または被験化合物をビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製し、ストレプトアビジン被覆した96ウェルプレート (Pierce Chemical) のウェルに固定化できる。別法として、樹状細胞免疫受容体ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または被験化合物に特異的に結合するが、所望の結合部位、例えば ATP/GTP 結合部位または樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの活性部位に干渉しない抗体をプレートのウェルに誘導体化することができる。未結合の標的またはタンパク質が抗体コンジュゲーションによりウェル中に捕捉できる。

10

20

【0125】

GST-固定化複合体について上に記載した方法に加え、このような複合体を検出する方法には、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドまたは被験化合物に特異結合する抗体を用いる、複合体の免疫検出、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの活性検出へと引き継がれる酵素結合検定、および非還元条件下での SDS ゲル電気泳動がある。

30

【0126】

樹状細胞免疫受容体ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する被験化合物を求めるスクリーニングは、無傷の細胞で実施することもできる。樹状細胞免疫受容体ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む任意の細胞が、細胞に基づく検定系で使用できる。樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドは細胞中に天然に存在し、または上記のような技術を用いて導入できる。樹状細胞免疫受容体ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合は、上記のように測定する。

【0127】

酵素検定

ヒト樹状細胞免疫受容体ポリペプチドのセリンプロテアーゼ活性を増大または低下させる能力について、被験化合物を試験できる。酵素検定は、精製樹状細胞免疫受容体ポリペプチド、細胞膜調製物または無傷の細胞と、被験化合物とを接触させた後に実施できる。樹状細胞免疫受容体ポリペプチドのトランスケトララーゼ活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90または100%低下させる被験化合物を、樹状細胞免疫受容体活性を低下させる可能性のある治療物質として同定する。ヒト樹状細胞免疫受容体ポリペプチドのセリンプロテアーゼ、好ましくはセリンプロテアーゼトリプシン活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90または100%増大させる被験化合物を、ヒト樹状細胞免疫受容体活性を増大させる可能性のある治療物質として同定する。

40

50

【0128】

遺伝子発現

別の態様では、樹状細胞免疫受容体遺伝子の発現を増大または減少させる被験化合物を同定する。樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドを被験化合物と接触させ、RNAまたは樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドのポリペプチド産物の発現を測定する。被験化合物存在下での適当なmRNAまたはポリペプチドの発現レベルを、該被験化合物不在下でのmRNAまたはポリペプチドの発現レベルと比較する。すると被験化合物が、この比較に基づく発現のモジュレーターとして同定できる。例えば、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により大きい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現の刺激物質または増強物質と同定する。そうではなく、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により小さい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現のインヒビターと同定する。

10

【0129】

細胞における樹状細胞免疫受容体mRNAまたはポリペプチド発現のレベルは、mRNAまたはポリペプチドを検出するための当分野で周知の方法により決定できる。定性または定量的方法のいずれかが使用できる。樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドのポリペプチド産物の存在は、例えばラジオイムノアッセイのような免疫化学的方法、ウエスタンブロッティング、および免疫組織化学を包含する、当分野で周知の様々な技術を用いて決定できる。別法として、ポリペプチド合成は、樹状細胞免疫受容体ポリペプチド内への標識アミノ酸の取り込みを検出することにより、インビボで、細胞培養で、またはインビトロ翻訳系で決定できる。

20

【0130】

このようなスクリーニングは、無細胞検定系または無傷の細胞のいずれかで実施できる。樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドを発現するいかなる細胞も細胞に基づく検定系で使用できる。樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチドは細胞内に天然に存在するか、または上記のような技術を用いて導入することができる。一次培養または確立された細胞系、例えばCHOまたはヒト胚性腎293細胞のいずれかを使用できる。

【0131】

医薬組成物

本発明はさらに、治療効果を達成するために患者に投与できる医薬組成物を提供する。本発明に係る医薬組成物は、例えば樹状細胞免疫受容体ポリペプチド、樹状細胞免疫受容体ポリヌクレオチド、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドに特異的に結合する抗体、または類似体、樹状細胞免疫受容体ポリペプチド活性のアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターを含み得る。この組成物は単独で、または少なくとも1種類の他の物質、例えば安定化化合物と組み合わせて投与でき、これは、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、および水を包含する（但しこれらに限定されない）任意の無菌で生物学的適合性のある製薬的担体中で投与できる。この組成物は単独で、または他の物質、薬物またはホルモンと組み合わせて患者に投与できる。

30

【0132】

活性成分に加えて、これらの医薬組成物は、賦形剤および補助物質を含む適当な製薬的に許容し得る担体を含有でき、これらは、製薬的に使用できる調製物への活性化合物の処理を促進する。本発明に係る医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下、または直腸手段を包含する（但しこれらに限定されない）多くの経路により投与できる。経口投与用医薬組成物は、当分野で既知の製薬的に許容し得る担体を用いて経口投与に適した用量に調合できる。このような担体により、該医薬組成物を、患者が内服するための錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などに調合できる。

40

【0133】

経口使用のための医薬製剤は、活性化合物を、固体賦形剤と合し、得られた混合物を所望により粉碎し、そしてこの顆粒混合物を、所望ならば適当な補助物質を加えた後に処理し

50

て錠剤または糖衣剤核を得る。好適な賦形剤は炭水化物またはタンパク質増量剤、例えば乳糖、シュクロース、マンニトール、またはソルビトールを包含する糖；トウモロコシ、小麦、米、馬鈴薯、またはその他の植物由来の澱粉；細胞ロース、例えばメチル細胞ロース、ヒドロキシプロピルメチル細胞ロース、またはカルボキシメチル細胞ロースナトリウム；アラビアゴムおよびトラガカントゴムを包含するゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質である。所望により崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加できる。

【0134】

糖衣剤核は、濃縮糖溶液のような適当な被覆剤と共に使用でき、これはさらに、アラビア 10
 ゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、carbopolゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含むことができる。製品の同定のためまたは活性化化合物の量、即ち用量をあらわすために染料または色素を錠剤または糖衣被覆剤に添加できる。

【0135】

経口的に使用できる医薬調合物は、ゼラチン製の押しではめ込むカプセル剤、ならびに、ゼラチンおよび被覆剤、例えばグリセロールまたはソルビトールでできた軟封入カプセル剤を包含する。押しではめ込むカプセル剤は、活性成分を、乳糖または澱粉のような増量剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および所望により安定剤と混合して含有できる。軟カプセル剤では、活性化化合物を、安定剤を加えたまたは加えない適当な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁できる。 20

【0136】

非経口投与に好適な医薬製剤は、水溶液、好ましくは生理学的適合性の緩衝液、例えばハ 30
 ンクス溶液、リンゲル溶液、または生理学的に緩衝化した食塩水中で調合できる。水性注射用懸濁剤は、該懸濁液の粘度を増加させる物質、例えばカルボキシメチル細胞ロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有できる。さらに、活性化化合物の懸濁剤は適当な油性注射用懸濁剤として調製できる。好適な親油性溶媒または媒質は、胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを包含する。非脂質ポリカチオンアミノポリマーもまた送達に使用できる。所望により懸濁剤は、化合物の溶解性を増し高濃縮溶液の調製を可能にするような適当な安定剤または物質を含むことができる。局所または鼻腔投与のためには、透過すべき特定の障壁に対し適当な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は当分野で一般に知られている。

【0137】

本発明に係る医薬組成物は当分野で既知の方法で、例えば常套的混合、溶解、顆粒化、糖衣剤製造、すりつぶし、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥プロセスによって製造できる。この医薬組成物は塩として提供でき、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、琥珀酸などを包含する（但しこれらに限定されない）多くの酸を用いて調製できる。塩は、水性または他のプロトン性溶媒において、対応する遊離塩基型よりもより可溶性の傾向がある。別の場合には、好ましい調製物は、pH範囲4.5から5.5において以下のもの：1-50mMヒスチジン、0.1%-2%シュクロース、および2-7%マンニトール、の全てまたは任意のものを含有できる凍結乾燥粉末であってよく、これを使用前に緩衝液と合する。 40

【0138】

調合と投与のための技術のさらなる詳細は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa)の最新版に見出すことができる。医薬組成物を製造した後、これらを適当な容器に入れ、適応状態の治療のためにラベルを貼る。このようなラベル表示は、投与の量、頻度、および投与方法を包含する。 50

【 0 1 3 9 】

治療上の適応および方法

ヒト樹状細胞免疫受容体を調節して、ガン、喘息、肥満症、糖尿病、CNS障害、および心臓血管障害を処置することができる。

癌は、基本的に発癌性細胞形質転換によって発症する疾患である。形質転換細胞をそれらの正常な対応物から区別し、かつ癌の病態生理に基づく形質転換細胞の特徴は幾つかある。それらには、非制御型細胞性増殖、通常の死誘導シグナルに対する不応答（不死化）、増大した細胞運動性及び侵襲性、新たな血管新生の誘導を通じた血液供給を補充するための増大した能力（血管新生）、遺伝子の不安定性、並びに調節不全遺伝子発現が挙げられる。薬剤耐性の獲得とともに、これらの異常な生理機能の種々の組み合わせにより、最終的に臓器不全および患者の死となる難治性疾患状態に頻繁に陥る。

10

【 0 1 4 0 】

最も一般的な癌治療は、細胞増殖を標的とし、形質転換細胞と正常細胞との間の効率に関するその特異な増殖能に基づいている。このアプローチは、幾つかの重要な正常細胞タイプもまた高増殖であり、かつ癌細胞が高頻度にこれらの物質に対して耐性となるという現実により妨げられている。従って、従来の抗癌治療についての治療指数は珍しく2.0を超えている。

【 0 1 4 1 】

ゲノクス誘導性分子の標的同定は、癌患者に安全で、かつより効率的な処置を提供できる治療介入のための新たな癌特異的標的を同定する可能性を開いた。従って、新たに発見される腫瘍関連遺伝子及びその産物を疾患におけるそれらの機能（群）について試験でき、そして革新的な治療を発見し、かつ開発するために道具として用いることができる。以上に概説した生理学的プロセスの多くに重要な働きがある遺伝子は、癌標的として特徴付けることができる。

20

【 0 1 4 2 】

ゲノクスによって同定された遺伝子あるいは遺伝子破片は機能的な組換え蛋白質を生産するために1つ以上の異種起源の発現系で容易に発現させることができる。これらの蛋白質は、それらの生化学的特性のために生体外で特徴づけられ、次に、それらの生化学的活性の化学的モジュレーターを同定するためのハイスループット分子スクリーニングプログラムにおけるツールとして使用する。標的タンパク質活性のアゴニストおよび/またはアンタゴニストは、この方法で同定し、そして細胞および*in vivo*疾患モデルにおいて抗癌活性に関して試験することができる。生物学的モデルおよび詳細な薬物動学的および毒物学的分析は、医薬の開発およびさらにヒトにおける試験のための基礎を形成する。

30

【 0 1 4 3 】

アレルギー、アナフィラキシー、喘息および炎症 アレルギーは、アレルゲンに応じて免疫グロブリンE（免疫グロブリンE）抗体の生産である。アレルゲンへの接触に際して、反応する個人のB細胞はアレルゲンに特有の免疫グロブリンE分子を分泌する。免疫グロブリンE分子は、マスト細胞と好塩基性細胞上で存在する高い類似免疫グロブリンE受容体（FcRI）に結合する。

40

免疫グロブリンE結合は、アレルギーと炎症性のレスポンスを促進する様々な血管に作用するメディエーターの放出を活性化する。アレルゲン分子をには形成する境界免疫グロブリンE分子によって2つ以上のFcRIsが架橋される場合は常に、活性化が生じる。そのような集合体は、細胞質の小粒および鉛板からプロスタグランジン、ロイコトリエン、サイトカニンおよび過敏反応の他のエフェクターの合成にヒスタミンとプロテアーゼを放出する、生化学のカスケードを開始する。

【 0 1 4 4 】

喘息および他の炎症性の疾病の病因において重要であり得る。洗浄流体中のSPPレベルの著しい高台は分節の抗原投与に続く喘息において観察された。SPP（それ自体あるいはPDGFを備えた共同作用の中で）もIL-6生産を調節するために報告された。さら

50

に、スフィンゴシンとS I . P . の間のバランスがマスト細胞の活性化には決定的であることが実証されました、細胞系、スフィンゴシンキナーゼIがそれらの刺激用の任意のスイッチの役割をするところで、多くの喘息の徴候の開始物質として関係している。スフィンゴシン・キナーゼ様蛋白質はジアシルグリセロールキナーゼのある点で2つの既知のスフィンゴシン・キナーゼと類似している、スフィンゴシン・キナーゼにD - トレオスフィンゴシンを燐酸化する能力を与えるために推定される、触媒現象の領域。しかしながら、それは、そのN - 末端でさらに相同 (P H) 領域を持っている点で、他の2つのスフィンゴシン・キナーゼと異なる (下記の図を参照) 。 P H は蛋白質を示すことで見つかった領域で、イノシトール・リン酸塩、G蛋白質のベータ / ガンマサブユニット、蛋白質の燐酸化されたSer / Thr 残留物および薄膜を結合する能力を含む多数の機能がある。キナーゼ様3つのヒトスフィンゴシン・キナーゼ、S P H K 1、S P H K 2およびスフィンゴシン、384、618のおよび537アミノ酸の蛋白質をそれぞれコード化する。長さの差に加えて、スフィンゴシン・キナーゼは、さらに組織分配の差を示す。3つの、スフィンゴシン、キナーゼ状、ほぼすべての組織で発現し、最も広い分配を持つように見える。しかしながら、顕著に、それが微小血管の内皮の細胞の中で最も高く発現される、ということ細胞系が身体全体にわたって分かった。これはそのスフィンゴシンをキナーゼ様およびより多くの、したがって、他のスフィンゴシン・キナーゼより、それらの付着分子発現、細胞から細胞の接触、サイトカニンおよび成長因子分泌、増殖および血管形成を調節して、内皮の細胞の活性化に重要な役割を果たしてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 5 】

自己免疫疾患の確立している治療は、炎症の最終の共通のあるいは免疫学のメディエーターのいずれかを阻止することを目的とする。両方のアプローチは非特異性で、したがって、筋骨の副作用、同化作用の副作用、神経学と結合組織副作用、免疫抑制、骨髄および胃腸の毒性、肝臓障害、肺疾病、過敏反応、聴覚障害、腎臓部の毒性 (皮膚と粘膜の毒性) のような厳しい副作用に関係する。R . Million et al . , Lancet 1 : 812 (1984) , J . A . Engelbrecht et al . , Arthritis and Rheumatism 26 : 1275 (1983) , G . W . Cannon et al . , Arthritis and Rheumatism 26 : 1269 (1983) , Simon and Mills , " Nonsteroidal anti-inflammatory Drugs , " N . Eng . J . Med . 302 : 1179 . (1980) , Katz et al . , Ann . Int . Med . 101 : 176 (1984) , W . F . Kean et al . , Arthritis and Rheumatism 23 : 158 (1980) . したがって、自己免疫疾患用の現在の治療は、重大な副作用の高い発生率に関係する。更に、いくつかの薬物治療は徴候的な救済を行うかもしれないが、多くの場合では、それらは著しく共同の破壊のような徴候の進行を修正しない。必要なものはより低い毒性を備えた、治療がよりよくであるそのようなもの、許容された、そして自己免疫疾患の治療に、より適切な有効な治療法である。S P P は Fas を媒介とした細胞死道を阻止すると示された。O . Cuvillier et al . , " Suppression of ceramide-mediated Programmed Cell Death By Sphingosine-1-phosphate , " Nature 381 : 800 (1996) を参照。したがって、蛋白質活性キナーゼのようなスフィンゴシンの阻止は、S P P の構成を防ぐことにより Fas 介在のアポトーシスの阻止を逆にする事への実行可能な方法である。S P P はスフィンゴシン・キナーゼの活性によってスフィンゴシンから生産される。S P P の正味の影響はセラミドを媒介とした細胞死の阻止である。したがって、スフィンゴシンの調節、キナーゼ様蛋白質は、例えば慢性関節リウマチ、全身エリテマトーである、墓の疾病、多発性硬化症 (M S) およびタイプのような自己免疫疾患を治療するか防ぐ方法を提供し得る。マスト細胞と好塩基性細胞は炎症の部位で蓄積し、活性化に際して、顆粒細胞 / マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン - 3 およびインターロイキン - 6 のような血液生成成長因子を分泌する。これらの要因は、好中球、マクロファージお

よびエオシン好性の細胞のような炎症性の細胞を補充し、活性化することにより、炎症性の反応が広まる。活性化された細胞は、進行中の炎症、腫瘍侵入、血管形成、繊維症および血栓症の領域で蓄積する。FcRIによる細胞の免疫グロブリンE依存の活性化は局所的な組織防御、組織維持および改変へ指図された、炎症性の反応および免疫調節 (Gagari, E. et al (1997) Blood 89: 2654-2663) に帰着する。

【0146】

糖尿病 糖尿病は心臓血管系で、血糖中の異常な高値、脂質および異常(併発症)の変更、目、腎臓および神経系によって特徴づけられた共通の代謝異常である。糖尿病は2つの別個の疾病に分類される: タイプ1糖尿病(若年性の発症)(それは、インシュリンを作り分泌する細胞の損失に起因する)およびタイプ2糖尿病(成人性の発症)(インシュリン分泌の欠陥およびインシュリン反応の欠陥によって引き起こされる)。

10

【0147】

タイプ1糖尿病は、膵臓の小島で細胞(細胞)を分泌するインシュリンを攻撃する、自己免疫の反応によって開始する。細胞の破壊が始まるS前にこの反応が生じるのを防ぐか、反応を止める試薬は、この疾病用の潜在的な治療である。ベータ細胞増殖および再生を引き起こす他の試薬はさらに潜在的な治療である。

【0148】

タイプII糖尿病は2つの糖尿病の条件(人口の6%)に共通する。インシュリン分泌の欠陥は糖尿病の条件の重要な原因で、適切に、インシュリン放出を備えた血糖レベルの上昇に検知して応答する細胞の無力化に起因する。細胞による反応をグルコースに増加させる治療は、この疾病の重要な新しい治療法を提示するであろう。

20

【0149】

タイプII糖尿病患者主題のインシュリン応答の欠陥は治療の介在の別の目標である。筋肉、肝臓および脂肪中のインシュリン受容体の活動を増加させる試薬は、血糖の減少および血しょう脂質の正常化を引き起こすでしょう。直接受容体を刺激するか、受容体からの細胞内の信号を増加させる試薬は受容体活動を増加させることができる。他の治療は、インシュリン状の結果を生成するために細胞の終了プロセス(つまりグルコース輸送、様々な酵素システム)を直接活性化することができる、したがって、1つの、有益な結果を重量超過の主題がタイプII糖尿病に対してより大きな感受性を有する体重を減少させるどんな試薬も可能な治療である。

30

【0150】

Iおよびタイプ糖尿病が扱うことができる両方の型のインシュリン応答を模倣する試薬あるいは血糖レベルの縮小により糖尿病の併発症を扱う。同様に、試薬、それは新しい血容器成長を縮小する、両方の疾病の中で発展する目併発症を扱うために使用することができる。

【0151】

治療されるかもしれないCNS病気は脳傷、脳血管性の疾病およびそれらの結果を含む、パーキンソン病、corticobasalな退化、運動ニューロン疾病、ALSを含む痴呆、多発性硬化症、精神的外傷の脳傷、ストローク、ポストストローク、精神的外傷で、記入する、脳傷、また小さな容器の脳血管性の疾病。痴呆、アルツハイマー病のように、管の痴呆、Lewy身体を備えた痴呆、frontotemporalな痴呆およびパーキンソン症候群、染色体17にリンクされた、frontotemporalな痴呆、ピックの疾病を含んでいること、進歩的な核の震え、corticobasalな退化、ハンチントン舞踏病、視床の退化、Creutzfeldt-Jakob痴呆、HIV痴呆、痴呆を備えた精神分裂病、またKorsakoffの精神病、さらに、扱うことができる。同様に、ヒト樹状細胞免疫受容体の活動の規制により学習障害を持った子供の中の穏やかな認識の悪化、年齢に関連するメモリ悪化、年齢に関連する認識の衰退、管の認識の悪化、注意力欠如障害、attention deficit活動過多病気およびメモリ妨害のような認識のことに関連する病気を治療することは可能かもしれない。

40

50

【0152】

慢性の肺の（あるいは気道）疾病（COPD）は慢性の気管支炎（シニア&シャピロ、肺の疾病および障害、3rd ed、ニューヨーク、マグロウヒル、1998年、pp.、1998年659-681；パーズ、胸、105-145、2000年117）により肺気腫および周辺の気道妨害の混合物に一般に起因する気流妨害として生理学上条件である。肺気腫は、肺の領空の異常な拡大に結びつく歯槽の壁の破壊によって特徴づけられる。慢性の気管支炎は、各々の連続の2年に3か月の間慢性の生産的な咳の存在として臨床的に定義される。COPDでは、気流妨害が通常進歩的で、単に部分的に可逆的である。非常に、疾病は非喫煙者に生じるが、COPDの開発のた？°の最も重要な危険要因はたばこ喫煙である。

10

【0153】

気管の慢性の炎症はCOPD（シニア&シャピロ、1998年）の重要な病理学の特徴である。炎症性の細胞人口は、マクロファージ、好中球およびCD8+リンパ細胞の増加した数を含む。たばこ煙のような吸入された刺激物は、ケモキネス（例えばインターロイキン-8）および走化性のある要因をリリースするためにリードする上皮の細胞と同様に呼吸器官において駐在のマクロファージを活性化する。これらの走化性のある要因はinc rに作用する。肺組織および気道へ血液から売買する好中球/単球を緩和してください。気道へ補充された好中球および単球は、蛋白質分解を生ずる酵素および反応的な酸素種のような様々な潜在的に有害な仲介人を解放することができる。マトリックス低下および肺気腫、気道と共に、厚くなる界面活性剤機能障害および粘液分泌過多を囲む、すべては害された気流およびガス交換に結びつく、この炎症性の反応の潜在的な結果である。

20

【0154】

肥満、そして体重超過の傾向に相対的な身体の脂肪の過剰として定義される。カロリーの摂取の増加あるいはエネルギー消費あるいは両方の減少は、脂肪として格納されている余分のエネルギーに結びつくこのインバランスを引き起こすことができる。肥満は重要な医学の病的な状態および死の増加に関係している。肥満の原因よく分かっていないが、陽性のエネルギー・バランスを引き起こすために遺伝要因、環境要因あるいは2つの組合せによってもよい。対照的に、拒食症と悪液質は、否定のエネルギーバランスおよび減量に結びつくエネルギー摂取対エネルギー消費での不均衡によって特徴づけられる。一方の増加エネルギー消費、エネルギー摂取の減少、吸収あるいは記憶が有用な試薬、肥満の治療、重量超過、また共同な状態を関連させた。エネルギー摂取および/またはエネルギー消費の減少を増加させるか、引き締まっている組織の量を増加させる試薬は、悪液質、拒食症および浪費する病気を扱うのによく役立ちました。

30

【0155】

遺伝子は処置として使用できる。また、ゲノミクスを通じて同定される遺伝子又は遺伝子断片は、すぐに1つ又はそれ以上の非相同（ヘテロガス）発現系において発現させ、機能性組換えタンパク質を産生させることができる。このタンパク質は、その生物学的機能についてインビトロで特徴付けられ、その後その生化学活性の化学修飾因子（モジュレーター）を同定するため、ハイスループット分子スクリーニングプログラムにおける道具として用いられる。標的タンパク質活性のアゴニスト及び/又はアンタゴニストをこの様式で同定し、次いで、細胞およびインビボ疾患モデルにて抗癌活性について試験する。生物学的モデルにおける反復試験や、詳細な薬物動態力学的分析及び中毒学的分析を用いたリード化合物の最適化により、薬物開発及び次のヒトでの試験についての基礎を形成する。

40

【0156】

本発明は、上に記述された、分析によって同定された新規な試薬の使用にさらに関する。従って、それは適切な動物モデルにここに記述されるように同定された試験化合物を使用することも本発明の範囲内である。例えば、そのような試薬と処理の効能、毒性あるいは副作用を決定するために、ここに（例えば調整する試薬、アンチセンスの核酸分子、特定の抗体、リボザイムあるいは分子を結合する樹状細胞免疫受容体ポリペプチド。記述されるように同定された試薬は、動物モデルの中で使用することができる。別法として、その

50

ような試薬の反応のメカニズムを測定するために、ここに記述されるように同定された試薬は、動物モデルにおいて使用することができる。更に、この発明は、ここに記述されるような処理のための上記の記述された分析によって同定された新規な試薬の用途に関する。

【0157】

樹状細胞免疫受容体遺伝子、酵素、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、心血管症状に対する治療効果を有し得る。心血管疾患には、以下の心臓および血管系の障害が含まれる：うっ血性心不全、心筋梗塞、虚血性心疾患、すべての種類の心房性および心室性不整脈、高血圧血管疾患および末梢血管疾患。

【0158】

心不全とは、心機能の異常性のせいで、心臓が、代謝中の組織の必要に見合う割合で血液をポンプすることができない病態生理学的状態として定義される。これには、ハイアウトプットおよびローアウトプット、急性および慢性、右側または左側、収縮性または弛緩性のようなすべての型のポンプ不全が、原因に関係なく含まれる。

【0159】

心筋梗塞(MI)は一般に、冠血流の突然の減少、その後の、動脈硬化症によってあらかじめ狭小化した冠動脈の血栓性閉塞によって生じる。MI予防(初期および二次的予防)は、MIの急性処置および合併症の予防と同様に包含される。

【0160】

虚血性疾患は、冠流が制限され、酸素に関して心筋の必要量に見合わない灌流を生じる症状である。この群の疾患には、安定狭心症、不安定狭心症および無症候性虚血が含まれる。

【0161】

不整脈には、すべての型の心房性および心室性頻脈性不整脈(心房性頻脈、心房粗動、心房細動、房室リエントラント頻脈、興奮前症候群、心室頻脈、心室粗動、心室細動)、ならびに徐脈性型不整脈が含まれる。

【0162】

高血圧血管疾患には、初期ならびにすべての種類の二次的動脈高血圧(腎、内分泌、神経原性、その他)が含まれる。遺伝子は、高血圧の処置、ならびにすべての合併症の予防に関する薬物標的として用いることができる。末梢血管疾患とは、動脈および/または静脈流が減少し、血液供給と組織酸素要求の間の不均衡が生じる血管疾患として定義される。これには、慢性末梢動脈閉塞疾患(PAOD)、急性動脈血栓症および塞栓症、炎症性血管障害、レイノー現象および静脈障害が含まれる。CNS障害、例えばパーキンソン疾患、皮質基底変性(corticobasal degeneration)、運動ニューロン疾患、痴呆、ALS、多発性硬化症、外傷性脳傷害、外傷後脳傷害、小血管脳血管疾患、脳卒中および脳卒中後後遺症もまた、ヒト樹状細胞免疫受容体の調節によって処置できる。

【0163】

本発明は、上記のスクリーニング検定によって同定される新規物質の使用にさらに関する。従って、本明細書に記載するように同定される被験化合物を適当な動物モデルに使用することは、本発明の範囲内にある。例えば、本明細書に記載するように同定される物質(例えば、調整物質、アンチセンス核酸分子、特異的な抗体、リボザイム又は樹状細胞免疫受容体ポリペプチド結合分子)を、そのような物質を用いた処置の効果、毒性又は副作用を決定するために、動物モデルに用いることがある。あるいは、本明細書に記載するように同定された物質を、該物質の作用機構を決定するために、動物モデルに使用する場合がある。さらに、本発明は、本明細書に記載の処置に対する上記スクリーニング検定によって同定される新規物質の使用に関する。樹状細胞免疫受容体活性に影響を及ぼす試薬を、樹状細胞免疫受容体活性を低下させるために、インビトロ又はインビボのいずれかにおいてヒト細胞に投与することができる。試薬は、ヒト樹状細胞免疫受容体遺伝子の発現産物と結合することが好ましい。その発現産物がタンパク質である場合、試薬は抗体であるこ

10

20

30

40

50

とが好ましい。エックスピボにおけるヒト細胞の処置については、抗体を、人体から取り出しておいた幹細胞の調製物に添加することができる。その後、その細胞を、当分野で周知のように、クローン増殖させるか、又はさせずに同じ又は別の人体に移すことができる。

【0164】

1つの態様においては、試薬を、リポソームを用いて送達する。リポソームは、投与した動物中にて、少なくとも約30分間、より好ましくは少なくとも約1時間、さらにより好ましくは少なくとも約24時間安定であることが好ましい。リポソームは、試薬、特にポリヌクレオチドを、動物（例えばヒト）の特定の部位に標的化することができる脂質組成物を含む。リポソームの脂質組成物は、動物の特有の器官、例えば肺、肝臓、脾臓、心臓、脳、リンパ節及び皮膚を標的化できることが好ましい。

10

【0165】

本発明に有用なリポソームは、標的化した細胞の原形質膜と融合でき、その内容物を細胞に送達できる脂質組成物を含む。好ましくは、リポソームのトランスフェクション効率は約 10^6 細胞に送達されるリポソーム16nmol当たりDNA約 $0.5\mu\text{g}$ であり、より好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム16nmol当たりDNA約 $1.0\mu\text{g}$ であり、さらにより好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム16nmol当たりDNA約 $2.0\mu\text{g}$ である。好ましくは、リポソームは直径が、約 $100\sim 500\text{nm}$ であり、より好ましくは約 $150\sim 450\text{nm}$ であり、さらにより好ましくは約 $200\sim 400\text{nm}$ である。

20

【0166】

本発明に用いるに適したリポソームは、例えば当業者に知られる遺伝子送達法に標準的に用いられるリポソームを含む。より好ましいリポソームは、ポリカチオン脂質組成物を有するリポソームおよび/またはポリエチレングリコールと連結されたコレステロールバックボーン（骨格鎖）を有するリポソームを含む。あるいは、リポソームは特定の細胞タイプを標的化できる化合物、例えばリポソームの外側表面に曝される細胞特異的リガンドを包含する。

【0167】

リポソームを、試薬、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムと複合化させることは、当分野で標準的な方法（例えば、米国特許5,705,151を参照のこと）を用いて達成することができる。好ましくは、ポリヌクレオチド約 $0.1\mu\text{g}\sim$ 約 $10\mu\text{g}$ をリポソーム約8nmolと複合化する、より好ましくはポリヌクレオチド約 $0.5\mu\text{g}\sim$ 約 $5\mu\text{g}$ をリポソーム約8nmolと複合化する、さらにより好ましくはポリヌクレオチド約 $10\mu\text{g}$ をリポソーム約8nmolと複合化する。

30

【0168】

別の態様においては、抗体を、受容体媒介性標的化送達を用いて、インピボにて特定の組織に送達することができる。受容体媒介性DNA送達技術は、例えばFindelsら、Trends in Biotechnol. 11, 202-05 (1993); Chiouら、GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J. A. Wolffら、) (1994); Wu & Wu, J. Biol. Chem. 263, 621-24 (1988); Wuら、J. Biol. Chem. 269, 542-46 (1994); Zenkeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3655-59 (1990); Wuら、J. Biol. Chem. 266, 338-42 (1991)にて教示されている。

40

【0169】

治療的有効量の決定

治療的有効量の決定は、充分当業者の能力の範囲内にある。治療的有効量とは、治療的有効量の不在下で起こる樹状細胞免疫受容体活性に比較して樹状細胞免疫受容体活性を増大させまたは低下させる活性成分の量を指す。

50

【0170】

いかなる化合物に関しても、治療的有効量は最初に細胞培養検定で、または動物モデル、通常マウス、ウサギ、イヌ、またはブタで見積もることができる。動物モデルは適当な濃度範囲および投与経路の決定にも使用できる。次にこのような情報を用いてヒトでの有用な用量と投与経路を決定できる。

【0171】

治療的有効性および毒性、例えばED₅₀（集団の50%で治療的に有効な用量）およびLD₅₀（集団の50%で致死的な用量）は、細胞培養または実験動物における標準的薬学的方法により決定できる。治療効果に対する毒性効果の用量比が治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。

10

【0172】

大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養検定および動物研究から得られるデータを、ヒトへの使用のための用量範囲を処方する際に使用する。かかる組成物に含まれる用量は、好ましくは殆どまたは全く毒性を持たないED₅₀を包含する循環濃度の範囲内である。この用量は、使用する用量型、患者の感受性、および投与経路に応じてこの範囲内で変わる。

【0173】

正確な用量は、治療を必要とする対象に関連する因子に照らして医師が決定する。用量および投与は、十分なレベルの活性成分を提供するよう、または所望の効果を維持するよう、調節する。考慮できる因子は、疾病状態の重篤度、対象の全身健康状態、年齢、体重、および対象の性別、食餌、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応の感受性、および療法に対する寛容/応答を包含する。長時間作用性医薬組成物は、その製剤の半減期およびクリアランス率に応じて3から4日毎、毎週、または2週間に1回投与することができる。

20

【0174】

標準的な用量は投与経路に応じて0.1から100000マイクログラムまで変えることができ、約1gまでの総用量とすることができる。特定の用量および送達方法についての指針は文献に提供されており、一般に当分野の医師が入手できる。当業者は、ヌクレオチド用にはタンパク質またはそれらのインヒビター用のものとは異なる製剤を使用するであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は特定の細胞、状態、場所などに特異的である。

30

【0175】

この試薬が一本鎖抗体である場合、この抗体をコードしているポリヌクレオチドを組み立て、トランスフェリン-ポリカチオン-媒介DNA転移、裸のまたはカプセル内核酸を用いるトランスフェクション、リポソームの媒介する細胞融合、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、電気穿孔、「遺伝子銃」、およびDEAE-または燐酸カルシウム-媒介トランスフェクションを包含する（但しこれらに限定される訳ではない）充分確立した技術を用いて、*ex vivo*またはインビボで細胞内に導入できる。

【0176】

抗体の有効なインビボ用量は、約5μgから約50μg/kg、約50μgから約5mg/kg、約100μgから約500μg/kg（患者の体重）、および約200から約250μg/kg（患者の体重）の範囲である。一本鎖抗体をコードしているポリヌクレオチドの投与のためには、有効なインビボ用量は、約100ngから約200ng、500ngから約50mg、約1μgから約2mg、約5μgから約500μg、および約20μgから約100μgのDNAの範囲である。

40

【0177】

発現産物がmRNAである場合、試薬は好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを発現するポリヌクレオチドは、上記のように多岐にわたる方法によって細胞中に導入できる。

50

【0178】

好ましくは、試薬は、樹状細胞免疫受容体遺伝子の発現または樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの活性を、該試薬の不在時と比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下させる。樹状細胞免疫受容体遺伝子の発現レベルまたは樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの活性を低下させるよう選択した機構の有効性は、当分野で周知の方法、例えば樹状細胞免疫受容体特異的mRNAへのヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション、定量的RT-PCR、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドの免疫学的検出、または樹状細胞免疫受容体活性の測定を用いて評価できる。

【0179】

上記のいずれの態様においても、本発明に係る任意の医薬組成物は他の適当な治療薬と組み合わせて投与できる。併用療法に使用するための適当な物質の選択は、常套的製薬原理に従い、当業者により実施することができる。治療薬の組み合わせは、相乗的に働いて、上記の様々な疾患の治療または予防を奏効させる。このアプローチを用いて、より低い各物質の用量で治療効果を達成することができ、したがって有害な副作用の可能性を低減することができる。

【0180】

上記の治療方法のいずれも、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトといった哺乳動物を包含する、このような治療を必要とする任意の対象に適用することができる。

【0181】

診断方法

ヒト樹状細胞免疫受容体はさらに、この酵素をコードしている核酸配列における突然変異の存在に関連する疾病および異常、または疾病および異常に対する感受性を検出する診断検定に使用できる。例えば、疾患に罹患している個体と正常な個体とにおける樹状細胞免疫受容体をコードするcDNAまたはゲノム配列の間の差異を決定できる。もし、罹患している個体の幾つかまたは全てに突然変異が観察され、正常な個体で観察されないならば、その突然変異がその疾患の原因物質である可能性がある。

【0182】

参照遺伝子および突然変異を有する遺伝子の間の配列相違は、直接DNA配列決定法によって明らかにできる。加えて、クローニングしたDNAセグメントを、特定のDNAセグメントを検出するためのプローブとして使用できる。この方法の感受性はPCRと組み合わせる時極めて増強される。例えば、二本鎖PCR産物または修飾PCRにより調製された一本鎖テンプレート分子と共に、配列決定プライマーを使用することができる。配列決定は、放射標識したヌクレオチドを用いる常套的方法によって、または蛍光標識を使用する自動配列決定法によって実施する。

【0183】

DNA配列相違に基づく遺伝子試験は、変性させる物質を含むまたは含まないゲル中のDNA断片の電気泳動移動度の変化を検出することにより実施できる。小配列の欠失および挿入は、例えば高分解能ゲル電気泳動によって視覚化できる。異なる配列のDNA断片は変性させるホルムアミド勾配ゲル上で同定でき、ここでは、異なるDNA断片の移動度が、それらの特異的融解温度または部分的融解温度に従って、ゲル中の異なる位置で遅延する(例えば、Myersら、Science 230, 1242, 1985を参照されたい)。特定の位置での配列改変もまたヌクレアーゼ保護検定、例えばRNアーゼおよびS1保護または化学的開裂法によって明らかにすることができる(例えば、Cottonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401, 1985)。即ち特異的DNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNアーゼ保護、化学的開裂、直接DNA配列決定といった方法によって、または制限酵素とゲノムDNAのサザンブロッティングを使用することによって実施できる。ゲル電気泳動およびDNA配列決定のような直接法に加えて、突然変異は*in situ*分析により検出することもできる。

10

20

30

40

50

【0184】

樹状細胞免疫受容体レベルの変化もまた種々の組織で検出できる。血液または組織生検のように、宿主から誘導した身体試料中のタンパク質ポリペプチドのレベルを検出するために用いる検定は、当業者に周知であり、ラジオイムノアッセイ、競合的結合検定、ウェスタンブロット分析、およびELISA検定を包含する。

【0185】

本明細書に引用する全ての特許および特許出願は、引用により特に本明細書の一部とする。上記の内容は本発明を一般的に記載するものである。より完全な理解は以下の具体的実施例を参照することによって得られ、それらの実施例は例示のみの目的で提供するものであり、本発明の範囲を限定する意図は無い。

10

【0186】

実施例 1

樹状細胞免疫受容体活性の検出

配列番号1のポリヌクレオチドを発現ベクターpCEV4に挿入し、得られた発現ベクターpCEV4-樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをヒト胎児腎293細胞にトランスフェクトする。チオベンジルエステル基質を用いて、米国特許第5,500,344号に記載のように、トランスフェクト細胞の細胞抽出物のプロテアーゼ活性を測定する。顆粒およびカラムフラクション由来の酵素活性をモニターするため、室温で、0.5mM 5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)(Sigma)を用いて検定を行い、HSBzl脱離基を検出($410 = 13600 M^{-1} cm^{-1}$)する。さらに、ミクロタイター検定(Green and Shaw, Anal. Biochem. 93, 223-226, 1979)を用いてBLT-エラスターゼ活性を見積もる。簡単には、サンプル50 μ Lを、10mM HEPES、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂からなる1mM DTNB 100 μ L、pH7.2に加える。BLT(Sigma)50 μ Lを加えて、最終濃度500 μ Mにすることによって反応を開始させる。メターゼ(Metase)測定では、0.1M HEPES、0.05M CaCl₂、pH7.5中のサンプル希釈物50 μ Lを、1mM DTNB 100 μ Lに加え、Boc-Ala-Ala-Met-Sベンジル(Bzl)50 μ Lを加え、最終濃度250 μ Mにすることによって反応を開始させる。検定の時間は呈色度合いに応じ、その割合(rate)はDynatech MR 5000 マイクロプレートリーダーで測定(O.D.₄₁₀)する。サンプルおよびDTNBのみまたはDTNBおよび基質のみのコントロールを実行する。

20

30

【0187】

トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず、同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。RNAを、Chirgwinら、Biochem. 18, 5294-99, 1979に記載のように2つの培養物から単離する。ノーザンブロットを全RNA20~30 μ gを用いて調製し、エクスプレスハイブ(Expresshyb)(CLONTECH)中65にて、³²I-標識化ヒト樹状細胞免疫受容体特異的プローブを用いてハイブリダイズさせる。このプローブは配列番号1または9の相補物より選ばれる少なくとも11個の連続ヌクレオチドを包含する。

40

【0188】

被験化合物を、ヒト樹状細胞免疫受容体発現構築物でトランスフェクトしたヒト細胞培養に投与し、30で1時間インキュベートする。トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、GF/Bフィルターを用いて、0.5%ポリエチレンジアミンを用いて同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。RNAを、Chirgwinら、Biochem. 18, 5294-99, 1979に記載のように2つの培養物から単離する。

【0189】

非特異的結合は、被験化合物の非存在下にて得られるシグナルと比較して、ヒト樹状細胞免疫受容体特異的シグナルを低下させる被験化合物を、ヒト樹状細胞免疫受容体遺伝子発

50

現のインヒビターとして同定する。

【0190】

実施例 2

組換えヒト樹状細胞免疫受容体の発現

ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) 発現ベクター pPICZB (*Invitrogen, San Diego, CA*) を用いて、大量の組換えヒトセリンプロテアーゼ DESC1 セリンプロテアーゼ DESC1 ポリペプチドを酵母中に生産させる。樹状細胞免疫受容体コード化 DNA 配列は配列番号 1 または 14 から誘導する。ベクター pPICZB 中に挿入する前に、DNA 配列を、その 5' 端に開始コドン、及び 3' 端にエンテロキナーゼ開列部位、His6 レポータータグや終止コドンを含ませるといった周知の方法によって修飾する。さらに、その両末端に制限エンドヌクレアーゼの認識配列を加え、対応する制限酵素を用いて pPICZB のマルチクローニングサイトを消化した後、修飾 DNA 配列を pPICZB 中にライゲートする。この発現ベクターは、ピキア パストリスにて酵母プロモーターにより誘導される誘導性発現用に設計する。得られた pPICZ/md-His6 ベクターを用いて、酵母を形質転換する。

10

【0191】

この酵母を、5 リッター攪拌フラスコ中で通常の条件下にて培養し、組換え産物タンパク質を、8 M ウレアの存在下で親和性クロマトグラフィー (*Ni-NTA-樹脂*) により培養物から単離する。結合したポリペプチドを、pH 3.5 の緩衝液を用いて溶出し、中性化する。His6 レポータータグからのポリペプチドの分離は、製造元の指示に従い、エンテロキナーゼ (*Invitrogen, San Diego, CA*) を用いる部位特異的タンパク質分解により行なう。精製ヒト樹状細胞免疫受容体ポリペプチドを得る。

20

【0192】

実施例 3

樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと結合する被験化合物の同定

グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質を含み 96 ウェル マイクロタイタープレートのグルタチオン誘導化ウェルに吸着させた精製樹状細胞免疫受容体ポリペプチドを、生理緩衝溶液 pH 7.0 の小分子ライブラリー由来の被験化合物と接触させる。樹状細胞免疫受容体ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む。被験化合物は蛍光標識を含む。この試料を 5 分間 ~ 1 時間インキュベートする。コントロール試料は、被験化合物の非存在下にてインキュベートする。

30

【0193】

被験化合物を含む緩衝液を、ウェルから洗い出す。樹状細胞免疫受容体ポリペプチドに対する被験化合物の結合を、ウェル内容物の蛍光測定により検出する。被験化合物をインキュベートしていないウェルの蛍光と比較して少なくとも 15% ウェルの蛍光を増大させる被験化合物を、樹状細胞免疫受容体ポリペプチドと結合する化合物と同定する。

【0194】

実施例 4

樹状細胞免疫受容体遺伝子発現を低下させる被験化合物の同定

被験化合物を、樹状細胞免疫受容体発現構築物でトランスフェクトしたヒト細胞培養に投与し、37 °C で 10 ~ 45 分間、インキュベートする。トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず、同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。

40

【0195】

RNA を、Chirgwin ら、*Biochem. J.* 18, 5294-99, 1979 に記載のように 2 つの培養物から単離する。ノーザンブロットを全 RNA 20 ~ 30 µg を用いて調製し、エクスプレスハイブ (*Expresshyb*) (*CLONTECH*) 中 65 °C にて、³²P-標識化樹状細胞免疫受容体特異的プローブを用いてハイブリダイズさせる。このプローブは配列番号 1 または 14 の相補物より選ばれる少なくとも 11 個の連続ヌクレオチドを包含する。被験化合物の非存在下にて得られるシグナルと比較して、樹

50

状細胞免疫受容体特異的シグナルを低下させる被験化合物を、樹状細胞免疫受容体遺伝子発現のインヒビターとして同定する。

【0196】

実施例 5

ヒト樹状細胞免疫受容体のリガンドの同定

発現クローニング。被験化合物を、樹状細胞免疫受容体発現構築物でトランスフェクトしたヒト細胞培養に投与し、インキュベートする。トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず、同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。樹状細胞免疫受容体特異的プローブを用いてFACSまたはパンニングする。このプローブは非存在下にて得られるシグナルと比較して、樹状細胞免疫受容体特異的シグナルを低下させる被験化合物を、樹状細胞免疫受容体遺伝子発現のインヒビターとして同定する。

10

【0197】

ランダムペプチドディスプレイライブラリーの使用。ヒト樹状細胞免疫受容体 cDNA で感染させた哺乳類の細胞はヒト樹状細胞免疫受容体に結合するペプチドを同定するために使用される。特に、ランダムペプチド・ディスプレイライブラリ（例えば FliTrx & # 8482 ; ）を発現する大腸菌は、トランスフェクタントへの結合のためにスクリーニングする。ふるい分けのいくつかのラウンドの後に、陽性のクローンは順番に並べらる。縮重していないポリペプチドはオリゴヌクレオチドを使用して、T細胞 cDNA ライブラリの植民地ハイブリダイゼーションによって同定される。あるいは、PCRプライマーはペプチド・配列に基づいて合成する。

20

【0198】

生化学的方法。T細胞系全細胞抽出液から調製した細胞膜画分を可溶のヒト樹状細胞免疫受容体に結合したアフィニティーカラムに適用する。カラム（つまり推定上のリガンド）に結合した分子は、pHを変更するか EDTA または炭水化物で洗浄することにより溶出する。溶出液を慣用のカラム・クロマトグラフィーおよび HPLC によって精製した後、アミノ酸配列決定で検査する。これらのリガンドをコード化する cDNA は、オリゴヌクレオチドを使用して、T細胞 cDNA ライブラリーの植民地ハイブリダイゼーションによってクローンを作成する。あるいは、PCRプライマーを明らかにされたアミノ酸配列に基づいて合成する。

30

【0199】

実施例 6

ヒト樹状細胞免疫受容体活性を低下させる細胞被験化合物の同定

被験化合物を、ヒト樹状細胞免疫受容体発現構築物でトランスフェクトしたヒト細胞培養に投与し、37 で 10 ~ 45 分間、インキュベートする。トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず、同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。

【0200】

被験化合物の非存在下にて得られるシグナルと比較して、ヒト樹状細胞免疫受容体特異的シグナルを低下させる被験化合物を、ヒト樹状細胞免疫受容体遺伝子発現のインヒビターとして同定する。

40

【0201】

実施例 7

樹状細胞免疫受容体遺伝子産物と特異的に結合する試薬を用いた喘息の処置

配列番号 1 または 15 の相補物より選択される少なくとも 11 個の連続ヌクレオチドを含むアンチセンスヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質オリゴヌクレオチドの合成は、ホスホラミダイト手順を用いて、ファルマシア ジーン アセンブリー シリーズ シンセサイザー (Pharmacia Gene Assembler series synthesizer) にて実施する (Uhlmann ら、Chem. Rev. 90, 534 - 83, 1990 を参照のこと)。アセンブリーおよび脱保護に続き、オリゴヌクレオチ

50

ドを2度エタノール沈殿させ、乾燥させ、そしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に所望の濃度に懸濁する。これらのオリゴヌクレオチドの純度は、キャピラリーゲル電気泳動及びイオン交換HPLCにより試験する。オリゴヌクレオチド調製のエンドトキシンレベルは、リムルスアメーバ様検定(Limulus Amebocyte Assay)(Bang, Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 105, 361-362, 1953)を用いて決定する。

【0202】

アンチセンスのオリゴヌクレオチドを含んでいる水性製剤は、吸入によって患者に処置した。

【0203】

喘息の重篤度は徴候の変化に注意する、肺機能を測定する、あるいは洗浄によって肺からサンプリングされた流体の中で多くの炎症性の細胞あるいは炎症性のメディエーターの濃度のような肺炎症のマーカーの変化を測定することにより、数日または数週の期間の間モニターした。喘息の重篤度は樹状細胞免疫受容体の活性により低減した。

10

【0204】

実施例 8

新規化合物の生体内の確認

1. T細胞の活性に対する試験は共刺激分子サイトカニン、サイトカニン受容体、シグナル伝達分子あるいはT細胞活性化に関する他の分子の発現か活性を調節する試薬を評価するために使用した。

20

【0205】

マウスはサイトカニン産生モデルを反-CD3-誘導した:

BALB/cマウスは、145の2C11(精製ハムスター抗マウスCD3モノクローナル抗体, PHARMINGEN)の10のAgの単一の静脈注射を注入した。化合物は、抗CD3 mAb注入に先立って腹腔内で60分処理した。血液は、抗体注入の後に90分集めた。血清を3000 rで遠心分離によって得た。

【0206】

IL-2およびIL-4のようなサイトカニンあるいは他の分泌された分子の血清レベルは、ELISAによって決定した。CD3の下流のシグナリングを調節する蛋白質はこのモデル中で評価することができた。

30

【0207】

2. B細胞の活性に対する試験は、B細胞受容体の発現か活性を調節する試薬、あるいは、B細胞活性化/免疫グロブリンクラス・スイッチングに含まれる他の分子を評価するために使用した。マウス反免疫グロブリンDは免疫グロブリンE産生モデルを引き起こした。

マウス抗IgDはIgE産生モデルを誘導した:

BALB/cマウスは、精製されたヤギ抗マウス免疫グロブリンD抗体あるいはPBS(日0として定義された)の0.8mgを静脈内で注入した。化合物は、日0~日6まで腹腔内で処理した。日に、7つの血液を集めた。また、血清は3000 rで遠心分離によって得られた。免疫グロブリンEの合計の血清レベルはYAMASAのELISAキットによって決定した。また、他のIgサブタイプはIg ELISA KIT(Rougier Bio-tech's, Montreal, Canada)によって測定した。免疫グロブリンDの下流のシグナリングおよびIgクラス・スイッチングを調節する蛋白質は評価することができた。

40

【0208】

3. 単球/マクロファージの活性に対する試験は分子(転写要因)を示す発現か活性を調節する試薬を評価するために使用した。

【0209】

マウスはTNF α 産生モデルをLPS-引き起こした:

化合物は腹腔内の注入によってBALB/cマウスに処理した、そして1時間後に、腹腔

50

内の注入によってLPS(200およびug/マウス)を与えられたマウス。LPS注入およびプラズマが得られた90分後、血液が集めた。サンプル中のTNF α 濃度はELISAキットを使用して決定した。NF-KB活性化のようなLPS刺激の影響を下流に調節する蛋白質は評価することができた。

【0210】

4. エオシン好性の細胞の活性に対する試験は分子、細胞骨格の分子あるいは付着分子を示して、エオトキシン受容体の発現か活性を調節する試薬を評価するために使用した。

【0211】

マウスは好酸球増加モデルをエオトキシン誘導した：

BALB/cマウスは、皮内に注入した、6および3日目に2.5mlのエアポーチを準備するために日0において、化合物を腹腔内処理した。また、30分後に、IL-5(300ナノグラム/マウス)は静脈内投与した。さらに30分の後に、エオタキシンは注入した(3pg/マウス、id)。エオタキシン注入の4時間後に、airpouch浸出物中の白血球を集めた。また、細胞の合計の数が数えられた。浸出物中の差異の細胞数はGrunwald Gimsaにより実行した。エオタキシン受容体によってシグナリングを調節するか、エオシン好性の産物を調節する蛋白質は評価することができた。

【0212】

5. ラットにおける受動皮膚アナフィラキシー(PCAA)

6週齢、のオスのWistarラットに皮下投与し(id)感作し、軽い麻酔下で0.1のug/mlマウス反DNP免疫グロブリンE単クローン抗体(SPE-7)の50ug/mlで処理した。24時間の後に、ラットは、0.6mgのDNP-BSA(30)(LSLCO.LTD)を含有する食塩水の1mlおよびエヴァンスの0.005gで静脈内で投与した。化合物は、腹腔内で(ip)注入した。増感、抗原投与および合成の処理のないラットはコントロールとして使用した。また、感作、抗原投与をしたラットは阻止を決定するために使用した。抗原投与の30分後に、ラットを屠殺した。また、後部の皮膚を切除した。皮膚中のエヴァンスの青い染料は、63にて620nmの吸光度でフォルムアミドの中で一晚抽出した、その後、漏らされた染料の光学の密度を得るために測定した。

【0213】

化合物によるPCAAの阻害パーセントは以下のように計算した：

$\% \text{ 阻害} = \{ (\text{平均媒質容量} - \text{試料容量}) / (\text{平均媒質値} - \text{平均対照値}) \} \times 100$

ヒスタミン受容体、セロトニン受容体あるいはシステイニルロイコトリエン受容体に対する、マスト細胞顆粒減少、管の浸透性あるいは受容体敵を調節する100の蛋白質を評価することができた。

【0214】

6. ラットにおけるアナフィラキシー性気管支収縮

6週齢の雄性WistarラットにSPE-7で静脈内(iv)感作し、1日後に、ラットは、ウレタン(1000mg/kg、ip)およびガラニン(50mg/kg、iv)を添加した麻酔下の1.5mgのDNP-BSA(30)を含んでいる食塩水の0.3mlで静脈内で抗原投与した。カニューレは、人工呼吸(2ml/ストローク、70のストローク/分)のために気管に挿入した。肺の圧力(PI.P)はカニューレの側面の腕を圧力変換器に接続し、記録した。PI.Pの変化は、抵抗および肺の従順の両方の変化を反映した。化合物を評価するために、化合物を抗原投与の5分前に投与した。

【0215】

ヒスタミン受容体、セロトニン受容体あるいはシステイニルロイコトリエン受容体に対する、マスト細胞顆粒減少、管の浸透性あるいは受容体敵を調節する蛋白質は評価することができた。平滑筋の短縮を調節する蛋白質も評価することができた。

【0216】

7. 平滑筋細胞あるいは内皮細胞へのT細胞吸着

T細胞の精製した集団は、羊赤血球で惹起し、抗体で覆われた磁気ビーズを使用して、ナイロンウールカラム上で分離した後 ficoll 密度遠心分離によって製造した。T細胞は36~42時間有系分裂促進物質で活性化した。また、標識を活性化の最後の16時間間で3Hチミジンで付した。気道平滑筋細胞あるいは気管支の微小血管の内皮の細胞は、肺移植組織、癌患者からの気管支切除、死体、あるいは商業的な供給元からの細胞系として得た。新鮮な組織が細胞の源として使用される場合、1.7 mMをエチレングリコールで2度30-60分間消化した後、解剖によって平滑筋細胞および内皮の細胞を組織から分離したエチレングリコール-ビス-(ベータ-アミノエチルエーテル)-N、N'、N'-四酢酸、640のU/mLコラゲナーゼ、10mg/mlのダイズトリプシン抑制剤および10のU/mLエラスターゼ。平滑筋細胞か内皮の細胞はコンフルエントまで24ウェル組織培養皿において培養した後、24時間TNF α のような試験化合物および炎症性のメディエーターで処理した。付着を測定するために、6つの $\times 10^5$ T細胞を加えられた。37個のC. Nonadherent細胞で1時間付着することが認められ、培地で6回静かに洗うことにより除去した。最後に、残る付着細胞を、PBS中の300 μ Lの1%トリトン-X 100を加えることにより溶解し、シンチレーション計数器で放射能の量を計った。付着細胞/合計から回収された計数值 $\times 100\%$ として結合の百分率を計算した。

10

【0217】

参考文献一覧

- Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 20
- Ariizumi, Kitajima, Bergstresser, Takashima, Eur. J. Immunol., 25:2137-2141, 1995.
- Beaudet, Am. J. Hum. Gen., 37:386-406, 1985.
- Bittner et al., Methods in Enzymol., 153:516-544, 1987.
- Bradley et al., Current Topics in Developmental Biology, 20:357-371, 1986.
- Brutlag et al., CABIOS, 6:237-245, 1990. 30
- Caceres-Dittmar, Ariizumi, Xu, Tapia, Bergstresser, Takashima, Photochem. Photobiol., 62:176-183, 1995.
- Campbell, In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology, Burden and Von Knippenberg, Amsterdam, Elsevier, Vol. 13, pp 75-83, 1984.
- Caouto, Christian, Peterson, Ceriani, Cancer Research (supp.), 55:5973s-5977s, 1995. 40
- Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425 1977.
- Caux, Massacrier, Vanbervliet et al., J. Exp. Med., 180:1263-1272, 1994.
- Chou and Fasman, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148, 1978a.
- Chou and Fasman, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276, 1978b.
- Chou and Fasman, Biophys. J., 26:367-384, 1979. 50

- Chou and Fasman, *Biochemistry*, 13(2):222-245, 1974a.
- Chou and Fasman, *Biochemistry*, 13(2):211-222, 1974b.
- Co, Baker, Bednavik, Janzek, Noruda Mayer, Plot, Stumper, Vesquez, Queen, Loibner, *Cancer Research*, 56:1118-1125, 1996.
- Co, Avdalovic, Caron, Avdalovic, Scheinberg, Queen, *J. Immunology*, 138:1149-1154, 1992. 10
- Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1, 1981.
- Enk and Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89;1398-1402, 1992.
- Ezekomitz et al., 1990
- Ezekomitz et al., 1991.
- Fetrow and Bryant, *Biotechnology*, 11:479-483, 1993.
- Flam, *JOURNAL*, VOL: PAGES?, 1994.
- Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977 20
- Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149, 1968.
- Heufler, Topar, Koch, et al., *J. Exp. Med.*, 176:1221-1226, 1992.
- Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073, 1980. 30
- Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986.
- Holland et al., *Biochemistry*, 17:4900, 1978.
- Hoover et al., (eds). "Remington's Pharmaceutical Sciences," 15th Ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580, Mark Publishing Co., Barton 40
Pa., 1975.
- Hopp, U.S. Pat. No. 4,554,101
- Inaba, Swiggard, Inaba et al., *Cell. Immunol.*, 163:148-156, 1995.
- Jameson and Wolf, *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):181-186, 1988.
- Jiang, Swiggard, Heufler et al., *Nature*, 375:151-155, 1995.
- Johnson et al., *Biotechnology and Pharmacy*, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, Ne 50

- w York , 1993 .
- Jones , Genetics , 85 : 12 , 1977 .
- Kery , 1991 .
- Kingsman et al . , JOURNAL , VOL : PAGES ? , 1979 .
- Kijimoto - Ochiai et al . , 1994 .
- Kitajima , Ariizumi , Mohamadzadeh , Edelbaum , Bergstresser , Takashima , J. Immunol . , 155 : 3794 - 3800 , 1995 .
- Kohler and Milstein , Eur . J. Immunol . , 6 : 511 - 519 , 1976 . 10
- Kholer and Milstein , Nature , 256 : 495 - 497 , 1975 .
- Kyte and Doolittle , J. Mol. Biol . , 157 : 105 - 132 , 1982 .
- Lovell - Badge , In: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells : A Practical Approach , E. J. Robertson , ed . , IRL Press , Washington D . C . , 1987 .
- Lowry et al . , Cell , 22 : 817 , 1980 . 20
- Matsue , Cruz , Bergstresser , Takashima , J. Invest. Dermatol . , 99 : 537 - 541 , 1992 .
- Mohamadzadeh , Poltorak , Bergstresser , Beutler , Takashima , J. Immunol . , 156 : 3102 - 3106 , 1996 .
- Mulligan et al . , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 78 : 2072 , 1981 .
- Nakamura et al . , " Enzyme Immunoassays : Heterogeneous and Homogeneous Systems , " Chapter 27 , 1987 . 30
- O'Hare et al . , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 78 : 1527 , 1981 .
- Oldenburg et al . , 1992 .
- Reid et al . , 1994 .
- Robertson , Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells : A Practical Approach , E. J. Robertson , ed . , IRL Press , Washington D . C . , 1987 .
- Sallusto , Cella , Danieli , Lanzavecchi , J. Exp. Med . , 182 : 389 - 400 , 1995 . 40
- Sambrook , Fritsch , Maniatis , Molecular Cloning , A Laboratory Manual , 2nd ed . , 1989 .
- Sancar , Valdineso , Borders , Yao , Raval , Madan , Sreepatni , Shimoyami , Steiger , Visscher , Diagnostic Molecular Pathology , 4 : 266 - 273 , 1995 .
- Santerre et al . , Gene , 30 : 147 , 1984 .
- Schreiber , Kilgus , Payer et al . , J. Immunol . , 149 : 3525 - 3534 , 1992 .
- Spiess , Biochemistry , 29 : 10009 - 10018 , 199 50

0 .

Stahl , Current Opinion in Immunology , 4 : 49 - 52 , 1992 .

Steinman and Swanson , J . Exp . Med , 182 : 283 - 288 , 1995 .

Steinman , Ann . Rev . Immunol . , 9 : 271 - 296 , 1991 .

Steinman , Inaba , Schuler , In : The Immune Functions of Epidermal Langerhans Cells , (ed . Heidrun Moll) , R . G . Landes Company , Austin , Tex . , 1 - 19 , 1995 . 10

Stinchcomb et al . , Nature , 282 : 39 , 1979 .

Szybalska et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 48 : 2026 , 1962 .

Takashima , Edelbaum , Kitajima et al . , J . Immunol . , 154 : 5128 - 5135 , 1995 .

Tschemper et al . , Gene , 10 : 157 , 1980 .

Vassa et al . , 1994 .

Vercelli et al . , 1989 .

Weinberger et al . , Science , 228 : 740 - 742 , 1985 . 20

Wigler et al . , Cell , 11 : 223 , 1977 .

Wigler et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 77 : 3567 , 1980 .

Witmer - Pack , Swiggard , Mirza , Inaba , Steinman , Cell . Immunol . , 163 : 157 - 162 , 1995 .

Wolf et al . , Comput . Appl . Biosci . , 4 (1) : 187 - 191 , 1988 .

Xu , Ariizumi , Caceres - Dittnar et al . , J . Immunol . , 154 : 2697 - 2705 , 1995 . 30

Xu , Ariizumi , Edelbaum , Bergstresser , Takashima , Eur . J . Immunol . , 25 : 1018 - 1024 , 1995 .

【図面の簡単な説明】

【図1】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号1）を示す。

【図2】図1のDNA配列から推定されるアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図3】受託番号AJ13532によって同定されるタンパク質のアミノ酸配列（配列番号3）を示す。 40

【図4】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号4）を示す。

【図5】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号5）を示す。

【図6】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号6）を示す。

【図7】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号7）を示す。

【図8】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号8）を示す。

- 【図9】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号9)を示す。
- 【図10】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号10)を示す。
- 【図11】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号11)を示す。
- 【図12】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号12)を示す。
- 【図13】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号13)を示す。
- 【図14】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするアミノ酸配列(配列番号14)を示す。
- 【図15】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号14)を示す。
- 【図16】樹状細胞免疫受容体ポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号15)を示す。
- 【図17】273_genwisedbおよびpdb|1DV8|1DV8-A間のBLASTPアライメントを示す。
- 【図18】273_genwisedbおよびhmm|lectin_c間のHMMPFAMアライメントを示す。

10

20

【図17】

Fig. 17
 BLASTP-273_genwisedbおよびpdb|1DV8|1DV8-A間のアライメント
 保存的な金属結合残基を太字で示す
 アシアロ糖タンパク受容体1フラグメント酸化水素認識ドメイン-h1サブユニット:(肝レクチンh1)

このヒットは以下のスコアリングである:1e-11(期待値)
 アライメント長(重複):132
 同一性:28%
 スコアリングマトリックス:BLOSUM62(コンセンサスバタースの推測に使用)
 サーチしたデータベース:nrdb

```

Q: 4 CPTWTFSQSSCFISTGMSQSWTKSQKNCVWGADLVVINTREQDFIIQNLKRNSYFL
CP.W...:SCY..S...:W...:C.:A.LVV...:EQQ.F...:...:
H: 1 CPVNWVHERSCYWFSSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEQKRFVQHIGCPVNTW-M
GLSDPGRRHQWVDQTFXNENVTFWHSGEFNNL-----DERCAIINFRSSEEWGND
GLD.G.W.WVD.T.Y.....W...:E.CA...:WND
GLHDQNG--PWKVVGDIDYETGFRNRFQPPDDWYGHGLGGEDCA---HFTDDGRWND
IHCHPQKSLCK 128
C..P...:C:
DVCQRFYRWVCE 125

```

【図18】

Fig. 18
 HMMPFAM-273_genwisedbおよびpfam|hmm|lectin_c間のアライメント
 C型レクチンドメイン

このヒットは以下のスコアリングである:93.6
 スコアリングマトリックス:BLOSUM62(コンセンサスバタースの推測に使用)

```

Q: 30 KNCVW--GADLVVINTREQDFIIQNLKRNSYFLGLSDPQ---GRRHWQWVDQTFYN
C..LV.I...:EQDF...K...:GL:D...:W.W.D:
H: 1 laCqrekpghlvslgsgeEqdFlqslvkavnywIGLdinkgeptegtWwedGs.lp
ENVTFWHL--SGEPNN-----LDERCAIINFRSSEEWG--WNDIHCHPQKSLC 127
N.T.W..GEPNN..E.C...:...:G.WND.C...:C
vnyCnMakipgePunwrhkggkedCvelytktpkangkwndepCdskskIpyvC 111

```

【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
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/32958 A2(51) International Patent Classification: C07K 14/705,
C12N 15/12, 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/50, 33/53, A61K
48/00, C12N 15/62

(21) International Application Number: PCT/EP01/11812

(22) International Filing Date: 12 October 2001 (12.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/240,096 16 October 2000 (16.10.2000) US
60/314,661 27 August 2001 (27.08.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER
AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); 51368 1 Lev-
erkusen (DE).(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): SMOLYAR, Alex
(US/US); 734 Boylston Street, Brookline, MA 02467
(US).(74) Common Representative: BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT, 51368 Leverkusen (DE).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM), 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, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/32958 A2

(64) Title: REGULATION OF HUMAN DENDRITIC CELL IMMUNORECEPTOR

(57) Abstract: Reagents which regulate human dendritic cell immunoreceptor and reagents which bind to human dendritic cell immunoreceptor gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, cancer, malaria, obesity, diabetes, CNS disorders, and cardiovascular disorders.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 1 -

REGULATION OF HUMAN DENDRITIC CELL IMMUNORECEPTOR

5 This application incorporates by reference co-pending application Serial No. 60/240,056 filed October 16, 2000.

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

10 The invention relates to the area of receptor regulation. More particularly, the invention relates to the regulation of human dendritic cell immunoreceptor.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Dendritic cells (DC) are unique among antigen presenting cells (APC) by virtue of their potent capacity to activate immunologically naive T cells (Steinman, 1991). U.S. Patent No. 6,046,158; Banchereau & Steinman, Nature 1998 Mar 19;392(6673):245-52. DC express constitutively, or after maturation, several molecules that mediate physical interaction with and deliver activation signals to responding T cells. These include class I and class II MHC molecules, CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2), CD40, CD11a/CD18 (LFA-1), and CD54 (ICAM-1) (Steinman, 20 1991; Steinman et al., 1995). DC also secrete, upon stimulation, several T cell-stimulatory cytokines, including IL-1 β , IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and MIP-1 δ . (Matsue et al., 1992; Kitajima et al., 1995; Arizumi et al., 1995; Caux et al., 1994; Heufler et al., 1992; Schreiber et al., 1992; 25 Enk et al., 1992; Mohamadzaeh et al., 1996). Both of these properties, adhesion molecule expression and cytokine production are shared by other APC (e.g., activated macrophages and B cells), which are substantially less competent in activating naive T cells.

30 T cell activation is an important step in the protective immunity against pathogenic microorganisms (e.g., viruses, bacteria, and parasites), foreign proteins, and harmful

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 2 -

chemicals in the environment. T cells express receptors on their surface (*i.e.*, T cell receptors) which recognize antigens presented on the surface of antigen-presenting cells. During a normal immune response, binding of these antigens to the T cell receptor initiates intracellular changes leading to T cell activation. DC express several different adhesion (and costimulatory) molecules, which mediate their interaction with T cells. The combinations of receptors (on DC) and counter-receptors (on T cells) that are known to play this role include: a) class I MHC and CD8, b) class II MHC and CD4, c) CD54 (ICAM-1) and CD11a/CD18 (LFA-1), d) ICAM-3 and CD11a/CD18, e) LFA-3 and CD2, f) CD80 (B7-1) and CD28 (and CTLA4), g) CD86 (B7-2) and CD28 (and CTLA4) and h) CD40 and CD40L (Steinman *et al.*, 1995). Importantly, not only does ligation of these molecules promote physical binding between DC and T cells, it also transduces activation signals.

C-type lectins are a family of glycoproteins that exhibit amino acid sequence similarities in their carbohydrate recognition domains (CRD) and that bind to selected carbohydrates in a Ca^{2+} -dependent manner. C-type lectins have been subdivided into four categories (Vasta *et al.*, 1994; Spiess 1990). The first group comprises type II membrane-integrated proteins, such as asialoglycoprotein receptors, macrophage galactose and N-acetyl glucosamine (GlcNac)-specific lectin, and CD23 (FcRII). Many members in this group exhibit specificity for galactose/fucose, galactosamine/GalNac, or GlcNac residues. The second group includes cartilage and fibroblast proteoglycan core proteins. The third group includes the so-called "collectins" such as serum mannose-binding proteins, pulmonary surfactant protein SP-A, and conglutinin. The fourth group includes certain adhesion molecules which are known as LEC-CAMs (*e.g.*, Mel-14, GMP-140, and ELAM-1).

C-type lectins are known to function as agglutinins, opsonins, complement activators, and cell-associated recognition molecules (Vasia *et al.*, 1994; Spiess 1990; Kery, 1991). For instance, macrophage mannose receptors serve a scavenger function (Shepherd *et al.*, 1990), as well as mediating the uptake of pathogenic

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 3 -

organisms, including *Pneumocystis carinii* (Ezekowitz *et al.*, 1991) and *Candida albicans* (Ezekowitz *et al.*, 1990). Serum mannose-binding protein mimics C1q in its capacity to activate complement through the classical pathway. Importantly, genetic mutations in this lectin predispose for severe recurrent infections, diarrhea, and failure to thrive (Reid *et al.*, 1994). Thus, C-type lectins exhibit diverse functions with biological significance.

Importantly, carbohydrate moieties do not necessarily serve as "natural" ligands for C-type lectins. For example, CD23 (FCRII), which belongs to the C-type lectin family as verified by its binding of Gal-Gal-Nac (Kijimoto-Ochiai *et al.*, 1994) and by its CRD sequence, is now known to recognize IgE in a carbohydrate-independent manner; an enzymatically deglycosylated form of IgE as well as recombinant (non-glycosylated) IgE produced in *E. coli* both bind to CD23 (Vercelli *et al.*, 1989). Thus, some C-type lectins recognize polypeptide sequences in their natural ligands. Even more extreme is the recent hypothesis that a major biological function of lectins is the recognition of polypeptides, instead of carbohydrates, as suggested by the identification, from a random polypeptide library, of several polypeptide ligands for Con A, a prototypic plant lectin (Oldenburg *et al.*, 1992).

Recently, two C-type lectins have been identified on DC surfaces. First, Jiang *et al.* cloned the protein recognized by the NLDC-145 mAb, one of the most widely used mAb against murine DC (Jiang *et al.*, 1995). This protein, now termed DEC-205, was found to be a new member of the C-type-lectin family, one that contains ten distinct CRD. Second, Sallusto *et al.* reported that human DC express macrophage mannose receptors (MMR), which also contain multiple CRD (Sallusto *et al.*, 1995). Both receptors have been proposed to mediate endocytosis of glycosylated molecules by DC, based on the observations that: a) polyclonal rabbit antibodies against DEC-205 not only bound to DEC-205 on DC surfaces, but were subsequently internalized; b) these DC activated effectively a T cell line reactive to rabbit IgG; and c) internalization of FITC dextran by DC was blocked effectively with mannan, a mannose receptor competitor (Jiang *et al.*, 1995; Sallusto *et al.*, 1995). With respect

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 4 -

to cell type specificity, DEC-205 is now known to be also expressed, albeit at lower levels, by B cells and epithelial cells in thymus, intestine, and lung (Witmer-Pack et al., 1995; Inaba et al., 1995) and MMR is also expressed even more abundantly by macrophages (Stahl 1992). Thus, there have been no C-type lectins that are
5 expressed in a DC-specific manner.

Fournier *et al.* have identified FDF03, an inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, is expressed by human dendritic and myeloid cells. *Immunol.* 165(3), 1197-209, 2000. Bates *et al.* have identified a dendritic cell immunoreceptor, DCIR, which is a novel C-Type lectin surface receptor which contains an immunoreceptor
10 tyrosine-based inhibitory motif. *Journal of Immunology* 163, 1973-1983, 1999.

Because it is known that DC are far more potent than other APC in their capacity to activate immunologically naive T cells, it is probable that DC express a protein or
15 proteins which function to activate T cells and which are not expressed by other APCs. Knowledge of the structure of such a protein or proteins would prove quite valuable in many areas. For example, the purified protein(s) could be used to identify its (or their) ligands expressed by T cells. Additionally, antibodies could be raised against the purified protein(s) and used to inhibit DC-mediated T cell
20 activation.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the invention to provide reagents and methods of regulating a
25 human dendritic cell immunoreceptor. This and other objects of the invention are provided by one or more of the embodiments described below.

One embodiment of the invention is a dendritic cell immunoreceptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of
30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 5 -

amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

5

amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15; and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15.

10

Yet another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a dendritic cell immunoreceptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

15

amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

20

amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15; and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15.

25

Binding between the test compound and the dendritic cell immunoreceptor polypeptide is detected. A test compound which binds to the dendritic cell immunoreceptor polypeptide is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the activity of the dendritic cell immunoreceptor.

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 6 -

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a polynucleotide encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 14; and

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 14.

Binding of the test compound to the polynucleotide is detected. A test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the amount of the dendritic cell immunoreceptor through interacting with the dendritic cell immunoreceptor mRNA.

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which regulate extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a dendritic cell immunoreceptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 7 -

amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15; and

5 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15.

A dendritic cell immunoreceptor activity of the polypeptide is detected. A test compound which increases dendritic cell immunoreceptor activity of the polypeptide relative to dendritic cell immunoreceptor activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for increasing extracellular matrix degradation. A test compound which decreases dendritic cell immunoreceptor activity of the polypeptide relative to dendritic cell immunoreceptor activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

15 Even another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a dendritic cell immunoreceptor product of a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

20 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

25 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 14; and

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 14.

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 8 -

Binding of the test compound to the dendritic cell immunoreceptor product is detected. A test compound which binds to the dendritic cell immunoreceptor product is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

5

Still another embodiment of the invention is a method of reducing extracellular matrix degradation. A cell is contacted with a reagent which specifically binds to a polynucleotide encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide or the product encoded by the polynucleotide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

10

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

15

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 14; and

20

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 14.

Dendritic cell immunoreceptor activity in the cell is thereby decreased.

25

The invention thus provides a human dendritic cell immunoreceptor which can be used to identify test compounds which may act, for example, as agonists or antagonists at the receptor's ligand binding site. Human dendritic cell immunoreceptor and fragments thereof also are useful in raising specific antibodies which can block the receptor and effectively reduce its activity.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Fig. 1 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 1)
- 5 Fig. 2 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig.1 (SEQ ID NO: 2).
- 10 Fig. 3 shows the amino acid sequence of the protein identified by the Accession No. AJ133532 (SEQ ID NO: 3).
- Fig. 4 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 4).
- 15 Fig. 5 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 5).
- Fig. 6 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 6).
- 20 Fig. 7 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 7).
- Fig. 8 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 8).
- 25 Fig. 9 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 9).
- 30 Fig. 10 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 10).

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 10 -

- Fig. 11 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 11).
- 5 Fig. 12 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 12).
- Fig. 13 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 13).
- 10 Fig. 14 shows the amino acid sequence of a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 14).
- Fig. 15 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 14).
- 15 Fig. 16 shows the DNA-sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor Polypeptide (SEQ ID NO: 15).
- 20 Fig. 17 shows the BLASTP - alignment of 273_genwisedb against pdb|1DV8|1DV8-A.
- Fig. 18 shows the HMMPFAM - alignment of 273_genwisedb against pfam|hrm|lectin_c.
- 25

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention relates to an isolated polynucleotide encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide and being selected from the group consisting of:

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 11 -

- a) a polynucleotide encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
- amino acid sequences which are at least about 30% identical to
5 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
amino acid sequences which are at least about 30% identical to
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15; and
10 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15;
- b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1, or 14;
- c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b);
- 15 d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code; and
- 20 e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d).

Furthermore, it has been discovered by the present applicant that a novel dendritic cell immunoreceptor, particularly a human dendritic cell immunoreceptor, is a
25 discovery of the present invention. Human dendritic cell immunoreceptor comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2 and 15. A coding sequence for human dendritic cell immunoreceptor is shown in SEQ ID NOS: 1 and 14. Related ESTs (SEQ ID NOS: 4-13) are expressed in lung and liver.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 12 -

Human dendritic cell immunoreceptor is 28% identical over 132 amino acids to the carbohydrate recognition domain "pdb|1DV8|1DV8-A" (Fig. 17). Human dendritic cell immunoreceptor also contains a lectin C-type domain (Fig. 18).

- 5 Human dendritic cell immunoreceptor of the invention is expected to be useful for the same purposes as previously identified receptors of this type. Human dendritic cell immunoreceptor is believed to be useful in therapeutic methods to treat disorders such as cancer, asthma, obesity, diabetes, CNS disorders, and cardiovascular disorders. Human dendritic cell immunoreceptor also can be used to screen for human
10 dendritic cell immunoreceptor agonists and antagonists.

Polypeptides

- Human dendritic cell immunoreceptor polypeptides according to the invention
15 comprise at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, or 134 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or a biologically active variant thereof, as defined below. Human dendritic cell immunoreceptor polypeptides according to the invention comprise at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75,
20 100, 125, or 148 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15 or a biologically active variant thereof, as defined below. A dendritic cell immunoreceptor polypeptide of the invention therefore can be a portion of a dendritic cell immunoreceptor protein, a full-length dendritic cell immunoreceptor protein, or a fusion protein comprising all or a portion of a dendritic cell immunoreceptor protein.

25

Biologically Active Variants

- Human dendritic cell immunoreceptor polypeptide variants which are biologically active, e.g., retain a ligand binding activity, also are dendritic cell immunoreceptor
30 polypeptides. Preferably, naturally or non-naturally occurring dendritic cell immunoreceptor polypeptide variants have amino acid sequences which are at least

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 13 -

about 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, or 70, preferably about 75, 80, 85, 90, 96, 96, or 98% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2 and 15 or a fragment thereof. Percent identity between a putative dendritic cell immunoreceptor polypeptide variant and an amino acid sequence of SEQ ID NOS: 2 and 15 is
5 determined using the Blast2 alignment program (Biosum62, Expect 10, standard genetic codes).

Variations in percent identity can be due, for example, to amino acid substitutions, insertions, or deletions. Amino acid substitutions are defined as one for one amino
10 acid replacements. They are conservative in nature when the substituted amino acid has similar structural and/or chemical properties. Examples of conservative replacements are substitution of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, or a threonine with a serine.

Amino acid insertions or deletions are changes to or within an amino acid sequence. They typically fall in the range of about 1 to 5 amino acids. Guidance in determining which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing
15 biological or immunological activity of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be found using computer programs well known in the art, such as DNASTAR software. Whether an amino acid change results in a biologically active dendritic cell immunoreceptor polypeptide can readily be determined by assaying for ligand
20 binding activity, as described for example, in the specific examples, below.

Fusion Proteins

25 Fusion proteins are useful for generating antibodies against dendritic cell immunoreceptor polypeptide amino acid sequences and for use in various assay systems. For example, fusion proteins can be used to identify proteins which interact with portions of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide. Protein affinity chromatography or
30 library- based assays for protein-protein interactions, such as the yeast two-hybrid or

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 14 -

phage display systems, can be used for this purpose. Such methods are well known in the art and also can be used as drug screens.

- 5 A dendritic cell immunoreceptor polypeptide fusion protein comprises two polypeptide segments fused together by means of a peptide bond. The first polypeptide segment comprises at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, or 134 contiguous amino acids of SEQ ID NO: 2 or of a biologically active variant, such as those described above. A dendritic cell immunoreceptor polypeptide fusion protein
- 10 comprises two polypeptide segments fused together by means of a peptide bond. The first polypeptide segment comprises at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, or 148 contiguous amino acids of SEQ ID NO: 15 or of a biologically active variant, such as those described above. The first polypeptide segment also can comprise full-length dendritic cell immunoreceptor protein.
- 15 The second polypeptide segment can be a full-length protein or a protein fragment. Proteins commonly used in fusion protein construction include β -galactosidase, β -glucuronidase, green fluorescent protein (GFP), autofluorescent proteins, including blue fluorescent protein (BFP), glutathione-S-transferase (GST), luciferase, horseradish peroxidase (HRP), and chloramphenicol acetyltransferase (CAT).
- 20 Additionally, epitope tags are used in fusion protein constructions, including histidine (His) tags, FLAG tags, influenza hemagglutinin (HA) tags, Myc tags, VSV-G tags, and thioredoxin (Trx) tags. Other fusion constructions can include maltose binding protein (MBP), S-tag, Lex a DNA binding domain (DBD) fusions, GAL4 DNA binding domain fusions, and herpes simplex virus (HSV) BP16 protein fusions.
- 25 A fusion protein also can be engineered to contain a cleavage site located between the dendritic cell immunoreceptor polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be cleaved and purified away from the heterologous moiety.
- 30 A fusion protein can be synthesized chemically, as is known in the art. Preferably, a fusion protein is produced by covalently linking two polypeptide segments or by

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 15 -

standard procedures in the art of molecular biology. Recombinant DNA methods can be used to prepare fusion proteins, for example, by making a DNA construct which comprises coding sequences selected from the complement of SEQ ID NOS: 1 and 14 in proper reading frame with nucleotides encoding the second polypeptide segment and expressing the DNA construct in a host cell, as is known in the art. Many kits for constructing fusion proteins are available from companies such as Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), and Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS).

Identification of Species Homologs

Species homologs of human dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be obtained using dendritic cell immunoreceptor polypeptide polynucleotides (described below) to make suitable probes or primers for screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast, identifying cDNAs which encode homologs of dendritic cell immunoreceptor polypeptide, and expressing the cDNAs as is known in the art.

Polynucleotides

A dendritic cell immunoreceptor polynucleotide can be single- or double-stranded and comprises a coding sequence or the complement of a coding sequence for a dendritic cell immunoreceptor polypeptide. A partial coding sequence for human dendritic cell immunoreceptor is shown in SEQ ID NOS: 1 and 14.

Degenerate nucleotide sequences encoding human dendritic cell immunoreceptor polypeptides, as well as homologous nucleotide sequences which are at least about 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NOS: 1 and 14 or its complement also are dendritic cell

immunoreceptor polynucleotides. Percent sequence identity between the sequences of two polynucleotides is determined using computer programs such as ALIGN which employ the FASTA algorithm, using an affine gap search with a gap open penalty of -12 and a gap extension penalty of -2. Complementary DNA (cDNA) molecules, species homologs, and variants of dendritic cell immunoreceptor polynucleotides which encode biologically active dendritic cell immunoreceptor polypeptides also are dendritic cell immunoreceptor polynucleotides.

Identification of Polynucleotide Variants and Homologs

Variants and homologs of the dendritic cell immunoreceptor polynucleotides described above also are dendritic cell immunoreceptor polynucleotides. Typically, homologous dendritic cell immunoreceptor polynucleotide sequences can be identified by hybridization of candidate polynucleotides to known dendritic cell immunoreceptor polynucleotides under stringent conditions, as is known in the art. For example, using the following wash conditions--2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS, room temperature twice, 30 minutes each; then 2X SSC, 0.1% SDS, 50°C once, 30 minutes; then 2X SSC, room temperature twice, 10 minutes each--homologous sequences can be identified which contain at most about 25-30% basepair mismatches. More preferably, homologous nucleic acid strands contain 15-25% basepair mismatches, even more preferably 5-15% basepair mismatches.

Species homologs of the dendritic cell immunoreceptor polynucleotides disclosed herein also can be identified by making suitable probes or primers and screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast. Human variants of dendritic cell immunoreceptor polynucleotides can be identified, for example, by screening human cDNA expression libraries. It is well known that the T_m of a double-stranded DNA decreases by 1-1.5°C with every 1% decrease in homology (Bonner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 81, 123 (1973)). Variants of human dendritic cell immunoreceptor polynucleotides or dendritic cell immunoreceptor poly-

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 17 -

nucleotides of other species can therefore be identified by hybridizing a putative homologous dendritic cell immunoreceptor polynucleotide with a polynucleotide having a nucleotide sequence of SEQ ID NOS: 1 and 14 or the complement thereof to form a test hybrid. The melting temperature of the test hybrid is compared with the melting temperature of a hybrid comprising polynucleotides having perfectly complementary nucleotide sequences, and the number or percent of basepair mismatches within the test hybrid is calculated.

Nucleotide sequences which hybridize to dendritic cell immunoreceptor polynucleotides or their complements following stringent hybridization and/or wash conditions also are dendritic cell immunoreceptor polynucleotides. Stringent wash conditions are well known and understood in the art and are disclosed, for example, in Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2d ed., 1989, at pages 9.50-9.51.

Typically, for stringent hybridization conditions a combination of temperature and salt concentration should be chosen that is approximately 12-20°C below the calculated T_m of the hybrid under study. The T_m of a hybrid between a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide having a nucleotide sequence shown in SEQ ID NOS: 1 and 14 or the complement thereof and a polynucleotide sequence which is at least about 50, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to one of those nucleotide sequences can be calculated, for example, using the equation of Bolton and McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1390 (1962):

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 0.63(\%\text{formamide}) - 600/l,$$
where l = the length of the hybrid in basepairs.

Stringent wash conditions include, for example, 4X SSC at 65°C, or 50% formamide, 4X SSC at 42°C, or 0.5X SSC, 0.1% SDS at 65°C. Highly stringent wash conditions include, for example, 0.2X SSC at 65°C.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 18 -

Preparation of Polynucleotides

A dendritic cell immunoreceptor polynucleotide can be isolated free of other cellular components such as membrane components, proteins, and lipids. Polynucleotides can be made by a cell and isolated using standard nucleic acid purification techniques, or synthesized using an amplification technique, such as the polymerase chain reaction (PCR), or by using an automatic synthesizer. Methods for isolating polynucleotides are routine and are known in the art. Any such technique for obtaining a polynucleotide can be used to obtain isolated dendritic cell immunoreceptor polynucleotides. For example, restriction receptors and probes can be used to isolate polynucleotide fragments which comprises dendritic cell immunoreceptor nucleotide sequences. Isolated polynucleotides are in preparations which are free or at least 70, 80, or 90% free of other molecules.

Human dendritic cell immunoreceptor cDNA molecules can be made with standard molecular biology techniques, using dendritic cell immunoreceptor mRNA as a template. Human dendritic cell immunoreceptor cDNA molecules can thereafter be replicated using molecular biology techniques known in the art and disclosed in manuals such as Sambrook *et al.* (1989). An amplification technique, such as PCR, can be used to obtain additional copies of polynucleotides of the invention, using either human genomic DNA or cDNA as a template.

Alternatively, synthetic chemistry techniques can be used to synthesize dendritic cell immunoreceptor polynucleotides. The degeneracy of the genetic code allows alternate nucleotide sequences to be synthesized which will encode a dendritic cell immunoreceptor polypeptide having, for example, an amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2 and 15 or a biologically active variant thereof.

Extending Polynucleotides

The partial sequence disclosed herein can be used to identify the corresponding full length gene from which it was derived. The partial sequences can be nick-translated or end-labeled with ³²P using polynucleotide kinase using labeling methods known to those with skill in the art (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis *et al.*, eds., Elsevier Press, N.Y., 1986). A lambda library prepared from human tissue can be directly screened with the labeled sequences of interest or the library can be converted en masse to pBluescript (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037) to facilitate bacterial colony screening (see Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989, pg. 1.20).

Both methods are well known in the art. Briefly, filters with bacterial colonies containing the library in pBluescript or bacterial lawns containing lambda plaques are denatured, and the DNA is fixed to the filters. The filters are hybridized with the labeled probe using hybridization conditions described by Davis *et al.*, 1986. The partial sequences, cloned into lambda or pBluescript, can be used as positive controls to assess background binding and to adjust the hybridization and washing stringencies necessary for accurate clone identification. The resulting autoradiograms are compared to duplicate plates of colonies or plaques; each exposed spot corresponds to a positive colony or plaque. The colonies or plaques are selected, expanded and the DNA is isolated from the colonies for further analysis and sequencing.

Positive cDNA clones are analyzed to determine the amount of additional sequence they contain using PCR with one primer from the partial sequence and the other primer from the vector. Clones with a larger vector-insert PCR product than the original partial sequence are analyzed by restriction digestion and DNA sequencing to determine whether they contain an insert of the same size or similar as the mRNA size determined from Northern blot Analysis.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 20 -

Once one or more overlapping cDNA clones are identified, the complete sequence of the clones can be determined, for example after exonuclease III digestion (McCombie *et al.*, *Methods* 3, 33-40, 1991). A series of deletion clones are
5 generated, each of which is sequenced. The resulting overlapping sequences are assembled into a single contiguous sequence of high redundancy (usually three to five overlapping sequences at each nucleotide position), resulting in a highly accurate final sequence.

10 Various PCR-based methods can be used to extend the nucleic acid sequences disclosed herein to detect upstream sequences such as promoters and regulatory elements. For example, restriction-site PCR uses universal primers to retrieve unknown sequence adjacent to a known locus (Sarkar, *PCR Methods Applic.* 2, 318-322, 1993). Genomic DNA is first amplified in the presence of a primer to a linker
15 sequence and a primer specific to the known region. The amplified sequences are then subjected to a second round of PCR with the same linker primer and another specific primer internal to the first one. Products of each round of PCR are transcribed with an appropriate RNA polymerase and sequenced using reverse transcriptase.

20 Inverse PCR also can be used to amplify or extend sequences using divergent primers based on a known region (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16, 8186, 1988). Primers can be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), to be 22-30
25 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68-72°C. The method uses several restriction receptors to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a PCR template.

30 Another method which can be used is capture PCR, which involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and yeast

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 21 -

artificial chromosome DNA (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic. 1*, 111-119, 1991). In this method, multiple restriction receptor digestions and ligations also can be used to place an engineered double-stranded sequence into an unknown fragment of the DNA molecule before performing PCR.

5

Another method which can be used to retrieve unknown sequences is that of Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res. 19*, 3055-3060, 1991). Additionally, PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) can be used to walk genomic DNA (CLONTECH, Palo Alto, Calif.). This process avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions.

10

When screening for full-length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. Randomly-primed libraries are preferable, in that they will contain more sequences which contain the 5' regions of genes. Use of a randomly primed library may be especially preferable for situations in which an oligo d(T) library does not yield a full-length cDNA. Genomic libraries can be useful for extension of sequence into 5' non-transcribed regulatory regions.

15

Commercially available capillary electrophoresis systems can be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of PCR or sequencing products. For example, capillary sequencing can employ flowable polymers for electrophoretic separation, four different fluorescent dyes (one for each nucleotide) which are laser activated, and detection of the emitted wavelengths by a charge coupled device camera. Output/light intensity can be converted to electrical signal using appropriate software (*e.g.* GENOTYPER and Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), and the entire process from loading of samples to computer analysis and electronic data display can be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for the sequencing of small pieces of DNA which might be present in limited amounts in a particular sample.

20

25

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 22 -

Obtaining Polypeptides

Human dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be obtained, for example, by purification from human cells, by expression of dendritic cell immunoreceptor polynucleotides, or by direct chemical synthesis.

Protein Purification

Human dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be purified from any cell which expresses the receptor, including host cells which have been transfected with dendritic cell immunoreceptor expression constructs. A purified dendritic cell immunoreceptor polypeptide is separated from other compounds which normally associate with the dendritic cell immunoreceptor polypeptide in the cell, such as certain proteins, carbohydrates, or lipids, using methods well-known in the art. Such methods include, but are not limited to, size exclusion chromatography, ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and preparative gel electrophoresis. A preparation of purified dendritic cell immunoreceptor polypeptides is at least 80% pure; preferably, the preparations are 90%, 95%, or 99% pure. Purity of the preparations can be assessed by any means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Expression of Polynucleotides

To express a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide, the polynucleotide can be inserted into an expression vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing sequences encoding dendritic cell immunoreceptor polypeptides and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described, for example, in Sambrook *et*

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 23 -

et al. (1989) and in Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

5 A variety of expression vector/host systems can be utilized to contain and express sequences encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide. These include, but are not limited to, microorganisms, such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors, insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus), plant cell systems transformed with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids), or animal cell systems.

15 The control elements or regulatory sequences are those non-translated regions of the vector -- enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions -- which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements can vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, can be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, LaJolla, Calif.) or pSPORT1 plasmid (Life Technologies) and the like can be used. The baculovirus polyhedrin promoter can be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from the genomes of plant cells (e.g., heat shock, RUBISCO, and storage protein genes) or from plant viruses (e.g., viral promoters or leader sequences) can be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are preferable. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of a nucleotide sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, vectors based on SV40 or EBV can be used with an appropriate selectable marker.

Bacterial and Yeast Expression Systems

In bacterial systems, a number of expression vectors can be selected depending upon the use intended for the dendritic cell immunoreceptor polypeptide. For example, when a large quantity of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide is needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified can be used. Such vectors include, but are not limited to, multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene). In a BLUESCRIPT vector, a sequence encoding the dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of β -galactosidase so that a hybrid protein is produced. pDN vectors (Van Hoeske & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989) or pGEX vectors (Promega, Madison, Wis.) also can be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems can be designed to include heparin, thrombin, or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH can be used. For reviews, see Ausubel *et al.* (1989) and Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987.

Plant and Insect Expression Systems

If plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be driven by any of a number of promoters.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 25 -

For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV can be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, 1987). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters can be used (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, *Science* 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991). These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or by pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (e.g., Hobbs or Murray, in MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196, 1992).

An insect system also can be used to express a dendritic cell immunoreceptor polypeptide. For example, in one such system *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. Sequences encoding dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of dendritic cell immunoreceptor polypeptides will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses can then be used to infect *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be expressed (Engelhard *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994).

Mammalian Expression Systems

A number of viral-based expression systems can be used to express dendritic cell immunoreceptor polypeptides in mammalian host cells. For example, if an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be ligated into an adenovirus transcription/translation complex comprising the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome can be used to obtain a viable virus

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 26 -

which is capable of expressing a dendritic cell immunoreceptor polypeptide in infected host cells (Logan & Shetuk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, 1984). If desired, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, can be used to increase expression in mammalian host cells.

5

Human artificial chromosomes (HACs) also can be used to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid. HACs of 6M to 10M are constructed and delivered to cells via conventional delivery methods (e.g., liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles).

10

Specific initiation signals also can be used to achieve more efficient translation of sequences encoding dendritic cell immunoreceptor polypeptides. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals (including the ATG initiation codon) should be provided. The initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons can be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression can be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used (see Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, 1994).

15

20

25

Host Cells

A host cell strain can be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed dendritic cell immunoreceptor polypeptide in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation,

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 27 -

lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the polypeptide also can be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (e.g., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38), are available from the American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) and can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

Stable expression is preferred for long-term, high-yield production of recombinant proteins. For example, cell lines which stably express dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be transformed using expression vectors which can contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells can be allowed to grow for 1-2 days in an enriched medium before they are switched to a selective medium. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced dendritic cell immunoreceptor sequences. Resistant clones of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type. See, for example, ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, ed., 1986.

Any number of selection systems can be used to recover transformed cell lines.

These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler *et al.*, *Cell* 11, 223-32, 1977) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, *Cell* 22, 817-23, 1980) genes which can be employed in *tk* or *aprt* cells, respectively. Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980), *neo* confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14, 1981), and *als* and *pat* confer resistance to chlorsulfuron and phosphinoctricin

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 28 -

acetyltransferase, respectively (Murray, 1992, *supra*). Additional selectable genes have been described. For example, *trpB* allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-51, 1988). Visible markers such as anthocyanins, β -glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, can be used to identify transformants and to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

10 Detecting Expression

Although the presence of marker gene expression suggests that the dendritic cell immunoreceptor polynucleotide is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if a sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences which encode a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the dendritic cell immunoreceptor polynucleotide.

Alternatively, host cells which contain a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide and which express a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane, solution, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein. For example, the presence of a polynucleotide sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization or amplification using probes or fragments or fragments of poly-

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 29 -

nucleotides encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide. Nucleic acid amplification-based assays involve the use of oligonucleotides selected from sequences encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide to detect transformants which contain a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide.

5

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the polypeptide, are known in the art. Examples include receptor-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay using monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be used, or a competitive binding assay can be employed. These and other assays are described in Hampton *et al.*, SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990) and Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983).

10

15

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding dendritic cell immunoreceptor polypeptides include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, sequences encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and can be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of labeled nucleotides and an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6. These procedures can be conducted using a variety of commercially available kits (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, and US Biochemical). Suitable reporter molecules or labels which can be used for ease of detection include radionuclides, receptors, and fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

20

25

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 30 -

Expression and Purification of Polypeptides

5 Host cells transformed with nucleotide sequences encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The polypeptide produced by a transformed cell can be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be designed to contain signal sequences which direct secretion of soluble dendritic cell immunoreceptor polypeptides through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane or which direct the membrane insertion of membrane-bound dendritic cell immunoreceptor polypeptide.

10

15 As discussed above, other constructions can be used to join a sequence encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide to a nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor Xa or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and the dendritic cell immunoreceptor polypeptide also can be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing a dendritic cell immunoreceptor polypeptide and 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification by IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography, as described in Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992), while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the dendritic cell

20

25

30

immunoreceptor polypeptide from the fusion protein. Vectors which contain fusion proteins are disclosed in Kroll *et al.*, *DN_A Cell Biol.* 12, 441-453, 1993.

Chemical Synthesis

5 Sequences encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn *et al.* *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980). Alternatively, a dendritic cell immunoreceptor polypeptide
10 itself can be produced using chemical methods to synthesize its amino acid sequence, such as by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roherge *et al.*, *Science* 269, 202-204, 1995). Protein synthesis can be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis can be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A
15 Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Optionally, fragments of dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule.

The newly synthesized peptide can be substantially purified by preparative high
20 performance liquid chromatography (*e.g.*, Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The composition of a synthetic dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be confirmed by amino acid analysis or sequencing (*e.g.*, the Edman degradation procedure; *see* Creighton, *supra*). Additionally, any portion of the amino acid
25 sequence of the dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a fusion protein.

Production of Altered Polypeptides

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce dendritic cell immunoreceptor polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce an RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

The nucleotide sequences disclosed herein can be engineered using methods generally known in the art to alter dendritic cell immunoreceptor polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the polypeptide or mRNA product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, introduce mutations, and so forth.

Antibodies

Any type of antibody known in the art can be generated to bind specifically to an epitope of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide. "Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv, which are capable of binding an epitope of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide. Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. However, epitopes which involve non-contiguous amino acids may require more, e.g., at least 15, 25, or 50 amino acids.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 33 -

An antibody which specifically binds to an epitope of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be used therapeutically, as well as in immunochemical assays, such as Western blots, ELISAs, radioimmunoassays, immunohistochemical assays, immunoprecipitations, or other immunochemical assays known in the art.

5 Various immunoassays can be used to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between an immunogen and an antibody which specifically binds to the immunogen.

10

Typically, an antibody which specifically binds to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20-fold higher than a detection signal provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies which specifically bind to dendritic cell immunoreceptor polypeptides do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate a dendritic cell immunoreceptor polypeptide from solution.

15

Human dendritic cell immunoreceptor polypeptides can be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human, to produce polyclonal antibodies. If desired, a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be conjugated to a carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g., lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

20

25

30

Monoclonal antibodies which specifically bind to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be prepared using any technique which provides for the production

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 34 -

of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 311, 452-454, 1985). Monoclonal and other antibodies also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly in therapy or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences can be minimized by replacing residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual residues or by grafting of entire complementarity determining regions. Alternatively, humanized antibodies can be produced using recombinant methods, as described in GB2188638B. Antibodies which specifically bind to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can contain antigen binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. 5,565,332.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies which specifically bind to dendritic cell immunoreceptor polypeptides. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 35 -

Single-chain antibodies also can be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Single-chain antibodies can be mono- or bispecific, and can be bivalent or tetravalent. Construction of tetravalent, bispecific single-chain antibodies is taught, for example, in Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. Construction of bivalent, bispecific single-chain antibodies is taught in Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence, as described below. Alternatively, single-chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage technology (Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91).

Antibodies which specifically bind to dendritic cell immunoreceptor polypeptides also can be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).

Other types of antibodies can be constructed and used therapeutically in methods of the invention. For example, chimeric antibodies can be constructed as disclosed in WO 93/03151. Binding proteins which are derived from immunoglobulins and which are multivalent and multispecific, such as the "diabodies" described in WO 94/13804, also can be prepared.

Antibodies according to the invention can be purified by methods well known in the art. For example, antibodies can be affinity purified by passage over a column to

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 36 -

which a dendritic cell immunoreceptor polypeptide is bound. The bound antibodies can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

Antisense Oligonucleotides

5 Antisense oligonucleotides are nucleotide sequences which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. Once introduced into a cell, the complementary nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form complexes and block either transcription or translation. Preferably, an antisense oligonucleotide is at least 11 nucleotides in length, but can be at least 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 10 or 50 or more nucleotides long. Longer sequences also can be used. Antisense oligonucleotide molecules can be provided in a DNA construct and introduced into a cell as described above to decrease the level of dendritic cell immunoreceptor gene products in the cell.

15 Antisense oligonucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, or a combination of both. Oligonucleotides can be synthesized manually or by an automated synthesizer, by covalently linking the 5' end of one nucleotide with the 3' end of another nucleotide with non-phosphodiester internucleotide linkages such 20 alkylphosphonates, phosphorothioates, phosphorodithioates, alkylphosphonothioates, alkylphosphonates, phosphoramidates, phosphate esters, carbamates, acetamidate, carboxymethyl esters, carbonates, and phosphate triesters. See Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990.

25 Modifications of dendritic cell immunoreceptor gene expression can be obtained by designing antisense oligonucleotides which will form duplexes to the control, 5', or regulatory regions of the dendritic cell immunoreceptor gene. Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g., between positions -10 and +10 30 from the start site, are preferred. Similarly, inhibition can be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 37 -

inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or chaperons. Therapeutic advances using triplex DNA have been described in the literature (*e.g.*, Gee *et al.*, in Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). An antisense oligonucleotide also can be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Precise complementarity is not required for successful complex formation between an antisense oligonucleotide and the complementary sequence of a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide. Antisense oligonucleotides which comprise, for example, 2, 3, 4, or 5 or more stretches of contiguous nucleotides which are precisely complementary to a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide, each separated by a stretch of contiguous nucleotides which are not complementary to adjacent dendritic cell immunoreceptor nucleotides, can provide sufficient targeting specificity for dendritic cell immunoreceptor mRNA. Preferably, each stretch of complementary contiguous nucleotides is at least 4, 5, 6, 7, or 8 or more nucleotides in length. Non-complementary intervening sequences are preferably 1, 2, 3, or 4 nucleotides in length. One skilled in the art can easily use the calculated melting point of an antisense-sense pair to determine the degree of mismatching which will be tolerated between a particular antisense oligonucleotide and a particular dendritic cell immunoreceptor polynucleotide sequence.

Antisense oligonucleotides can be modified without affecting their ability to hybridize to a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide. These modifications can be internal or at one or both ends of the antisense molecule. For example, internucleoside phosphate linkages can be modified by adding cholesteryl or diamine moieties with varying numbers of carbon residues between the amino groups and terminal ribose. Modified bases and/or sugars, such as arabinose instead of ribose, or a 3', 5'-substituted oligonucleotide in which the 3' hydroxyl group or the 5' phosphate group are substituted, also can be employed in a modified antisense oligonucleotide. These modified oligonucleotides can be prepared by methods well known in the art.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 38 -

See, e.g., Agrawal *et al.*, *Trends Biotechnol.* 10, 152-158, 1992; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542, 1987.

5 Ribozymes

Ribozymes are RNA molecules with catalytic activity. See, e.g., Cech, *Science* 236, 1532-1539; 1987; Cech, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543-568; 1990; Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605-609; 1992; Couture & Stinchcomb, *Trends Genet.* 12, 510-515, 1996. Ribozymes can be used to inhibit gene function by cleaving an RNA sequence, as is known in the art (e.g., Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673). The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Examples include engineered hammerhead motif-ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of specific nucleotide sequences.

The coding sequence of a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide can be used to generate ribozymes which will specifically bind to mRNA transcribed from the dendritic cell immunoreceptor polynucleotide. Methods of designing and constructing ribozymes which can cleave other RNA molecules in trans in a highly sequence specific manner have been developed and described in the art (see Haseloff *et al.*, *Nature* 334, 585-591, 1988). For example, the cleavage activity of ribozymes can be targeted to specific RNAs by engineering a discrete "hybridization" region into the ribozyme. The hybridization region contains a sequence complementary to the target RNA and thus specifically hybridizes with the target (see, for example, Gerlach *et al.*, EP 321,201).

Specific ribozyme cleavage sites within a dendritic cell immunoreceptor RNA target can be identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences: GUA, GUU, and GUC. Once identified, short

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 39 -

RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target RNA containing the cleavage site can be evaluated for secondary structural features which may render the target inoperable. Suitability of candidate dendritic cell immunoreceptor RNA targets also can be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays. Longer complementary sequences can be used to increase the affinity of the hybridization sequence for the target. The hybridizing and cleavage regions of the ribozyme can be integrally related such that upon hybridizing to the target RNA through the complementary regions, the catalytic region of the ribozyme can cleave the target.

Ribozymes can be introduced into cells as part of a DNA construct. Mechanical methods, such as microinjection, liposome-mediated transfection, electroporation, or calcium phosphate precipitation, can be used to introduce a ribozyme-containing DNA construct into cells in which it is desired to decrease dendritic cell immunoreceptor expression. Alternatively, if it is desired that the cells stably retain the DNA construct, the construct can be supplied on a plasmid and maintained as a separate element or integrated into the genome of the cells, as is known in the art. A ribozyme-encoding DNA construct can include transcriptional regulatory elements, such as a promoter element, an enhancer or UAS element, and a transcriptional terminator signal, for controlling transcription of ribozymes in the cells.

As taught in Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673, ribozymes can be engineered so that ribozyme expression will occur in response to factors which induce expression of a target gene. Ribozymes also can be engineered to provide an additional level of regulation, so that destruction of mRNA occurs only when both a ribozyme and a target gene are induced in the cells.

Differentially Expressed Genes

Described herein are methods for the identification of genes whose products interact with human dendritic cell immunoreceptor. Such genes may represent genes which are differentially expressed in disorders including, but not limited to, cancer, asthma, obesity, diabetes, CNS disorders, and cardiovascular disorders. Further, such genes may represent genes which are differentially regulated in response to manipulations relevant to the progression or treatment of such diseases. Additionally, such genes may have a temporally modulated expression, increased or decreased at different stages of tissue or organism development. A differentially expressed gene may also have its expression modulated under control versus experimental conditions. In addition, the human dendritic cell immunoreceptor gene or gene product may itself be tested for differential expression.

The degree to which expression differs in a normal versus a diseased state need only be large enough to be visualized via standard characterization techniques such as differential display techniques. Other such standard characterization techniques by which expression differences may be visualized include but are not limited to, quantitative RT (reverse transcriptase), PCR, and Northern analysis.

Identification of Differentially Expressed Genes

To identify differentially expressed genes total RNA or, preferably, mRNA is isolated from tissues of interest. For example, RNA samples are obtained from tissues of experimental subjects and from corresponding tissues of control subjects. Any RNA isolation technique which does not select against the isolation of mRNA may be utilized for the purification of such RNA samples. See, for example, Ausubel *et al.*, ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993. Large numbers of tissue samples may readily be processed using techniques well known to those of skill in the art, such as, for example, the single-step RNA isolation process of Chomczynski, U.S. Patent 4,843,155.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 41 -

Transcripts within the collected RNA samples which represent RNA produced by differentially expressed genes are identified by methods well known to those of skill in the art. They include, for example, differential screening (Tedder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 208-12, 1988), subtractive hybridization (Hedrick *et al.*, *Nature* 308, 149-53; Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2825, 1984), and, preferably, differential display (Liang & Pardee, *Science* 257, 967-71, 1992; U.S. Patent 5,262,311).

The differential expression information may itself suggest relevant methods for the treatment of disorders involving the human dendritic cell immunoreceptor. For example, treatment may include a modulation of expression of the differentially expressed genes and/or the gene encoding the human dendritic cell immunoreceptor. The differential expression information may indicate whether the expression or activity of the differentially expressed gene or gene product or the human dendritic cell immunoreceptor gene or gene product are up-regulated or down-regulated.

Screening Methods

The invention provides assays for screening test compounds which bind to or modulate the activity of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide or a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide. A test compound preferably binds to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide or polynucleotide. More preferably, a test compound decreases or increases dendritic cell immunoreceptor activity by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the test compound.

Test Compounds

Test compounds can be pharmacologic agents already known in the art or can be compounds previously unknown to have any pharmacological activity. The com-

pounds can be naturally occurring or designed in the laboratory. They can be isolated from microorganisms, animals, or plants, and can be produced recombinantly, or synthesized by chemical methods known in the art. If desired, test compounds can be obtained using any of the numerous combinatorial library methods known in the art, including but not limited to, biological libraries, spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries, synthetic library methods requiring deconvolution, the "one-bead one compound" library method, and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to polypeptide libraries, while the other four approaches are applicable to polypeptide, non-peptide oligomer, or small molecule libraries of compounds. See Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Methods for the synthesis of molecular libraries are well known in the art (see, for example, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994). Libraries of compounds can be presented in solution (see, e.g., Troughten, *BioTechniques* 13, 412-421, 1992), or on beads (Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacteria or spores (Ladner, U.S. Patent 5,223,409), plasmids (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992), or phage (Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; and Ladner, U.S. Patent 5,223,409).

High Throughput Screening

Test compounds can be screened for the ability to bind to dendritic cell immunoreceptor polypeptides or polynucleotides or to affect dendritic cell immunoreceptor activity or dendritic cell immunoreceptor gene expression using high throughput screening. Using high throughput screening, many discrete compounds can be tested

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 43 -

in parallel so that large numbers of test compounds can be quickly screened. The most widely established techniques utilize 96-well microtiter plates. The wells of the microtiter plates typically require assay volumes that range from 50 to 500 μ l. In addition to the plates, many instruments, materials, pipettors, robotics, plate washers, and plate readers are commercially available to fit the 96-well format.

Alternatively, "free format assays," or assays that have no physical barrier between samples, can be used. For example, an assay using pigment cells (melanocytes) in a simple homogeneous assay for combinatorial peptide libraries is described by Jayawickreme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994). The cells are placed under agarose in petri dishes, then beads that carry combinatorial compounds are placed on the surface of the agarose. The combinatorial compounds are partially released the compounds from the beads. Active compounds can be visualized as dark pigment areas because, as the compounds diffuse locally into the gel matrix, the active compounds cause the cells to change colors.

Another example of a free format assay is described by Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches," reported at the First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 7-10, 1995). Chelsky placed a simple homogenous receptor assay for carbonic anhydrase inside an agarose gel such that the receptor in the gel would cause a color change throughout the gel. Thereafter, beads carrying combinatorial compounds via a photolinker were placed inside the gel and the compounds were partially released by UV-light. Compounds that inhibited the receptor were observed as local zones of inhibition having less color change.

Yet another example is described by Salmon *et al.*, *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). In this example, combinatorial libraries were screened for compounds that had cytotoxic effects on cancer cells growing in agar.

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 44 -

Another high throughput screening method is described in Beutel *et al.*, U.S. Patent 5,976,813. In this method, test samples are placed in a porous matrix. One or more assay components are then placed within, on top of, or at the bottom of a matrix such as a gel, a plastic sheet, a filter, or other form of easily manipulated solid support.

5 When samples are introduced to the porous matrix they diffuse sufficiently slowly, such that the assays can be performed without the test samples running together.

Binding Assays

10 For binding assays, the test compound is preferably a small molecule which binds to and occupies, for example, the ligand binding site of the dendritic cell immunoreceptor polypeptide, such that normal biological activity is prevented. Examples of such small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules.

15 In binding assays, either the test compound or the dendritic cell immunoreceptor polypeptide can comprise a detectable label, such as a fluorescent, radioisotopic, chemiluminescent, or enzymatic label, such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase. Detection of a test compound which is bound to the dendritic cell immunoreceptor polypeptide can then be accomplished, for example, by direct counting of radioemission, by scintillation counting, or by determining conversion of an appropriate substrate to a detectable product.

20 Alternatively, binding of a test compound to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be determined without labeling either of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect binding of a test compound with a dendritic cell immunoreceptor polypeptide. A microphysiometer (e.g., Cytosensor™) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a test compound

25

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 45 -

and a dendritic cell immunoreceptor polypeptide (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

5 Determining the ability of a test compound to bind to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide also can be accomplished using a technology such as real-time Bimolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991, and Szabo *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995). BIA is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIAcore™). Changes in the optical phenomenon surface
10 plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

In yet another aspect of the invention, a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be used as a "bait protein" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, *e.g.*,
15 U.S. Patent 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, *BioTechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; and Brent WO94/10300), to identify other proteins which bind to or interact with the dendritic cell immunoreceptor polypeptide and modulate its activity.

20 The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. For example, in one construct, polynucleotide encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be fused to a polynucleotide encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*,
25 GAL-4). In the other construct a DNA sequence that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") can be fused to a polynucleotide that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact *in vivo* to form a protein-dependent complex, the DNA-binding and
30 activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ), which is operably

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 46 -

linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected, and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the DNA sequence encoding the protein which interacts with the dendritic cell immunoreceptor polypeptide.

It may be desirable to immobilize either the dendritic cell immunoreceptor polypeptide (or polynucleotide) or the test compound to facilitate separation of bound from unbound forms of one or both of the interactants, as well as to accommodate automation of the assay. Thus, either the dendritic cell immunoreceptor polypeptide (or polynucleotide) or the test compound can be bound to a solid support. Suitable solid supports include, but are not limited to, glass or plastic slides, tissue culture plates, microtiter wells, tubes, silicon chips, or particles such as beads (including, but not limited to, latex, polystyrene, or glass beads). Any method known in the art can be used to attach the receptor polypeptide (or polynucleotide) or test compound to a solid support, including use of covalent and non-covalent linkages, passive absorption, or pairs of binding moieties attached respectively to the polypeptide (or polynucleotide) or test compound and the solid support. Test compounds are preferably bound to the solid support in an array, so that the location of individual test compounds can be tracked. Binding of a test compound to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide (or polynucleotide) can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and microcentrifuge tubes.

In one embodiment, the dendritic cell immunoreceptor polypeptide is a fusion protein comprising a domain that allows the dendritic cell immunoreceptor polypeptide to be bound to a solid support. For example, glutathione-S-transferase fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) or glutathione derivatized microtiter plates, which are then combined with the test compound or the test compound and the non-adsorbed dendritic cell immunoreceptor polypeptide; the mixture is then incubated under conditions conducive to complex

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 47 -

formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components. Binding of the interactants can be determined either directly or indirectly, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the solid support before binding is determined.

Other techniques for immobilizing proteins or polynucleotides on a solid support also can be used in the screening assays of the invention. For example, either a dendritic cell immunoreceptor polypeptide (or polynucleotide) or a test compound can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated dendritic cell immunoreceptor polypeptides (or polynucleotides) or test compounds can be prepared from biotin-NHS(N-hydroxysuccinimide) using techniques well known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which specifically bind to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, polynucleotide, or a test compound, but which do not interfere with a desired binding site, such as the ligand binding site of the dendritic cell immunoreceptor polypeptide, can be derivatized to the wells of the plate. Unbound target or protein can be trapped in the wells by antibody conjugation.

Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies which specifically bind to the dendritic cell immunoreceptor polypeptide or test compound, receptor-linked assays which rely on detecting an activity of the dendritic cell immunoreceptor polypeptide, and SDS gel electrophoresis under non-reducing conditions.

Screening for test compounds which bind to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide or polynucleotide also can be carried out in an intact cell. Any cell which comprises a dendritic cell immunoreceptor polypeptide or polynucleotide can be used in a cell-based assay system. A dendritic cell immunoreceptor polynucleo-

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 43 -

lide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Binding of the test compound to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide or polynucleotide is determined as described above.

5 Functional Assays

Test compounds can be tested for the ability to increase or decrease a biological effect of a human dendritic cell immunoreceptor polypeptide. Such biological effects can be determined using the functional assays described in the specific examples, below. Functional assays can be carried out after contacting either a purified polypeptide, a cell membrane preparation, or an intact cell with a test compound. A test compound which decreases a functional activity of a human dendritic cell immunoreceptor polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential agent for decreasing the activity of a human dendritic cell immunoreceptor polypeptide. A test compound which increases a functional activity by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential agent for increasing the activity of a human dendritic cell immunoreceptor polypeptide.

20 Gene Expression

In another embodiment, test compounds which increase or decrease dendritic cell immunoreceptor gene expression are identified. A dendritic cell immunoreceptor polynucleotide is contacted with a test compound, and the expression of an RNA or polypeptide product of the dendritic cell immunoreceptor polynucleotide is determined. The level of expression of appropriate mRNA or polypeptide in the presence of the test compound is compared to the level of expression of mRNA or polypeptide in the absence of the test compound. The test compound can then be identified as a modulator of expression based on this comparison. For example, when expression of mRNA or polypeptide is greater in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as a stimulator or

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 49 -

enhancer of the mRNA or polypeptide expression. Alternatively, when expression of the mRNA or polypeptide is less in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as an inhibitor of the mRNA or polypeptide expression.

5

The level of dendritic cell immunoreceptor mRNA or polypeptide expression in the cells can be determined by methods well known in the art for detecting mRNA or polypeptide. Either qualitative or quantitative methods can be used. The presence of polypeptide products of a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide can be determined, for example, using a variety of techniques known in the art, including immunochemical methods such as radioimmunoassay, Western blotting, and immunohistochemistry. Alternatively, polypeptide synthesis can be determined *in vivo*, in a cell culture, or in an *in vitro* translation system by detecting incorporation of labeled amino acids into a dendritic cell immunoreceptor polypeptide.

10

Such screening can be carried out either in a cell-free assay system or in an intact cell. Any cell which expresses a dendritic cell immunoreceptor polynucleotide can be used in a cell-based assay system. The dendritic cell immunoreceptor polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Either a primary culture or an established cell line, such as CHO or human embryonic kidney 293 cells, can be used.

15

Pharmaceutical Compositions

The invention also provides pharmaceutical compositions which can be administered to a patient to achieve a therapeutic effect. Pharmaceutical compositions of the invention can comprise, for example, a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, dendritic cell immunoreceptor polynucleotide, ribozymes or antisense oligonucleotides, antibodies which specifically bind to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, or mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide activity. The compositions can be administered alone or in

20

25

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 50 -

combination with at least one other agent, such as stabilizing compound, which can be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions can be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs or hormones.

In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions can contain suitable pharmaceutically-acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Pharmaceutical compositions of the invention can be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, parenteral, topical, sublingual, or rectal means. Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, or sodium carboxymethylcellulose; gums including arabic and tragacanth; and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents can be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate.

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 51 -

Dragee cores can be used in conjunction with suitable coatings, such as concentrated sugar solutions, which also can contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dycestuffs or pigments can be added to the tablets or dragee coatings for product identification or to characterize the quantity of active compound, *i.e.*, dosage.

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds can be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration can be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions can contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspensions of the active compounds can be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Non-lipid polycationic amino polymers also can be used for delivery. Optionally, the suspension also can contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. For topical or nasal administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

30

The pharmaceutical compositions of the present invention can be manufactured in a manner that is known in the art, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. The pharmaceutical composition can be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to, hydrochloric, 5 sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation can be a lyophilized powder which can contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7% 10 mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, that is combined with buffer prior to use.

Further details on techniques for formulation and administration can be found in the latest edition of REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). After pharmaceutical compositions have been prepared, they can be 15 placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. Such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

Therapeutic Indications and Methods

20 Human dendritic cell immunoreceptor can be regulated to treat cancer, asthma, obesity, diabetes, CNS disorders, and cardiovascular disorders.

Cancer is a disease fundamentally caused by oncogenic cellular transformation. 25 There are several hallmarks of transformed cells that distinguish them from their normal counterparts and underlie the pathophysiology of cancer. These include uncontrolled cellular proliferation, unresponsiveness to normal death-inducing signals (immortalization), increased cellular motility and invasiveness, increased ability to recruit blood supply through induction of new blood vessel formation 30 (angiogenesis), genetic instability, and dysregulated gene expression. Various combinations of these aberrant physiologies, along with the acquisition of drug-

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 53 -

resistance frequently lead to an intractable disease state in which organ failure and patient death ultimately ensue.

5 Most standard cancer therapies target cellular proliferation and rely on the differential proliferative capacities between transformed and normal cells for their efficacy. This approach is hindered by the facts that several important normal cell types are also highly proliferative and that cancer cells frequently become resistant to these agents. Thus, the therapeutic indices for traditional anti-cancer therapies rarely exceed 2.0.

10 The advent of genomics-driven molecular target identification has opened up the possibility of identifying new cancer-specific targets for therapeutic intervention that will provide safer, more effective treatments for cancer patients. Thus, newly discovered tumor-associated genes and their products can be tested for their role(s) in disease and used as tools to discover and develop innovative therapies. Genes playing important roles in any of the physiological processes outlined above can be characterized as cancer targets.

20 Genes or gene fragments identified through genomics can readily be expressed in one or more heterologous expression systems to produce functional recombinant proteins. These proteins are characterized *in vitro* for their biochemical properties and then used as tools in high-throughput molecular screening programs to identify chemical modulators of their biochemical activities. Agonists and/or antagonists of target protein activity can be identified in this manner and subsequently tested in cellular and *in vivo* disease models for anti-cancer activity. Optimization of lead compounds with iterative testing in biological models and detailed pharmacokinetic and toxicological analyses form the basis for drug development and subsequent testing in humans.

30 *Allergy, anaphylaxis, asthma and inflammation.* Allergy is a complex process in which environmental antigens induce clinically adverse reactions. The inducing

antigens, called allergens, typically elicit a specific IgE response and, although in most cases the allergens themselves have little or no intrinsic toxicity, they induce pathology when the IgE response in turn elicits an IgE-dependent or T cell-dependent hypersensitivity reaction. Hypersensitivity reactions can be local or systemic and typically occur within minutes of allergen exposure in individuals who have previously been sensitized to an allergen. The hypersensitivity reaction of allergy develops when the allergen is recognized by IgE antibodies bound to specific receptors on the surface of effector cells, such as mast cells, basophils, or eosinophils, which causes the activation of the effector cells and the release of mediators that produce the acute signs and symptoms of the reactions. Allergic diseases include asthma, allergic rhinitis (hay fever), atopic dermatitis, and anaphylaxis.

Asthma is thought to arise as a result of interactions between multiple genetic and environmental factors and is characterized by three major features: 1) intermittent and reversible airway obstruction caused by bronchoconstriction, increased mucus production, and thickening of the walls of the airways that leads to a narrowing of the airways, 2) airway hyperresponsiveness caused by a decreased control of airway caliber, and 3) airway inflammation. Certain cells are critical to the inflammatory reaction of asthma and they include T cells and antigen presenting cells, B cells that produce IgE, and mast cells, basophils, eosinophils, and other cells that bind IgE. These effector cells accumulate at the site of allergic reaction in the airways and release toxic products that contribute to the acute pathology and eventually to the tissue destruction related to the disorder. Other resident cells, such as smooth muscle cells, lung epithelial cells, mucous-producing cells, and nerve cells may also be abnormal in individuals with asthma and may contribute to the pathology. While the airway obstruction of asthma, presenting clinically as an intermittent wheeze and shortness of breath, is generally the most pressing symptom of the disease requiring immediate treatment, the inflammation and tissue destruction associated with the disease can lead to irreversible changes that eventually make asthma a chronic disabling disorder requiring long-term management.

Despite recent important advances in our understanding of the pathophysiology of asthma, the disease appears to be increasing in prevalence and severity (Gergen and Weiss, *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 823-24, 1992). It is estimated that 30-40% of the population suffer with atopic allergy, and 15% of children and 5% of adults in the population suffer from asthma (Gergen and Weiss, 1992). Thus, an enormous burden is placed on our health care resources. However, both diagnosis and treatment of asthma are difficult. The severity of lung tissue inflammation is not easy to measure and the symptoms of the disease are often indistinguishable from those of respiratory infections, chronic respiratory inflammatory disorders, allergic rhinitis, or other respiratory disorders. Often, the inciting allergen cannot be determined, making removal of the causative environmental agent difficult. Current pharmacological treatments suffer their own set of disadvantages. Commonly used therapeutic agents, such as beta agonists, can act as symptom relievers to transiently improve pulmonary function, but do not affect the underlying inflammation. Agents that can reduce the underlying inflammation, such as anti-inflammatory steroids, can have major drawbacks that range from immunosuppression to bone loss (Goodman and Gilman's *THE PHARMACOLOGIC BASIS OF THERAPEUTICS*, Seventh Edition, MacMillan Publishing Company, NY, USA, 1985). In addition, many of the present therapies, such as inhaled corticosteroids, are short-lasting, inconvenient to use, and must be used often on a regular basis, in some cases for life, making failure of patients to comply with the treatment a major problem and thereby reducing their effectiveness as a treatment.

Because of the problems associated with conventional therapies, alternative treatment strategies have been evaluated. Glycophorin A (Chu and Sharom, *Cell Immunol.* 145, 223-39, 1992), cyclosporin (Alexander *et al.*, *Lancet* 339, 324-28, 1992), and a nonapeptide fragment of IL-2 (Zav'yalov *et al.*, *Immunol. Lett.* 31, 285-88, 1992) all inhibit interleukin-2 dependent T lymphocyte proliferation; however, they are known to have many other effects. For example, cyclosporin is used as an immunosuppressant after organ transplantation. While these agents may represent alterna-

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 56 -

5 tives to steroids in the treatment of asthmatics, they inhibit interleukin-2 dependent T lymphocyte proliferation and potentially critical immune functions associated with homeostasis. Other treatments that block the release or activity of mediators of bronchoconstriction, such as cromones or anti-leukotrienes, have recently been
10 introduced for the treatment of mild asthma, but they are expensive and not effective in all patients and it is unclear whether they have any effect on the chronic changes associated with asthmatic inflammation. What is needed in the art is the identification of a treatment that can act in pathways critical to the development of asthma that both blocks the episodic attacks of the disorder and preferentially dampens the hyperactive allergic immune response without immunocompromising
15 the patient.

Diabetes mellitus. Diabetes mellitus is a common metabolic disorder characterized by an abnormal elevation in blood glucose, alterations in lipids and abnormalities
15 (complications) in the cardiovascular system, eye, kidney and nervous system. Diabetes is divided into two separate diseases: type 1 diabetes (juvenile onset), which results from a loss of cells which make and secrete insulin, and type 2 diabetes (adult onset), which is caused by a defect in insulin secretion and a defect in insulin
20 action.

Type 1 diabetes is initiated by an autoimmune reaction that attacks the insulin secreting cells (beta cells) in the pancreatic islets. Agents that prevent this reaction from occurring or that stop the reaction before destruction of the beta cells has been
25 accomplished are potential therapies for this disease. Other agents that induce beta cell proliferation and regeneration also are potential therapies.

Type 2 diabetes is the most common of the two diabetic conditions (6% of the population). The defect in insulin secretion is an important cause of the diabetic condition and results from an inability of the beta cell to properly detect and respond
30 to rises in blood glucose levels with insulin release. Therapies that increase the

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 57 -

response by the beta cell to glucose would offer an important new treatment for this disease.

5 The defect in insulin action in Type II diabetic subjects is another target for therapeutic intervention. Agents that increase the activity of the insulin receptor in muscle, liver, and fat will cause a decrease in blood glucose and a normalization of plasma lipids. The receptor activity can be increased by agents that directly stimulate the receptor or that increase the intracellular signals from the receptor. Other therapies can directly activate the cellular end process, *i.e.* glucose transport or
10 various enzyme systems, to generate an insulin-like effect and therefore a produce beneficial outcome. Because overweight subjects have a greater susceptibility to Type II diabetes, any agent that reduces body weight is a possible therapy.

Both Type I and Type diabetes can be treated with agents that mimic insulin action
15 or that treat diabetic complications by reducing blood glucose levels. Likewise, agents that reduces new blood vessel growth can be used to treat the eye complications that develop in both diseases.

CNS disorders which may be treated include brain injuries, cerebrovascular diseases
20 and their consequences, Parkinson's disease, corticobasal degeneration, motor neuron disease, dementia, including ALS, multiple sclerosis, traumatic brain injury, stroke, post-stroke, post-traumatic brain injury, and small-vessel cerebrovascular disease. Dementias, such as Alzheimer's disease, vascular dementia, dementia with Lewy bodies, frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17,
25 frontotemporal dementias, including Pick's disease, progressive nuclear palsy, corticobasal degeneration, Huntington's disease, thalamic degeneration, Creutzfeld-Jakob dementia, HIV dementia, schizophrenia with dementia, and Korsakoff's psychosis also can be treated. Similarly, it may be possible to treat cognitive-related disorders, such as mild cognitive impairment, age-associated memory impairment,
30 age-related cognitive decline, vascular cognitive impairment, attention deficit disorders, attention deficit hyperactivity disorders, and memory disturbances in

children with learning disabilities, by regulating the activity of human dendritic cell immunoreceptor.

5 Chronic obstructive pulmonary (or airways) disease (COPD) is a condition defined physiologically as airflow obstruction that generally results from a mixture of emphysema and peripheral airway obstruction due to chronic bronchitis (Senior & Shapiro, *Pulmonary Diseases and Disorders*, 3d ed., New York, McGraw-Hill, 1998, pp. 659-681, 1998; Barnes, *Chest* 117, 10S-14S, 2000). Emphysema is characterized by destruction of alveolar walls leading to abnormal enlargement of the air spaces of
10 the lung. Chronic bronchitis is defined clinically as the presence of chronic productive cough for three months in each of two successive years. In COPD, airflow obstruction is usually progressive and is only partially reversible. By far the most important risk factor for development of COPD is cigarette smoking, although the disease does occur in non-smokers.

15 Chronic inflammation of the airways is a key pathological feature of COPD (Senior & Shapiro, 1998). The inflammatory cell population comprises increased numbers of macrophages, neutrophils, and CD8⁺ lymphocytes. Inhaled irritants, such as cigarette smoke, activate macrophages which are resident in the respiratory tract, as well as epithelial cells leading to release of chemokines (e.g., interleukin-8) and other chemotactic factors. These chemotactic factors act to increase the neutrophil/monocyte trafficking from the blood into the lung tissue and airways. Neutrophils and monocytes recruited into the airways can release a variety of potentially damaging mediators such as proteolytic enzymes and reactive oxygen species.
20 Matrix degradation and emphysema, along with airway wall thickening, surfactant dysfunction, and mucus hypersecretion, all are potential sequelae of this inflammatory response that lead to impaired airflow and gas exchange.

30 Obesity and overweight are defined as an excess of body fat relative to lean body mass. An increase in caloric intake or a decrease in energy expenditure or both can bring about this imbalance leading to surplus energy being stored as fat. Obesity is

associated with important medical morbidities and an increase in mortality. The causes of obesity are poorly understood and may be due to genetic factors, environmental factors or a combination of the two to cause a positive energy balance. In contrast, anorexia and cachexia are characterized by an imbalance in energy intake versus energy expenditure leading to a negative energy balance and weight loss. Agents that either increase energy expenditure and/or decrease energy intake, absorption or storage would be useful for treating obesity, overweight, and associated comorbidities. Agents that either increase energy intake and/or decrease energy expenditure or increase the amount of lean tissue would be useful for treating cachexia, anorexia and wasting disorders.

This gene, translated proteins and agents which modulate this gene or portions of the gene or its products are useful for treating obesity, overweight, anorexia, cachexia, wasting disorders, appetite suppression, appetite enhancement, increases or decreases in satiety, modulation of body weight, and/or other eating disorders such as bulimia. Also this gene, translated proteins and agents which modulate this gene or portions of the gene or its products are useful for treating obesity/overweight-associated comorbidities including hypertension, type 2 diabetes, coronary artery disease, hyperlipidemia, stroke, gallbladder disease, gout, osteoarthritis, sleep apnea and respiratory problems, some types of cancer including endometrial, breast, prostate, and colon cancer, thrombotic disease, polycystic ovarian syndrome, reduced fertility, complications of pregnancy, menstrual irregularities, hirsutism, stress incontinence, and depression.

This invention further pertains to the use of novel agents identified by the screening assays described above. Accordingly, it is within the scope of this invention to use a test compound identified as described herein in an appropriate animal model. For example, an agent identified as described herein (e.g., a modulating agent, an antisense nucleic acid molecule, a specific antibody, ribozyme, or a dendritic cell immunoreceptor polypeptide binding molecule) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 60 -

Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.

5

Cardiovascular diseases include the following disorders of the heart and the vascular system: congestive heart failure, myocardial infarction, ischemic diseases of the heart, all kinds of atrial and ventricular arrhythmias, hypertensive vascular diseases, and peripheral vascular diseases.

10

Heart failure is defined as a pathophysiologic state in which an abnormality of cardiac function is responsible for the failure of the heart to pump blood at a rate commensurate with the requirement of the metabolizing tissue. It includes all forms of pumping failure, such as high-output and low-output, acute and chronic, right-sided or left-sided, systolic or diastolic, independent of the underlying cause.

15

Myocardial infarction (MI) is generally caused by an abrupt decrease in coronary blood flow that follows a thrombotic occlusion of a coronary artery previously narrowed by arteriosclerosis. MI prophylaxis (primary and secondary prevention) is included, as well as the acute treatment of MI and the prevention of complications.

20

Ischemic diseases are conditions in which the coronary flow is restricted resulting in a perfusion which is inadequate to meet the myocardial requirement for oxygen. This group of diseases includes stable angina, unstable angina, and asymptomatic ischemia.

25

Arrhythmias include all forms of atrial and ventricular tachyarrhythmias (atrial tachycardia, atrial flutter, atrial fibrillation, atrio-ventricular reentrant tachycardia, preexcitation syndrome, ventricular tachycardia, ventricular flutter, and ventricular fibrillation), as well as bradycardic forms of arrhythmias.

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 61 -

Hypertensive vascular diseases include primary as well as all kinds of secondary arterial hypertension (renal, endocrine, neurogenic, others). The disclosed gene and its product may be used as drug targets for the treatment of hypertension as well as for the prevention of all complications. Peripheral vascular diseases are defined as

5 vascular diseases in which arterial and/or venous flow is reduced resulting in an imbalance between blood supply and tissue oxygen demand. It includes chronic peripheral arterial occlusive disease (PAOD), acute arterial thrombosis and embolism, inflammatory vascular disorders, Raynaud's phenomenon, and venous disorders.

10

A reagent which affects dendritic cell immunoreceptor activity can be administered to a human cell, either *in vitro* or *in vivo*, to reduce dendritic cell immunoreceptor activity. The reagent preferably binds to an expression product of a human dendritic cell immunoreceptor gene. If the expression product is a protein, the reagent is

15 preferably an antibody. For treatment of human cells *ex vivo*, an antibody can be added to a preparation of stem cells which have been removed from the body. The cells can then be replaced in the same or another human body, with or without clonal propagation, as is known in the art.

20

In one embodiment, the reagent is delivered using a liposome. Preferably, the liposome is stable in the animal into which it has been administered for at least about 30 minutes, more preferably for at least about 1 hour, and even more preferably for at least about 24 hours. A liposome comprises a lipid composition that is capable of

25 targeting a reagent, particularly a polynucleotide, to a particular site in an animal, such as a human. Preferably, the lipid composition of the liposome is capable of targeting to a specific organ of an animal, such as the lung, liver, spleen, heart brain, lymph nodes, and skin.

30

A liposome useful in the present invention comprises a lipid composition that is capable of fusing with the plasma membrane of the targeted cell to deliver its contents to the cell. Preferably, the transfection efficiency of a liposome is about

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 62 -

0.5 μg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, more preferably about 1.0 μg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, and even more preferably about 2.0 μg of DNA per 16 nmol of liposome delivered to about 10^6 cells. Preferably, a liposome is between about 100 and 500 nm, more preferably between about 150 and 450 nm, and even more preferably between about 200 and 400 nm in diameter.

Suitable liposomes for use in the present invention include those liposomes standardly used in, for example, gene delivery methods known to those of skill in the art. More preferred liposomes include liposomes having a polycationic lipid composition and/or liposomes having a cholesterol backbone conjugated to polyethylene glycol. Optionally, a liposome comprises a compound capable of targeting the liposome to a particular cell type, such as a cell-specific ligand exposed on the outer surface of the liposome.

Complexing a liposome with a reagent such as an antisense oligonucleotide or ribozyme can be achieved using methods which are standard in the art (see, for example, U.S. Patent 5,705,151). Preferably, from about 0.1 μg to about 10 μg of polynucleotide is combined with about 8 nmol of liposomes, more preferably from about 0.5 μg to about 5 μg of polynucleotides are combined with about 8 nmol liposomes, and even more preferably about 1.0 μg of polynucleotides is combined with about 8 nmol liposomes.

In another embodiment, antibodies can be delivered to specific tissues *in vivo* using receptor-mediated targeted delivery. Receptor-mediated DNA delivery techniques are taught in, for example, Findeis *et al.* *Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993); Chiou *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu & Wu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991).

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 63 -

Determination of a Therapeutically Effective Dose

The determination of a therapeutically effective dose is well within the capability of those skilled in the art. A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient which increases or decreases dendritic cell immunoreceptor activity relative to the dendritic cell immunoreceptor activity which occurs in the absence of the therapeutically effective dose.

For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model also can be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

Therapeutic efficacy and toxicity, e.g., ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population), can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD₅₀/ED₅₀.

Pharmaceutical compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject that requires treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active ingredient or to maintain the desired effect. Factors which can be taken into account include the severity of the disease state,

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 64 -

general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long-acting pharmaceutical compositions can be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

5

Normal dosage amounts can vary from 0.1 to 100,000 micrograms, up to a total dose of about 1 g, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and generally available to practitioners in the art. Those skilled in the art will employ different formulations for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells, conditions, locations, etc.

10

If the reagent is a single-chain antibody, polynucleotides encoding the antibody can be constructed and introduced into a cell either *ex vivo* or *in vivo* using well-established techniques including, but not limited to, transferrin-polyanion-mediated DNA transfer, transfection with naked or encapsulated nucleic acids, liposome-mediated cellular fusion, intracellular transportation of DNA-coated latex beads, protoplast fusion, viral infection, electroporation, "gene gun," and DEAE- or calcium phosphate-mediated transfection.

15

20

Effective *in vivo* dosages of an antibody are in the range of about 5 μg to about 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, about 50 μg to about 5 mg/kg , about 100 μg to about 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of patient body weight, and about 200 to about 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of patient body weight. For administration of polynucleotides encoding single-chain antibodies, effective *in vivo* dosages are in the range of about 100 ng to about 200 ng, 500 ng to about 50 mg, about 1 μg to about 2 mg, about 5 μg to about 500 μg , and about 20 μg to about 100 μg of DNA.

25

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 65 -

If the expression product is mRNA, the reagent is preferably an antisense oligonucleotide or a ribozyme. Polynucleotides which express antisense oligonucleotides or ribozymes can be introduced into cells by a variety of methods, as described above.

5

Preferably, a reagent reduces expression of a dendritic cell immunoreceptor gene or the activity of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the reagent. The effectiveness of the mechanism chosen to decrease the level of expression of a dendritic cell immunoreceptor gene or the activity of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide can be assessed using methods well known in the art, such as hybridization of nucleotide probes to dendritic cell immunoreceptor-specific mRNA, quantitative RT-PCR, immunologic detection of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, or measurement of dendritic cell immunoreceptor activity.

10

In any of the embodiments described above, any of the pharmaceutical compositions of the invention can be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy can be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents can act synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, one may be able to achieve therapeutic efficacy with lower dosages of each agent, thus reducing the potential for adverse side effects.

15

Any of the therapeutic methods described above can be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

20

25

Diagnostic Methods

Human dendritic cell immunoreceptor also can be used in diagnostic assays for detecting diseases and abnormalities or susceptibility to diseases and abnormalities related to the presence of mutations in the nucleic acid sequences which encode the receptor. For example, differences can be determined between the cDNA or genomic sequence encoding dendritic cell immunoreceptor in individuals afflicted with a disease and in normal individuals. If a mutation is observed in some or all of the afflicted individuals but not in normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

Sequence differences between a reference gene and a gene having mutations can be revealed by the direct DNA sequencing method. In addition, cloned DNA segments can be employed as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of this method is greatly enhanced when combined with PCR. For example, a sequencing primer can be used with a double-stranded PCR product or a single-stranded template molecule generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures using radiolabeled nucleotides or by automatic sequencing procedures using fluorescent tags.

Genetic testing based on DNA sequence differences can be carried out by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized, for example, by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences can be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures (see, e.g., Myers *et al.*, *Science* 230, 1242, 1985). Sequence changes at specific locations can also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S I protection or the chemical cleavage method (e.g., Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4397-4401, 1985). Thus, the detection of a specific DNA sequence can be performed by

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 67 -

methods such as hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing or the use of restriction receptors and Southern blotting of genomic DNA. In addition to direct methods such as gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations can also be detected by *in situ* analysis.

5

Altered levels of a dendritic cell immunoreceptor also can be detected in various tissues. Assays used to detect levels of the receptor polypeptides in a body sample, such as blood or a tissue biopsy, derived from a host are well known to those of skill in the art and include radioimmunoassays, competitive binding assays, Western blot analysis, and ELISA assays.

10

All patents and patent applications cited in this disclosure are expressly incorporated herein by reference. The above disclosure generally describes the present invention.

15

A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific examples which are provided for purposes of illustration only and are not intended to limit the scope of the invention.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 68 -

EXAMPLE 1*Detection of dendritic cell immunoreceptor polypeptide*

5 The polynucleotide of SEQ ID NO: 1 is inserted into the expression vector pCEV4 and the expression vector pCEV4-dendritic cell immunoreceptor polypeptide obtained is transfected into human embryonic kidney 293 cells. From these cells extracts are obtained and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C. The supernatant is centrifuged at 30,000 x g for 20 minutes at 4°C. The pellet is
10 suspended in binding buffer containing 50 mM Tris HCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5, supplemented with 0.1 % BSA, 2 µg/ml aprotinin, 0.5 mg/ml leupeptin, and 10 µg/ml phosphoramidon. Optimal membrane suspension dilutions, defined as the protein concentration required to bind less than 10% of the added radioligand, are added to 96-well polypropylene microtiter plates containing
15 ¹²⁵I-labeled ligand or test compound, non-labeled peptides, and binding buffer to a final volume of 250 µl.

In equilibrium saturation binding assays, membrane preparations are incubated in the presence of increasing concentrations (0.1 nM to 4 nM) of ¹²⁵I-labeled ligand or test
20 compound (specific activity 2200 Ci/mmol). The binding affinities of different test compounds are determined in equilibrium competition binding assays, using 0.1 nM ¹²⁵I-peptide in the presence of twelve different concentrations of each test compound.

Binding reaction mixtures are incubated for one hour at 30 °C. The reaction is
25 stopped by filtration through GF/B filters treated with 0.5% polyethylenimine, using a cell harvester. Radioactivity is measured by scintillation counting, and data are analyzed by a computerized non-linear regression program.

Non-specific binding is defined as the amount of radioactivity remaining after
30 incubation of membrane protein in the presence of 100 nM of unlabeled peptide. Protein concentration is measured by the Bradford method using Bio-Rad Reagent,

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 69 -

with bovine serum albumin as a standard. It is shown that the polypeptide of SEQ ID NO: 2 has a dendritic cell immunoreceptor polypeptide activity.

EXAMPLE 2

5

Expression of recombinant human dendritic cell immunoreceptor

The *Pichia pastoris* expression vector pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) is used to produce large quantities of recombinant human dendritic cell immunoreceptor polypeptides in yeast. The dendritic cell immunoreceptor-encoding DNA sequence is derived from SEQ ID NOS: 2 and 15. Before insertion into vector pPICZB, the DNA sequence is modified by well known methods in such a way that it contains at its 5'-end an initiation codon and at its 3'-end an enterokinase cleavage site, a His6 reporter tag and a termination codon. Moreover, at both termini recognition sequences for restriction endonucleases are added and after digestion of the multiple cloning site of pPICZ B with the corresponding restriction receptors the modified DNA sequence is ligated into pPICZB. This expression vector is designed for inducible expression in *Pichia pastoris*, driven by a yeast promoter. The resulting pPICZ/md-His6 vector is used to transform the yeast.

20

The yeast is cultivated under usual conditions in 5 liter shake flasks and the recombinantly produced protein isolated from the culture by affinity chromatography (Ni-NTA-Resin) in the presence of 8 M urea. The bound polypeptide is eluted with buffer, pH 3.5, and neutralized. Separation of the polypeptide from the His6 reporter tag is accomplished by site-specific proteolysis using enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions. Purified human dendritic cell immunoreceptor polypeptide is obtained.

25

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 70 -

EXAMPLE 3

Identification of test compounds that bind to dendritic cell immunoreceptor polypeptides

5 Purified dendritic cell immunoreceptor polypeptides comprising a glutathione-S-transferase protein and absorbed onto glutathione-derivatized wells of 96-well microtiter plates are contacted with test compounds from a small molecule library at pH 7.0 in a physiological buffer solution. Human dendritic cell immunoreceptor polypeptides comprise the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2 and 15. The test compounds comprise a fluorescent tag. The samples are incubated for 5 minutes to one hour. Control samples are incubated in the absence of a test compound.

15 The buffer solution containing the test compounds is washed from the wells. Binding of a test compound to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide is detected by fluorescence measurements of the contents of the wells. A test compound which increases the fluorescence in a well by at least 15% relative to fluorescence of a well in which a test compound is not incubated is identified as a compound which binds to a dendritic cell immunoreceptor polypeptide.

EXAMPLE 4

Identification of a test compound which decreases dendritic cell immunoreceptor gene expression

25 A test compound is administered to a culture of human cells transfected with a dendritic cell immunoreceptor expression construct and incubated at 37°C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells which have not been transfected is incubated for the same time without the test compound to provide a negative control.

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 71 -

RNA is isolated from the two cultures as described in Chirgwin *et al.*, *Biochem. J.*, 5294-99, 1979). Northern blots are prepared using 20 to 30 µg total RNA and hybridized with a ³²P-labeled dendritic cell immunoreceptor-specific probe at 65°C in Express-hyb (CLONTECH). The probe comprises at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NOS: 1 and 14. A test compound which decreases the dendritic cell immunoreceptor-specific signal relative to the signal obtained in the absence of the test compound is identified as an inhibitor of dendritic cell immunoreceptor gene expression.

10 EXAMPLE 5

Identifying ligands of human dendritic cell immunoreceptor

Expression Cloning. Different cell lines can be examined for their capacity to bind soluble forms of human dendritic cell immunoreceptor. A cell line that shows no significant binding is transfected with a cDNA library prepared from a cell line which shows significant binding. Transfectants that bind soluble human dendritic cell immunoreceptor are isolated by FACS or panning. This procedure is repeated to identify the cDNA that encode relevant ligands of human dendritic cell immunoreceptor.

Use of Random Peptide Display Library. Mammalian cells transfected with human dendritic cell immunoreceptor cDNA are used to identify peptides that bind to human dendritic cell immunoreceptor. Specifically, *E. coli* expressing a random peptide display library (e.g., FliTx™) is screened for the binding to the above transfectants by panning. After several rounds of screening, positive clones are sequenced. Full-length polypeptides are identified by colony hybridization of a T cell cDNA library using oligonucleotide or PCR primers synthesized based on the peptide sequence.

Biochemical Approach. Total cell extracts or membrane fractions prepared from a T cell line are applied onto an affinity column conjugated with soluble human dendritic

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 72 -

cell immunoreceptor. Molecules bound to the column (*i.e.*, putative ligands) are eluted by changing the pH or washing with EDTA or carbohydrates. The eluents are purified by conventional column chromatography and HPLC and then examined for amino acid sequences. cDNA encoding these ligands is cloned by colony hybridization of a T cell cDNA library using oligonucleotide or PCR primers synthesized based on the revealed amino acid sequence.

EXAMPLE 6

10 *Identification of a test compound which decreases dendritic cell immunoreceptor activity*

A test compound is administered to a culture of human cells transfected with a dendritic cell immunoreceptor expression construct and incubated at 37°C for 10 to 15 45 minutes. A culture of the same type of cells which have not been transfected is incubated for the same time without the test compound to provide a negative control. Binding of ligands identified as described above to human dendritic cell immunoreceptors is assayed in the presence and absence of the test compound.

20 A test compound which decreases the binding of a ligand to the dendritic cell immunoreceptor is identified as an inhibitor of dendritic cell immunoreceptor activity.

EXAMPLE 7

25 *Treatment of asthma with a reagent that specifically binds to a dendritic cell immunoreceptor gene product*

30 Synthesis of antisense dendritic cell immunoreceptor oligonucleotides comprising at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NO: 1 or 15 is performed on a Pharmacia Gene Assembler series synthesizer using the phos-

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 73 -

phoroamidite procedure (Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 534-83, 1990). Following assembly and deprotection, oligonucleotides are ethanol-precipitated twice, dried, and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at the desired concentration. Purity of these oligonucleotides is tested by capillary gel electrophoresis and ion exchange HPLC. Endotoxin levels in the oligonucleotide preparation are determined using the *Limulus* Amebocyte Assay (Bang, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 105, 361-362, 1953).

An aqueous composition containing the antisense oligonucleotides is administered to the patient by inhalation.

Severity of asthma is monitored over a period of days or weeks by noting changes in patients' asthmatic symptoms, measuring lung function, or measuring changes in markers of lung inflammation such as numbers of inflammatory cells or concentrations of inflammatory mediators in fluid sampled from patients' lungs by bronchoalveolar lavage. Asthma severity is reduced due to dendritic cell immunoreceptor activity.

EXAMPLE 8

20

In vivo validation of novel compounds

1. Tests for activity of T cells are used to evaluate agents that modulate the expression or activity of costimulatory molecules-cytokines, cytokine receptors, signalling molecules, or other molecules involved in T cell activation

25

Mouse anti-CD3-induced cytokine production model:

BALB/c mice are injected with a single intravenous injection of 10 µg of 145-2C11 (purified hamster anti-mouse CD3 monoclonal antibodies,

30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 74 -

PHARMINGEN). Compound is administered intraperitoneally 60 min prior to the anti-CD3 mAb injection. Blood is collected 90 min after the antibody injection. Serum is obtained by centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min. Serum levels of cytokines, such as IL-2 and IL-4, or other secreted molecules are determined by an ELISA. Proteins which regulate the CD3 downstream signaling can be evaluated in this model.

2. Tests for activity of B cells are used to evaluate agents that modulate the expression or activity of the B cell receptor, signaling molecules, or other molecules involved in B cell activation/immunoglobulin class switching

Mouse anti-IgD induced IgE production model:

BALB/c mice are injected intravenously with 0.8 mg of purified goat anti-mouse IgD antibody or PBS (defined as day 0). Compound is administered intraperitoneally from day 0 to day 6. On day 7 blood is collected and serum is obtained by centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min. Serum levels of total IgE are determined by YAMASA's ELISA kit and other Ig subtypes are measured by an Ig ELISA KIT (Rougier Bio-tech's, Montreal, Canada). Proteins that regulate IgD downstream signaling and Ig class switching can be evaluated.

3. Tests for activity of monocytes/macrophages are used to evaluate agents that modulate the expression or activity of signalling molecules, transcription factors.

Mouse LPS-induced TNF- α production model:

Compound is administered to BALB/c mice by intraperitoneal injection and one hour later the mice given LPS (200 μ g/mouse) by intraperitoneal injection. Blood is collected 90 minutes after the LPS injection and plasma is

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 75 -

obtained. TNF- α concentration in the sample is determined using an ELISA kit. Proteins that regulate downstream effects of LPS stimulation, such as NF- κ B activation, can be evaluated.

- 5 4. Tests for activity of eosinophils are used to evaluate agents that modulate the expression or activity of the eotaxin receptor, signaling molecules, cytoskeletal molecules, or adhesion molecules.

Mouse eotaxin-induced eosinophilia model:

10 BALB/c mice are injected intradermally with a 2.5 ml of air on days -6 and -3 to prepare an airpouch. On day 0, compound is administered intraperitoneally, and 30 minutes later, IL-5 (300 ng/mouse) is injected intravenously. After an additional 30 minutes, eotaxin is injected
15 (3 μ g/mouse, i.d.). Four hours after the eotaxin injection, leukocytes in the airpouch exudate are collected and the number of total cells is counted. Differential cell counts in the exudate are performed by staining with May-Grunwald Gimsa solution. Proteins that regulate signaling by the eotaxin receptor or regulate eosinophil trafficking can be evaluated.

- 20 5. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test in rats

6 Weeks old male Wistar rats are sensitized intradermally (i.d.) on their shaved backs with 50 μ l of 0.1 μ g/ml mouse anti-DNP IgE monoclonal
25 antibody (SPE-7) under a light anesthesia. After 24 hours, the rats are challenged intravenously with 1 ml of saline containing 0.6 mg DNP-BSA (30) (LSL CO., LTD) and 0.005 g of Evans blue. Compounds are injected intraperitoneally (i.p.) 0.5 hr prior to antigen injection. Rats without the sensitization, challenge, and compound treatment are used as a control and
30 rats with sensitization, challenge and vehicle treatment are used to determine the value without inhibition. Thirty minutes after the challenge, the rats are

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 76 -

sacrificed, and the skin of the back is removed. Evans blue dye in the skin is extracted in formamide overnight at 63°C. Absorbance at 620 nm is then measured to obtain the optical density of the leaked dye.

5 Percent inhibition of PCA with a compound is calculated as follows:

$$\% \text{ inhibition} = \{(\text{mean vehicle value} - \text{sample value}) / (\text{mean vehicle value} - \text{mean control value})\} \times 100$$

10 Proteins that regulate mast cell degranulation, vascular permeability, or receptor antagonists against histamine receptors, serotonin receptors, or cysteinyl leukotriene receptors can be evaluated.

6. Anaphylactic bronchoconstriction in rats

15

6 Weeks old male Wistar rats are sensitized intravenously (i.v.) with 10 µg mouse anti-DNP IgE, SPT-7, and 1 days later, the rats are challenged intravenously with 0.3 ml of saline containing 1.5 mg DNP-BSA (30) under anesthesia with urethane (1000 mg/kg, i.p.) and gallamine (50 mg/kg, i.v.). The trachea is cannulated for artificial respiration (2 ml/stroke, 70 strokes/min). Pulmonary inflation pressure (PIP) is recorded through a side-arm of the cannula connected to a pressure transducer. Changes in PIP reflect a change of both resistance and compliance of the lungs. To evaluate a compound, the compound is given i.v. 5 min before challenge.

25

Proteins that regulate mast cell degranulation, vascular permeability or receptor antagonists against histamine receptors, serotonin receptors, or cysteinyl leukotriene receptors can be evaluated. Proteins that regulate the contraction of smooth muscle can be also evaluated.

30

7. *T cell adhesion to smooth muscle cells or endothelial cells*

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 77 -

A purified population of T cells is prepared by ficoll density centrifugation followed by separation on a nylon wool column, rosetting with sheep red blood cells, or using magnetic beads coated with antibodies. The T cells are
5 activated with mitogen for 36 to 42 hours and labeled with ^3H -thymidine during the last 16 hours of the activation. Airway smooth muscle cells or bronchial microvascular endothelial cells are obtained from lung transplant tissue, from bronchus resections from cancer patients, from cadavers, or as cell lines from commercial sources. If fresh tissue is used as the source of
10 cells, the smooth muscle cells and endothelial cells can be isolated from tissue by dissection followed by digestion for 30-60 minutes in a solution containing 1.7 mM ethyleneglycol-bis-(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 640 U/ml collagenase, 10 mg/ml soybean trypsin inhibitor, and 10 U/ml elastase. The smooth muscle cells or endothelial cells are grown in 24-well
15 tissue culture dishes until confluent and then treated with a test compound and inflammatory mediators, such as $\text{TNF-}\alpha$ for 24 hours. To measure adhesion, 6×10^5 T cells are added per well and allowed to adhere for one hour at 37°C . Nonadherent cells are removed by washing six times gently with medium. Finally, the remaining adherent cells are lysed by adding 300 μl 1% Triton-X
20 100 in PBS to each well and quantitating the radioactivity in a scintillation counter. The percent binding is calculated as counts recovered from adherent cells/total input counts \times 100%

REFERENCES

- 25 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Ariizumi, Kitajima, Bergstresser, Takashima, Eur. J. Immunol., 25:2137-2141, 1995.
- 30 Beaudet, Am. J. Hum. Gen., 37:385-406, 1985.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 78 -

- Bittner et al., *Methods in Enzymol.*, 153:516-544, 1987.
- Bradley et al., *Current Topics in Developmental Biology*, 20:357-371, 1986.
- 5 Brutlag et al., *CABIOS*, 6:237-245, 1990.
- Caceres-Dittmar, Arizumi, Xu, Tapiu, Bergstresser, Takashima, *Photochem. Photobiol.*, 62:176-183, 1995.
- 10 Campbell, in: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology*, Burden and Von Knippenberg, Amsterdam, Elsevier, Vol. 13, pp 75-83, 1984.
- Caoulo, Christian, Peterson, Ceriani, *Cancer Research (supp.)*, 55:5973s-5977s, 1995.
- 15 Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425 1977.
- Caux, Massacrier, Vanbervliet et al., *J. Exp. Med.*, 180:1263-1272, 1994.
- 20 Chou and Fasman, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148, 1978a.
- Chou and Fasman, *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276, 1978b.
- 25 Chou and Fasman, *Biophys. J.*, 26:367-384, 1979.
- Chou and Fasman, *Biochemistry*, 13(2):222-245, 1974a.
- Chou and Fasman, *Biochemistry*, 13(2):211-222, 1974b.
- 30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 79 -

- Co, Baker, Bcdnavik, Janzek, Noruda Mayer, Plot, Stumper, Vesquez, Queen,
Loibner, *Cancer Research*, 56:1118-1125, 1996.
- Co, Avdalovic, Caron, Avdalovic, Scheinberg, Queen, *J. Immunology*, 138:1149-
5 1154, 1992.
- Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1, 1981.
- Enk and Kutz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1398-1402, 1992.
- 10 Ezekomitz et al., 1990
- Ezekomitz et al., 1991.
- 15 Fetrow and Bryant, *Biotechnology*, 11:479-483, 1993.
- Flam, *JOURNAL*, VOL:PAGES?, 1994.
- Geffer et al., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977
- 20 Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Orlando, Fla.,
Academic Press, pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149, 1968.
- 25 Heufler, Topar, Koch, et al., *J. Exp. Med.*, 176:1221-1226, 1992.
- Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073, 1980.
- 30 Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 80 -

- Holland et al., *Biochemistry*, 17:4900, 1978.
- Hoover et al., (eds). "Remington's Pharmaceutical Sciences," 15th Ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580, Mark Publishing Co., Barton, Pa., 1975.
- 5 Hopp, U.S. Pat. No. 4,554,101
- Inaba, Swiggard, Inaba et al., *Cell Immunol.*, 163:148-156, 1995.
- 10 Jameson and Wolf, *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):181-186, 1988.
- Jiang, Swiggard, Heufler et al., *Nature*, 375:151-155, 1995.
- 15 Johnson et al., *Biotechnology and Pharmacy*, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, New York, 1993.
- Jones, *Genetics*, 85:12, 1977.
- 20 Kery, 1991.
- Kingsman et al., *JOURNAL*, VOL:PAGES?, 1979.
- Kijimoto-Ochiai et al., 1994.
- 25 Kitajima, Arizumi, Mohamadzadeh, Edelbaum, Bergstresser, Takashima, J. *Immunol.*, 155:3794-3800, 1995.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- 30 Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 81 -

- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132, 1982.
- 5 Lovell-Badge, In: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed., IRL Press, Washington D.C., 1987.
- Lowry et al., *Cell*, 22:817, 1980.
- 10 Matsue, Cruz, Bergstresser, Takashima, *J. Invest. Dermatol.*, 99:537-541, 1992.
- Mohamadzadeh, Pollorak, Bergstresser, Bentler, Takashima, *J. Immunol.*, 156:3102-3106, 1996.
- 15 Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981.
- Nakamura et al., "Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems," Chapter 27, 1987.
- 20 O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527, 1981.
- Oldenburg et al., 1992.
- Reid et al., 1994.
- 25 Robertson, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed., IRL Press, Washington D.C., 1987.
- Saitusio, Cella, Danieli, Lanzavecchi, *J. Exp. Med.*, 182:389-400, 1995.
- 30 Sambrook, Fritsch, Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., 1989.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 82 -

- Sancar, Valdineso, Burdets, Yao, Raval, Madan, Sreepatni, Shimoyami, Steiger, Vissther, *Diagnostic Molecular Pathology*, 4:266-273, 1995.
- 5 Santerre et al., *Gene*, 30:147, 1984.
- Schreiber, Kilgus, Payer et al., *J. Immunol.*, 149:3525-3534, 1992.
- Spiess, *Biochemistry*, 29:10009-10018, 1990.
- 10 Stahl, *Current Opinion in Immunology*, 4:49-52, 1992.
- Steinman and Swanson, *J. Exp. Med.*, 182:283-288, 1995.
- 15 Steinman, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:271-296, 1991.
- Steinman, Inaba, Schuler, In: *The Immune Functions of Epidermal Langerhans Cells*, (ed. Heidrun Moll), R. G. Landes Company, Austin, Tex., 1-19, 1995.
- 20 Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39, 1979.
- Szybalska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:2026, 1962.
- Takashima, Edelbaum, Kitajima et al., *J. Immunol.*, 154: 5128-5135, 1995.
- 25 Tschemper et al., *Gene*, 10:157, 1980.
- Vassa et al., 1994.
- 30 Vercelli et al., 1989.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 83 -

- Weinberger et al., *Science*, 228:740-742, 1985.
- Wigler et al., *Cell*, 11:223, 1977.
- 5 Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:3567, 1980.
- Witmer-Pack, Swiggard, Mirza, Inaba, Steinman, *Cell. Immunol.*, 163:157-162, 1995.
- 10 Wolf et al., *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):187-191, 1988.
- Xu, Arizumi, Caceres-Dittmar et al., *J. Immunol.*, 154:2697-2705, 1995.
- Xu, Arizumi, Edelbaum, Bergstresser, Takashima, *Eur. J. Immunol.*, 25:1018-1024, 1995.
- 15

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 84 -

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide and being selected from the group consisting of:
- 5
- a) a polynucleotide encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
- 10 amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15; and
15 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15;
- b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1 or 14;
- c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a
20 polynucleotide specified in (a) and (b);
- d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code; and
25
- e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d).
2. An expression vector containing any polynucleotide of claim 1.
- 30
3. A host cell containing the expression vector of claim 2.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 85 -

4. A substantially purified dendritic cell immunoreceptor polypeptide encoded by a polynucleotide of claim 1.
5. A method for producing a dendritic cell immunoreceptor polypeptide, wherein the method comprises the following steps:
- a) culturing the host cell of claim 3 under conditions suitable for the expression of the dendritic cell immunoreceptor polypeptide; and
- b) recovering the dendritic cell immunoreceptor polypeptide from the host cell culture.
6. A method for detection of a polynucleotide encoding a dendritic cell immunoreceptor polypeptide in a biological sample comprising the following steps:
- a) hybridizing any polynucleotide of claim 1 to a nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
- b) detecting said hybridization complex.
7. The method of claim 6, wherein before hybridization, the nucleic acid material of the biological sample is amplified.
8. A method for the detection of a polynucleotide of claim 1 or a dendritic cell immunoreceptor polypeptide of claim 4 comprising the steps of:
- contacting a biological sample with a reagent which specifically interacts with the polynucleotide or the dendritic cell immunoreceptor polypeptide.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 86 -

9. A diagnostic kit for conducting the method of any one of claims 6 to 8.
10. A method of screening for agents which decrease the activity of a dendritic cell immunoreceptor, comprising the steps of:
- 5 contacting a test compound with any dendritic cell immunoreceptor polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1;
- 10 detecting binding of the test compound to the dendritic cell immunoreceptor polypeptide, wherein a test compound which binds to the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of a dendritic cell immunoreceptor.
11. A method of screening for agents which regulate the activity of a dendritic cell immunoreceptor, comprising the steps of:
- 15 contacting a test compound with a dendritic cell immunoreceptor polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1; and
- 20 detecting a dendritic cell immunoreceptor activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the dendritic cell immunoreceptor activity is identified as a potential therapeutic agent for increasing the activity of the dendritic cell immunoreceptor, and wherein a test compound which decreases the dendritic cell immunoreceptor activity of the polypeptide is identified as a
- 25 potential therapeutic agent for decreasing the activity of the dendritic cell immunoreceptor.
12. A method of screening for agents which decrease the activity of a dendritic cell immunoreceptor, comprising the steps of:
- 30

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 87 -

contacting a test compound with any polynucleotide of claim 1 and detecting binding of the test compound to the polynucleotide, wherein a test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of dendritic cell immunoreceptor.

5

13. A method of reducing the activity of dendritic cell immunoreceptor, comprising the steps of:

contacting a cell with a reagent which specifically binds to any polynucleotide of claim 1 or any dendritic cell immunoreceptor polypeptide of claim 4, whereby the activity of dendritic cell immunoreceptor is reduced.

10

14. A reagent that modulates the activity of a dendritic cell immunoreceptor polypeptide or a polynucleotide wherein said reagent is identified by the method of any of the claim 10 to 12.

15

15. A pharmaceutical composition, comprising:

the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 and a pharmaceutically acceptable carrier.

20

16. Use of the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 for the preparation of a medicament for modulating the activity of a dendritic cell immunoreceptor in a disease.

25

17. Use of claim 16 wherein the disease is cancer, asthma, obesity, diabetes, a CNS disorder, or a cardiovascular disorder.

30

18. A cDNA encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 88 -

19. The cDNA of claim 18 which comprises SEQ ID NO: 1 or 14.
20. The cDNA of claim 18 which consists of SEQ ID NO: 1 or 14.
- 5 21. An expression vector comprising a polynucleotide which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15.
- 10 22. The expression vector of claim 21 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NO: 1 or 14.
23. A host cell comprising an expression vector which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15.
- 15 24. The host cell of claim 23 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NO: 1 or 14.
25. A purified polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15.
- 20 26. The purified polypeptide of claim 25 which consists of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15.
- 25 27. A fusion protein comprising a polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15.
28. A method of producing a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15, comprising the steps of:
- 30 culturing a host cell comprising an expression vector which encodes the polypeptide under conditions whereby the polypeptide is expressed; and

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 89 -

isolating the polypeptides.

- 5 29. The method of claim 28 wherein the expression vector comprises SEQ ID NO: 1 or 14.
- 10 30. A method of detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15, comprising the steps of:
hybridizing a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1 or 14 to nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and detecting the hybridization complex.
- 15 31. The method of claim 30 further comprising the step of amplifying the nucleic acid material before the step of hybridizing.
- 20 32. A kit for detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15, comprising:
a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1 or 14; and
instructions for the method of claim 30.
- 25 33. A method of detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15, comprising the steps of:
contacting a biological sample with a reagent that specifically binds to the polypeptide to form a reagent-polypeptide complex; and
30 detecting the reagent-polypeptide complex.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 90 -

34. The method of claim 33 wherein the reagent is an antibody.
35. A kit for detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown
5 in SEQ ID NO: 2 or 15, comprising:

an antibody which specifically binds to the polypeptide; and

instructions for the method of claim 33.
10
36. A method of screening for agents which can modulate the activity of a human
dendritic cell immunoreceptor, comprising the steps of:

contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid
15 sequence selected from the group consisting of: (1) amino acid sequences
which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in
SEQ ID NO: 2 or 15 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:
2 or 15; and

20 detecting binding of the test compound to the polypeptide, wherein a test
compound which binds to the polypeptide is identified as a potential agent for
regulating activity of the human dendritic cell immunoreceptor.
37. The method of claim 36 wherein the step of contacting is in a cell.
25
38. The method of claim 36 wherein the cell is *in vitro*.
39. The method of claim 36 wherein the step of contacting is in a cell-free
system.
30
40. The method of claim 36 wherein the polypeptide comprises a detectable label.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 91 -

41. The method of claim 36 wherein the test compound comprises a detectable label.
- 5 42. The method of claim 36 wherein the test compound displaces a labeled ligand which is bound to the polypeptide.
43. The method of claim 36 wherein the polypeptide is bound to a solid support.
- 10 44. The method of claim 36 wherein the test compound is bound to a solid support.
45. A method of screening for agents which modulate an activity of a human dendritic cell immunoreceptor, comprising the steps of:
- 15 contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (1) amino acid sequences which are at least about 30% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15; and
- 20 detecting an activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the activity of the polypeptide is identified as a potential agent for increasing the activity of the human dendritic cell immunoreceptor, and wherein a test compound which decreases the activity of the polypeptide is identified as a potential agent for decreasing the activity of the human dendritic cell immunoreceptor.
- 25
46. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell.
- 30 47. The method of claim 45 wherein the cell is *in vitro*.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 92 -

48. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell-free system.
- 5 49. A method of screening for agents which modulate an activity of a human dendritic cell immunoreceptor, comprising the steps of:
- contacting a test compound with a product encoded by a polynucleotide which comprises the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or 14; and
- 10 detecting binding of the test compound to the product, wherein a test compound which binds to the product is identified as a potential agent for regulating the activity of the human dendritic cell immunoreceptor.
- 15 50. The method of claim 49 wherein the product is a polypeptide.
51. The method of claim 49 wherein the product is RNA.
52. A method of reducing activity of a human dendritic cell immunoreceptor, comprising the step of:
- 20 contacting a cell with a reagent which specifically binds to a product encoded by a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or 14, whereby the activity of a human dendritic cell immunoreceptor is reduced.
- 25 53. The method of claim 52 wherein the product is a polypeptide.
54. The method of claim 53 wherein the reagent is an antibody.
- 30 55. The method of claim 52 wherein the product is RNA.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 93 -

56. The method of claim 55 wherein the reagent is an antisense oligonucleotide.
57. The method of claim 56 wherein the reagent is a ribozyme.
- 5 58. The method of claim 52 wherein the cell is *in vitro*.
59. The method of claim 52 wherein the cell is *in vivo*.
- 10 60. A pharmaceutical composition, comprising:
- a reagent which specifically binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15; and
- 15 a pharmaceutically acceptable carrier.
61. The pharmaceutical composition of claim 60 wherein the reagent is an antibody.
- 20 62. A pharmaceutical composition, comprising:
- a reagent which specifically binds to a product of a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or 14; and
- 25 a pharmaceutically acceptable carrier.
63. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is a ribozyme.
- 30 64. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an antisense oligonucleotide.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 94 -

65. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an antibody.
- 5 66. A pharmaceutical composition, comprising:
- an expression vector encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or 15; and
- 10 a pharmaceutically acceptable carrier.
67. The pharmaceutical composition of claim 66 wherein the expression vector comprises SEQ ID NO: 1 or 14.
- 15 68. A method of treating a dendritic cell immunoreceptor dysfunction related disease, wherein the disease is selected from cancer, asthma, obesity, diabetes, a CNS disorder, or a cardiovascular disorder comprising the step of:
- administering to a patient in need thereof a therapeutically effective dose of a reagent that modulates a function of a human dendritic cell immunoreceptor, whereby symptoms of the dendritic cell immunoreceptor dysfunction related disease are ameliorated.
- 20
69. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 36.
- 25
70. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 45.
- 30 71. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 49.

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

Fig. 1

tggagctgtgcccacoccttggacttccatttcaactctctagttgctactttatttctacttsgggatgcaaatcttggacta
 agatcaaaaagaactgttctgtgatggggctgatctgtgtgtsatcaacaccgggaagaacagatcttccatcattca
 gaactgaaaaaagaattcttttatttcttggggctgtccagatccaggggtcgggacatggcaatgggttgaccag
 acalsccatacaaatgaaaaatgtccacttccactcagtgaccccaatlaaccttgatgagcgttistgtggataataaa
 tttccgttcttcagaagaatggggctggaatgacattccactgtlcalisgtaccctcagaagtcacttgcgaagtgaagaag
 atctacataais

Fig. 2

KSCCPTWTSFQSSCYFISIGMQSWTKCKKNCVMGADLVVINTREHQDPIIQMLKKNSSYFLGLSDZGRRRHOMWVDQTP
 YNENVTFWHSGEENNDERCALINFRSSEWGMNDIHCYVQKSIKMKKCYI

Fig. 3

MTSSELYAVYRFRKNEFKSSGINTASSAASKERTAPHKSNTPFKLLCASLLIFFLLAISFFIAFVIFPKYSQLEKKT
 KELVHTLLEGVKKNMPEVETAWSCPKNWKSPSSNCYFISTESAWQDSKDCARMEHLLVINTCEQDFTFONLQEFESA
 YFVGLSDPEGRRHQWVDQTPYMBSSTFWHPREPSPDNERECVVLNFKSPKRWGNDVNCGLFPQKRSVCEMMKIEL

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 2/8 -

Fig. 4

TTTTAAATGGATTATATCATATAAGTGTAAATAGGTGACAGCCCTGCTGAAAACAATTTAGGGGCAATTCCTTGTACAAAACCTTACA
 CATATAATTAATAAATCAATTTAGCTTTCTACAACGGTGGATGCCAACCCAAACACAAATTCAGGGAGAAATATTTGATTTAT
 ATGTAGATCTTCTTCATCTTCCAAATGACATTCAGCTTCTGAGCTACAGAGTGAATGCTATCCAGCCCAATCTTCTGTAGAGAA
 CGAAATTTAATATCGCACAGCGCTCATCAAGGTTAATGGGTTCACTGAGTGCAGAACTCAATTCATATCTACACTCAGGTGAC
 APTTCAATTTGATGGTGTCTGGTCAACCCATGGCAATCCCGGACCCCTCGGATCTGAGCCCGCCAGAAAATAAGAA
 APTTCTTTTCAGATTCGAATGATGAAATCCCTGTTCTTCCCTGGTGTGATCAACACAGATCAGCCCCCATCAGAGACA
 GTTCTTTGACTCTTAGTCCAGATGTCATCCACGTAGAAATAAAGTAGCAACTGACTGAAATGAACTCCCAAGGGGTGG
 CGAGCAGCTCCAAATC

Fig. 5

TTTGGATLAVATCAIAAAGTAAZAGGTGACAGCCCTGCTGAAAACAATTTAGGGGCAATTCCTTGTACAAAACCTACACATAA
 AHTAAAATCAATTTAGCTTTCTACAACGGTGGATGCCAACCCAAACACAAATTCAGGGAGAAATATTTGATTTAT
 GATCTTCTTCATCTTCAAAATGACTTCTGAGTACAGACAGTGAATGTCATTCAGCCCAATTCGCTGAAAGAAAGGAA
 AHTTATATCGCACAGCTCATCAAGGTTAATGGGTTCACTGAGTGCAGAACTCAATTCATATCTACACTCAGGTGAC
 GTCACCCATGTCATGTCGCGACCCCTGGTGTGACAGCCCGAAATAAAGTAGCAACTGACTGAAATGAACTCCCAAGGGGTGG
 GATGAAATCCCTGTTCTTCCCTGGGGTGCATCCACCCAGATCAGCTCACTACAGAAAGTGCCTTTCGACTCTTTAGTCCA
 AGAAGCATCCCAAGTAAATAATAGTAGCACTAGGACTGATGAACTCCAGGGGTGGGGAGCCAGCICCAATCTTCTAATG
 ACTTATCTTACAGGAACGAGGTGCGCTGAGTGGACCGTGGAACTCCGTAAGCTTGGAGCCCTTGGAGCTTTGCAATC
 ATAAAATGTGAGCCACTGGTCCCTGAGGCTCTCTCAGGCAACAATGTGGGGCCACACTTGGACATTCCTATCAG
 GTGGTGGAAAGGACTGGTAAATTTTCCAAAGATGGTGCATTCGAGATTTGGGTTGTATGCTAAACAGGGCCCAAGCC
 TCCAGAGCCCTTCCGTTAGCCCTGAGGCANGTAGGGCCATGGCACCAATGTCAGGTCCAGCAGAGTAGCAACTG
 GAGGAGAGTTGATACCTGAGGAGCACCTGACTGCCAGCGGCTACTACGAGCATATAGAAATCGGTACCCCTCGAAGGTTAC
 GACCGTTTCTGCGGAGGGGTGGGTTCTCTCTAGAGTC

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

Fig. 6

TTTTTTGACACCAATCATATAATTTTATTTGGTAAATAATTTCTTTAGCAACCCGATATAAAAATTAGAGAGACTCATGTTCT
CTCCAGTGTGCACAAATGGGGCCCTCCAGTACAGGCTCTGGCACATGAAATAAATGCTCAATAAATGCTCAAAATTTATGAAA
AGTGAATCAGTCAATGTPACAGACCAATTTCTTCATAAAGTAGAATAGTTCACAGACCCACCAATAATTTCTATGGACCTCCCTTA
CACATGAATAAGAGAGACTTATTTATCTATCCCTACATGACAGAAACCAACCACTGTTCATCGGAAATGTTGAGT
TCATAAGTGGATCTTCACTCACAACTGACCTTTGAGGACCCAGACAATTAACATCATCCAGCCCAATCTTTTGGG
TGATTTACGAAAATTTAGCACACCCAGCCGCTCATTTGGGATCCTGGGATCCAGATCCAGATCCAGATTTGGAACTTCATP
GPAATGGTCTGATCAACCCATTTGCCAATGCTGCTGACCTTTGGATCTGAGAGCCCAAAAATAAGCAGATTCCTTTG
CAGATTTGGAAGATGAATCCCTGCTCTTTGAGTHTTATCACCAGCAGGTGAGCCCTTCATCTAGCAAGTCTTCTC
ACTGCTTTGCCCCAGATGCTGATTCAGTAGAAAATAAAGTCCAGTTGGACTAATGACCCNGCAATTTCTTTGGGCCACACIG
CCAGCCCTGCTTTTCCAAAAAGGT

Fig. 7

GGAAAAAATGATTAATAAAGAACTGAATACTGAAATGGAATGAGTGTACRAAAATGGGCTTCACTCTTGGAGACAAGTCTG
GAGCTGTGGCCCAAGGATTCGAAGCCGTTGGTCCCTACTGCTACTTCACTTCACTTCACTTCACTTCACTTGGTGGCATTTGGAAATGA
GATAGGAGAACTGCTTCCACATGGGTCATCTGGTGTGATCCACAGCCAGGAAGAACAGATTTCACTCACTGGAT
CCGGACACTGGTACTGCTTTTATAGGACTTCCAAATCCAGGTGATCAACAATGGCAATGGATTCAGACACCGTA
CGATGATATACCAATTTGGCAAAAGGTGAGGCTAGCAGTGAACAATGAGTGTATATAAATCACTGTCAGAG
TACTGGATGGGCTGGAGTATCCCTTGCATGALAAAACAGAACTCAATTTCCCATGTGAAAAAATAATACCTTATGAAAT
CACACATTTCCCATGGCCATGGGATGGCATTTGTTATCCACCATTAGCAGACACTTGGAAAATTTCTTTTCATGT

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

Fig. 8

TTAAGAATGAGTGGATTCATAAAGTTCATTAATTTTCCTTCATCTGACAACTGACCTTCCTGTTTAAAGACTCCAGAGATAATCGTTTCCA
 GCCCATCCAGTCTTCGAAACGGTAAATTAATGATAGACAAATTTTCATGACAGCAATTTTCATGACACCTGCTGGGCTACCCATTTGCCAGAAATGT
 GATACCTTCTTCATGATGGTGTCTGATCAACCATTTGCCAATGCGGATGCGGCTGATCCCAACCCCTATAAATAAAGCAGC
 ATGAGTCCCAAGATCCCAAGTGTGAAATCCCTCTTCCTGCTCTTCCGATCCACTGATGAGCACCACCCATGCGGGAGCA
 GTTCCCTCATCTCTGTTCCAAAGATCTGATGAGAAACTGCGGAACTGCGGAACTGAGTAGCAGTGGGAACCAAAATAGCCCTCCAAATC
 CTTTGGCCAAAGCTCCAGACTTTGCTTCCAAAGGTGAAACACTTTTGTGAGTCAATTCATTTGTCATTTATATTTT
 IGCAGCTTTTTTTTCTTCAGAGAAGTTGAGACTCTTTTGAARAATAATGATAAAGCAACTAGAAATGTGATTTGCCAGCAG
 C

Fig. 9

AGTTTAAITTTCTTCACTGACAACTGACTTCTGTTTAAACTGCAAGAAATATCGTTCCAGCCCCATCCAGTCTTCCGAA
 GGTAAATTAATGTTAGCACATTTTCATGCCACTGCTGGCTCCACCTCAGCAATGCGCCAGAAATGATGACTTCTTCAATGCTG
 TCTGATCAACCCATTTGCCATTTCCGATGGCTGTATCCCAACCCCTAATAAATAGCAGATGAGTFCCAAGATCCGAG
 TGAATGAATCCCTGCTTCCCTGGCTTTGGATCACCACTAGATGAGCCCACTGCGGAGCAGTTTCTCTCACTCTTGTTC
 AAGATGCTGATGAAAGAACTCTGGGAACCAAGTAGCAGTGGGAACCAAAATAGCTCCAAATCCTTTGGGCAACAGCTCCA

Fig. 10

TTTTTTTTTTTGACACCACAATATAAATTTTATGTTAAATAATTTCTTAGCAACACAGAGGAAATTAAGAGACTCA
 TGTTCCTCCATCTGTTGCAACAATGGGGGCTTTCAGTACAGGCTCTGCGAGCATGAAAATAATGCTCAATAAATGCTCACT
 TTAICAAAAGTCAATCAGTCAATGACAGACCAATTTCTCATAGTAGAATAGTTCAGACCCACCTAAATCTTATGGA
 CCTCCCTTACACATGATAGAAAGCTTATTTATCTATCCCTCAAACTGACCTTTGAGGACCAAGCAATTAACATCTTCATGGGA
 AAGTTCAGTTCAATGAGTATCTTCATCTCAAACTGACCTTTGAGGACCAAGCAATTAACATCTTCAGGCCCA
 TCTTTGGGTGATTTACGAAATTTAGCAAAAGCCGCTTCATTTGGATCTGAGCTCACCTGATGCCAGATGTTGGA
 ACTTTCAATGATGTTGCTGATCAACCCATGCGAATGCTGACCTGGAATCTGAGAGCCCAAGCAATTAAGTGGGA
 TTCCTTGCAGATCTGAAAGAGAAATCCTGCTCTTCTGAGTGTTAICACCAGCAAGGGGATACATATTTGGACA
 GTCCCTTGCACGTTTTG

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 5/8 -

Fig. 11

GCAAGATGCATTTGTTAATAAACCACCTGCTCTAGAGACAAAGATCTGAGCTTTGTCBAAGAAATTTGGAAGCCATTT
 GAITCCACATGCTACTTCACCTCCCGTACACCTGATCCTGGATGAGTGAAGAGATGCTCCCTCAGGGTGTCTCAT
 CTGCTGGTATCCAGAGCCAGGAGAGCAGGATTTCAACCAACTCTGAACTCTGACCTGTCGCTGCTATTATGTTGGGCTG
 TCAGATCCAAAGGCCCATGGCAATGGCAATGGGTTGATCAGACACCAATGATCAAAATGCCACATCTGGCAGCTCAGAT
 GAACCCAGTGGCAACACTGAATTTCTGTTGCTTAAGTTATCAACCAACGTTAAAGGATGGGCTGGAGATTTGGCCCTT
 TGGATGGTGCATCATAGGTTGATTTGTGAGATGGGCTCTAATGTTAGACGAGACTTCTACAGACTCATGATGTG
 AITGGAAATGGAGCTGTAAGTATAGAGACAGCTAGGAATTCCTTCATTTGATCCCTTTGGAAATCAAAACGGGAC

Fig. 12

CTAGAAATGGAGGCTACCTGCTGTGTAATAAACACTCAAGAGAGACGAGATTTTCATCTTCAGAAATCTGCAAGAAGATCTG
 CTTAATTTGTGGGCTCTCAGATCCAGAAAGTCAAGCAATGGCAATGGCTTGATCAGACACCACTCAATCAATGAAATTCCA
 CATCTGGCATCCAGTGCACCACTGATCCCAATGAGCGCTGGTGTGCTAATTTTCGTAATCCACCCCAAGAATGGG
 GCTGGATGATGTTAATTTGCTTGGTCTCAAGTCAAGTGTGGTGTGGAGATGAGAGATCCACTTATGAACTGAACATCTC
 CATGAAACAGTGGTGGATGGTATCTCATTTAGGGATAGATAAATAGCTCTTCTTATCATGTTAAGGAGTCCCA
 TAGAATTTAGGTGCTCTCAACTTACTTACTTATAGAGAAAT

Fig. 13

TTTTTTTTTTTTTTTTATAGGTAGAGAGATTTATTTGCTCCACATATGCAAGAGAGTCTCTGTAGTCCCTGCTACATG
 GAAATCTCATATATATAGAAATGACAANAATTAAGTAAATTTACACATGAGCAGTATTATATATATATATAACCACT
 GGCTGGTACCTAAATTTCTGTGGACCTCTCTTCACATGAAAGAACTTTCCAGCATCTCCGTAGTGGTGGATAACAATG
 AATCCCAAGTCAAGGAAATGGTGTTCATATATTTTTTCACTGACAAACCACTTCCTTTTATCACTGCAAG
 AGCTATCACTCCAGCCCACTCCAGTATTCATGATGATTTATTAACAATTTGTTCACTGCTGGCTCACCTT
 CAUGCCAGATGTGGCATCCCAATGATGGTCTGATGACCCCATGCCCATTGTCGATGACCTGGATCTGAAAGTCTCTA
 TAAATAGCCAGATGAGTATCCAGGATCCCTGGCAGGAAATCCCTCTTCTGGCTGGTATCCACCAG

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

Fig. 14

C- [LIVMFATG] -x(5,12) - [WL] -x- [DNSR] -x(2) -C-x(5,6) - [FWLIVSTA] - [LIVMSTA] -C

Fig. 15

tctgttaataattttttcttataactcatttgggaagattggagctgctcccacaaccttggacttccagctc
agtggactatttttctactgggatgcaactcttgcactaaagatcaaaagaactctctctgctgatggggctgatctggtg
gtgatacaaacccaggggaagaacaggatttcatcattccgaacttgaagaataattctcttattttccggggccgctcggat
ccaggggctgggacattggcaatgggttgcaccagaccacatacaatgcaactctggactcaggLgaaccc
aacaacctgtagtggagcttgggatataaatttccgttcttcagaagaatggggctgggaatgacattcactgtccatgta
ccLcagaagtcaatttggcaagatgagaagatctacata

Fig. 16

SYNIFSSLLIWEWSCTPTWTSFOSSCYFIISGMSWTKSKMCSVMGADIAVINTREDFIIONLKRNSSYFLGLSD
PGRRHQWVDQTFYENVTFWHSQEPNNLDERCALINPRSESEWGNNDHCHVFQKXICKMKKIYI

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 7/8 -

Fig. 17

BLASTP - alignment of 273_genwisedb against pdb|LDV8|LDV8-A
 Conserved metal binding residues are shown in bold below.
 asialoglycoprotein receptor i-fragment: carbohydrate recognition domain - h1
 subunit; (hepatic lectin h1)

This hit is scoring at : 1e-11 (expectation value)
 Alignment length (overlap) : 132
 Identities : 28 %
 Scoring matrix : BLOSUM62 (used to infer consensus pattern)
 Database searched : nrdb

Q: 4 CPTFWISFQSSCYFISIGMQSWTKSQKNGSVMGADLVVINTREBQDFLIQLKRMSSYFL
 CP.W...:SCY:S...:W...:C...:A.LVV...:EC.F...:...:
 H: 1 CPYVWVEHERSCYWFERSRSKAWADADNYCELEDAHLVVVTSWESQKTVQHHIGFVNTW-M
 GLSDPGRRHWQVDQTFYNEVTFWHSGEFNNL-----DRCALINFRSSEWGWND
 GL.D.G W:WVD T.Y...:W...:P...:E CA...:WND
 GLHDONG--FWKYVDGTDYETGKRWREPEQDDWYGHGSGGSDCA----HFTDDEGWND
 LHCHVPGKSIK L28
 C. P.: :C:
 DVCQRYRWVCE L25

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 8/8 -

Fig. 18

HMMFFAM - alignment of 273_genwisedb against pfam|hmm|lectin_c

Lectin C-type domain

This hit is scoring at : 93.6

Scoring matrix : BLOSUM62 (used to infer consensus pattern)

```

Q: 30 KNCVW--GADLVVINTREEDFLIQNLKRNSSYFLGLSDG---GRRHWQWVDQTPYN
C:..LV I::EEQDF:..K.: :GL:D. . W W D.:
H: 1 laCqreKpSGhuvsLqsqeGdFigslykavvayawICLcdinkgeptegtWwsdGs.ip
      ENVTFWH--SGEPNN---LDERCAIINFRSSEEWG-MNDIHCHVQKSIK 127
      N T W  GEENN      E C.: : : : G WND C.: : : C
      vnytnWakipgeFmwrhkggkedCvelycktpkangkmDepCdsklpyvc 111

```

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> REGULATION OF HUMAN DENDRITIC CELL IMMUNORECEPTOR

<130> LI0184 Foreign Countries

<150> US 60/240,096

<151> 2000-10-16

<150> US 60/314,661

<151> 2001-08-27

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 402

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 1
tggagctgct gcccaacccc ttggaacttca tttoagteta gttgetactt tatttctact    60
gggatgcaat ctggactaa gagtcamaag aactgtttctg tgnatgggggc tgatctggtg    120
gtgatcaaca coaggggaga acaggatttc atcattcaga atctganaag aaattcttct    180
tattttctgg ggotgtcaga tccagggggt oggcgacatt ggcnaatgggt tgaccagaca    240
ccatacaatg aaaatgtcac atctctggcac tccagtgaac ccxataacct tgatgagcgt    300
tgtgcgataa taatttccg ttcttcagaa gaatggggct ggaatgacat tcactgtent    360
gtacctcaga agtcaatttg caagatgaag aagatctaca ta                                402

```

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 2 -

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Trp Ser Cys Cys Pro Thr Pro Trp Thr Ser Phe Gln Ser Ser Cys Tyr
 1 5 10 15

Phe Ile Ser Thr Gly Met Gln Ser Trp Thr Lys Ser Gln Lys Asn Cys
 20 25 30

Ser Val Met Gly Ala Asp Leu Val Val Ile Asn Thr Arg Glu Glu Gln
 35 40 45

Asp Phe Ile Ile Gln Asn Leu Lys Arg Asn Ser Ser Tyr Phe Leu Gly
 50 55 60

Leu Ser Asp Pro Gly Gly Arg Arg His Trp Gln Trp Val Asp Gln Thr
 65 70 75 80

Pro Tyr Asn Glu Asn Val Thr Phe Trp His Ser Gly Glu Pro Asn Asn
 85 90 95

Leu Asp Glu Arg Cys Ala Ile Ile Asn Phe Arg Ser Ser Glu Glu Trp
 100 105 110

Gly Trp Asn Asp Ile His Cys His Val Pro Gln Lys Ser Ile Cys Lys
 115 120 125

Met Lys Lys Ile Tyr Ile
 130

<210> 3

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 3 -

<400> 3
Met Thr Ser Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Val Arg Phe Lys Asn Glu Phe
1 5 10 15
Lys Ser Ser Gly Ile Asn Thr Ala Ser Ser Ala Ala Ser Lys Glu Arg
20 25 30
Thr Ala Pro His Lys Ser Asn Thr Gly Phe Pro Lys Leu Leu Cys Ala
35 40 45
Ser Leu Leu Ile Phe Phe Leu Leu Leu Ala Ile Ser Phe Phe Ile Ala
50 55 60
Phe Val Ile Phe Phe Glu Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Lys Lys Thr
65 70 75 80
Thr Lys Glu Leu Val His Thr Thr Leu Glu Cys Val Lys Lys Asn Met
85 90 95
Pro Val Glu Glu Thr Ala Trp Ser Cys Cys Pro Lys Asn Trp Lys Ser
100 105 110
Phe Ser Ser Asn Cys Tyr Phe Ile Ser Thr Glu Ser Ala Ser Trp Gln
115 120 125
Asp Ser Glu Lys Asp Cys Ala Arg Met Glu Ala His Leu Leu Val Ile
130 135 140
Asn Thr Gln Gln Glu Gln Asp Phe Ile Phe Gln Asn Leu Gln Glu Glu
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Phe Val Gly Leu Ser Asp Pro Glu Gly Gln Arg His Trp
165 170 175
Gln Trp Val Asp Gln Thr Pro Tyr Asn Glu Ser Ser Thr Phe Trp His
180 185 190
Pro Arg Glu Pro Ser Asp Pro Asn Glu Arg Cys Val Val Leu Asn Phe
195 200 205
Arg Lys Ser Pro Lys Arg Trp Gly Trp Asn Asp Val Asn Cys Leu Gly
210 215 220

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 4 -

Pro Gln Arg Ser Val Cys Glu Met Met Lys Ile His Leu
 225 230 235

<210> 4
 <211> 582
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 ttttaaatgg atttatcat saggtaata ggtgacagcc tgetgaaaca ttttaggggg 60
 attccttgta caaaccttac acataaatta aaaaatcaat ttagotttct acaacggtgg 120
 atgccaaccc aaacacattt ccaggggagaa tatttcattt atatgtatgt ottttcctc 180
 ttgcaaatg acttotgagg tacatgacag tgaatgtcat tccagcccca ttctctgaa 240
 gaacggaaat ttattatgac acaacgctca tcaaggttat tgggttccac tgaatgccc 300
 aatctccttc tatactcaag tgacatttto attgtatggt gtotggtaaa cccattgcca 360
 atgtcgcoga cccctggat ctgacagccc oagaaaataa gaagaatttc ttttcagatt 420
 ctgaatgatg aaatcctggt ctccctgggt gttgatccc accagatcag ccccatcac 480
 agaacagttc ttttgactct tagtccaaga ttgoatcca gtagaataa agtagcaact 540
 agactgaat gaagtccaag gggttgggca gcagotccaa tc 582

<210> 5
 <211> 1013
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (942)..(842)
 <223> n=a, c, g or t

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 5 -

```

<400> 5
tttgattat atcataagtg taataggta cagcctgctg aancattta gggcattcc 60
ttgtacaaaa cgtacacata aattaaaaa tcaattlago ttctacaac ggtggatgcc 120
saacccaaaca cattccaggy gagaatattt cagtttagat tagatntttt tontottgca 180
aattgaactc tgaggtaecat gacagtgaat gtcattccag cccattcgt ctgaagaacg 240
gaaattttatt atgcacaaac gctcatcaag gttattgggt tencctgagt gacagaatgt 300
gacaagttea ttgtatgggt tctggtcnac ccattgcaa tgtgcogac cccctggatc 360
tgacagcccc agaaaataag aagaattttt ttccagatto tgaatgatga aatcctgttc 420
ttccctgggg gtgatcacca ccagatcagc tccatcaca gaagaggtgc tttyactctt 480
agtccaagat gcattccagt aaaaatatag tggcaactag gactgaatga agtccagggg 540
ttgggcagca gctccaatct tctatgtaot tatcttccag gaogcaggtc ggttgagtg 600
agaccgttga actcctnac ttggaogacc tctggaogtt ttgoatcat aaaattgtga 660
ggcaacteggt cctgaggetc tcttcagga acaatgtgtg ggcgcacaca ctggacatt 720
ctotatacgg tgggtgogaa gcaactgta aaactttctc caaagatggt gactgcgga 780
gttgtgggtg tatgotaaac aggocaaagc togagagccc ttoygctota ggcctgagge 840
angtaggggc atgcacccc aatgtcaggt cagcagcaga gtagcaactt ggaggagaag 900
ttgatacgtg ggagcacgtg actgcccagc oggtagttac gacatatag aatgggtacg 960
ctogaaggtt acgacggttt cgtcgcagc gctgtgggt gtctgctaga gtc 1013

```

<210> 6

<211> 753

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (527)..(627)

<223> n=a, c, g or t

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 6 -

<220>

<221> misc_feature

<222> (708)..(708)

<223> n=a, c, g or t

```

<400> 6
ttttttgaca ccacatcata taattttatb ggtaaataat tottttagcaa ccagataaaa 60
attaagagag actcatgttc tctccatgtg tgcacaatgg gggcctccag tacaggtctc 120
ggcaccatgaa naaatgctca ataatgctc natttatgaa aaagtgaatc agtcaatgta 180
cagaccaatt ctctcataag tagantagtt gacagaccac ctaaattcota tggacctccc 240
ttacacatga ataagaagag ctattatct atccctacaa tgacagatac caatccaacc 300
acctgttcat ggagaatggt cagttcataa gtggatcttc atcatctcac aaactgacct 360
ttgaggacca agcaattaa catcattcca gccocatott ttgggtgatt tacgaaaatt 420
tagacaaacg cagcctcat tgggactact gggctcact ggatgcacag atgtggaact 480
ttcattgtat ggtgtotgat caaccattg ccaatgtgc tgacottctg gatctgagag 540
cccccaaaa taagcagatt attcttgcag attctggaag atgaaatcct gctcttcttg 600
agtgtttato accagcaggt gaggctncat tctagaacag tccttctcac tgtttgccc 660
agatgctgat tcagtagaaa taaaagtcca gttggaacta aatgacngc aattotttgg 720
gcacaaactgc cagcctgatt ttccaaaaa ggt 753

```

<210> 7

<211> 558

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 7
ggaaaaaatg attataaaag aactgaacta tactgaattg gagtgtacaa aatgggcttc 60
actotttggaa gacaaagtat gggcctgttg cccaaggat tggagcogt ttggttoota 120
ctgclacttc acttcaactg acttgggtggc atotttgaat gaggtaagg agaactgctt 180
cccaatgggt gctcactctg tgggtatcca cagccaggaa gaacaggatt tcactcctgg 240
gutoctggac actgggtactg attattttat aggactttca eatccaggtg atcaacaatg 300

```

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 7 -

```

gcaatggatt gatacagaca: cgtacgagca tautccaca ttctggcaca aaggtgagcc 360
tagcagtgac aatgaacagt gtgttataat aaatcactgt cagagactgt gatggggctg 420
gagtgatato oattgagtg ataaaacgaa ctcaatttgc catgtgaaa aaatatactt 460
atgaatcaca cttctccat ggcaatggga ttgcattgtt atccacatt acgcagaac 540
ttgaaaagtt ctctcgtt 558

```

```

<210> 8
<211> 568
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 8
ttaagaatga gtgattcata agtttatttt ctctactga caaactgact totgtttaag 60
actgcaagag atactgttcc agccccatcc agtcttccaa cggtaaatca ttgtagcaca 120
tttttcattg ccaactgtgg gctcaccatt gtgccagaat gtgatacttt ctctatag 180
tgtctgatca acccattgcc attgccgatg gccctgatcc cacaacccta taaaataagc 240
agcatgagtg tccaaatcc cagtatgaa atctctctct tctggcttt ggatcaccac 300
tagatgagca cccatgctgg agcagttctc ctcactcttg ttccaagatg ctgatgaaga 360
aacgtgggga accaagtgc agtgggaacc aaatagcctc caatcctttg ggcaacagct 420
ccagactttg tcttccatgg gtgaacact ttttgtgcag ttcaattcat tgtcattat 480
attttttga gttttttttt ctccaagaag ttgagagtac ttttgaaat aaatgataaa 540
agcaactaag aatgtgattg ccagcagc 558

```

```

<210> 9
<211> 403
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 9
agtttatttt ctctactga caaactgact totgtllaaa actgcaagaa atactgttcc 60
agccccatcc agtcttccaa cggtaaatca ttgtagcaca ttttctattg ccaactgtgg 120

```

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 8 -

```

gctcaccatt gggcagaat gtgatactt ctctatggt tgtctgata acccattgcc 180
attgcgatg gcctgtatc ccaaaccta taaaataagc agcatgagt tccaagatcc 240
cagtgaatgaa atcctgctct tcttgcttt ggtctccac tagatgagca cccatgctgg 300
agcagttctc ctcaatcttg ttcccaatg ctgatgaaga aactgtgga accaagtgc 360
agtgggaacc aaatagctc caatccttg ggcaccagct cca 403

```

<210> 10

<211> 666

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 10
ttttttttt ttgacaccac atcatataat ttlatgtgla aataattctt tagcaaccag 60
agggaaatta agagagactc atgtctctc catgtgtgca caatggggg ctctcagtac 120
aggcgtctgg cagcatgaaa aaatgctcaa taaatgctca ctttatgaaa aagtgaatca 180
gtcaatgtac agaccaatc tctcataagt agaatagttg acagaccac taaattctat 240
ggacctcctc tacacatgaa taagaagagc ttattatota tccctacaat gacagatacc 300
aatccaacca cctgtctatg gagaagctc agttcataag tggatctta toatctcaca 360
aactgacctt tgaggacca gacaattaac abcatctcag ccccatcttt tgggtgattt 420
acgaaaattt agcacaagc agcctcatt gggatcctg agctcaogly gatgcaagaa 480
tgtggaactt tcattgtatg gtgtctgac aaccattgc caatgtogct gaactactgg 540
atctgagagc cccacgaat aagcggatc ttcttgcaaga ttctgaaga tgaatctg 600
ctctcttga gtgtttatca ccagcaaggg agcatcact attgcaagt ccttgtcact 660
gttttg 666

```

<210> 11

<211> 561

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 9 -

<400> 11
ycaagattgc attgtgtaaa aaaccactcg tctgtagaag acaaaagtctg gagctgttgt 60
ccaaagaatt ggaagccatt tgattcccac tgcctacttca ctccocgtga cactgcctcc 120
tggagtaaga gtgaagagaa gtgctocctc aggggtgctc atctgctggt gatccagagc 180
caggaagagc aggabtccat caccacactc ctgaaccctc gtgctgctta ttatgtgggg 240
ctgtcagatc caaagggccca tggacaatgg cagtgggttg atcagacacc atatgatcaa 300
aatgccaat cctggcaactc agatgaaccg agtggcaaca ctgaattttg tgtttgtcta 360
agttatcact caaacgttaa aggatggggc tggagtgtcg ccccttctga tggatgacat 420
aggttgattt gtgagatgag gcagctctat gtatgaacga agcattctct acagactcat 480
gatgtgattg gaatggaagc tgtaagtata gagacagcta ggaagttctt catttgatcc 540
tcttaggaat caaacagggc c 561

<210> 12

<211> 448

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12
ctagaatgga ggctcaccty ctggtgataa acaactaaga agagcaggat ttoatcttc 60
agaatctgca agaagaatct gcttattttg tgggctctc agatccagaa ggtcagcgac 120
attggcaatg ggtgatcag acaccatata atgaaagttc cacattctg catccagtg 180
agcccagtga tcccaatgag cgtcggttg tgcataattt tcttaatac cccaaagat 240
gggctggaa tgatgttaat tctcttgctc ctcaaggctc agtttctgag atgatgaaga 300
tccacttatg naetgaacat tctccatgaa caggctggtg gattggtatc tctcattgta 360
gggatagata ataagctctt ctctatcatg tctaaggag gtccatagaa tttagtgggt 420
ctgtcaacta ttctacttat gagagaat 448

<210> 13

<211> 559

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 10 -

```

<400> 13
lltttttttt ttttttttag tagagaagtt tattgtctcc acatagcac agagagtct 60
clctgtagtc cctggtacat gganaattct cattatataa gaaaatgaca aatgaitaag 120
taaatttaca catgtagcag tattataata tgtataacca ctggctgcgt acctaaaatt 180
ctgtggacct ctctttcaca tgaagaactt tccaagcabc tgcgtagtgg tggataacaa 240
tgcattacca cagtosagga gaatgtgtgg ttcataagta ttttttttc aactgaacaa 300
ccaaattctg tttatcactg caagsgctat cactccagcc ccaccagta ttctcatgat 360
gatttattat aacacnttgt tcattgtcac tgcctggcct accctcatgc cagaatgtgg 420
cattccattt gtatggtgtc tgatogaccc attgccattg tccatgacct gcatctgaaa 480
gtccatataa ataagcagca tngtlatoca ggatcctggg caggaaatcc tctcttctct 540
ggctgtggat caccaccag 559

```

<210> 14

<211> 444

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 14
ctcgttaata tttttttctt ttctatactt atttgggaag attggagctg ctgcccaccc 60
ccttggactt catttoagtc tagttgtcac tttatttota ctgggatgca atcttggact 120
aagagtcaaa agaactgttc tgtgatgggg gctgatctgg tgggatcaa caccaggga 180
gaacaggatt tcatcattca gaactctaaa agaaattctt cttattttct ggggtctgca 240
gatccagggg gtcggcgaca ttgccaatgg gttgaccaga caccatacaa tgaaaatgct 300
acattctggc actcagggtg acccaataac cttgatgagc gttgtgcat aataaatctt 360
cgtttctcag aagaatgggg ctggaatgac attcactgtc atgtacctca gaagtoaatt 420
tgaagatga ngaagatcta cata 444

```

WO 02/32958

PCT/EP01/11812

- 11 -

<210> 15

<211> 148

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Val Asn Ile Phe Ser Ser Ser Ile Leu Ile Trp Glu Asp Trp Ser
 1 5 10 15

Cys Cys Pro Thr Pro Trp Thr Ser Phe Gln Ser Ser Cys Tyr Phe Ile
 20 25 30

Ser Thr Gly Met Gln Ser Trp Thr Lys Ser Gln Lys Asn Cys Ser Val
 35 40 45

Met Gly Ala Asp Leu Val Val Ile Asn Thr Arg Glu Glu Gln Asp Phe
 50 55 60

Ile Ile Gln Asn Leu Lys Arg Asn Ser Ser Tyr Phe Leu Gly Leu Ser
 65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Arg Arg His Trp Gln Trp Val Asp Gln Thr Pro Tyr
 85 90 95

Asn Glu Asn Val Thr Phe Trp His Ser Gly Glu Pro Asn Asn Leu Asp
 100 105 110

Glu Arg Cys Ala Ile Ile Asn Phe Arg Ser Ser Glu Glu Trp Gly Trp
 115 120 125

Asn Asp Ile His Cys His Val Pro Gln Lys Ser Ile Cys Lys Met Lys
 130 135 140

Lys Ile Tyr Ile
 145

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/032958 A3(51) International Patent Classification²: C07K 14/705,
C12N 15/12, 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/50, 33/53, A61K
48/00, C12N 15/62

(21) International Application Number: PCT/EP01/11812

(22) International Filing Date: 12 October 2001 (12.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/240,096 16 October 2000 (16.10.2000) US
60/314,661 27 August 2001 (27.08.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER
AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Lev-
erkusen (DE).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): SMOLYAR, Alex
[US/US]; 734 Boylston Street, Brookline, MA 02467
(US).(74) Common Representative: BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
A7, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NI, NZ, PG, PH, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, 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, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
13 February 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "List
of Abbreviations on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/032958 A3

(84) Title: POLYNUCLEOTIDE AND POLYPEPTIDE SEQUENCES OF HUMAN DENDRITIC CELL IMMUNORECEPTORS

(57) Abstract: Reagents which regulate human dendritic cell immunoreceptor and reagents which bind to human dendritic cell immunoreceptor gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctional or diseases including, but not limited to, cancer, asthma, obesity, diabetes, CNS disorders, and cardiovascular disorders.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor	Application No.
			PCT/EP 01/11812
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 7	C07K14/735 G01N33/53	C12N15/12 A61K48/00	C12N5/10 C12N15/62
		C12Q1/68	G01N33/50
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 C07K C12N G01N A61K			
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)			
EMBL, MPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	DATABASE EMBL 'Online! standard; RNA; EST: 1013 BP, 17 March 1998 (1998-03-17) NCI-CBAP: "ak43b01.s1 Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1408681.3' similar to SW:LECH_CHICK P02707 HEPATIC LECTIN. ; mRNA sequence." Database accession no. AA868502 XP002208843	1-3	
Y	the whole document	1-9, 15-32, 66,67	
	---	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Parent family members are listed in annex.			
* Special categories of cited documents:			
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to be specified)		*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*R* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
6 September 2002		17/09/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentstr. 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epc M, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kools, P	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor's Application No. P11/EP 01/11812
C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BATES E. ET AL.: "APCs Express DCIR, a Novel C-type Lectin Surface Receptor Containing an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, vol. 163, no. 4, 15 August 1999 (1999-08-15), pages 1973-1983, XP002208840 US cited in the application the whole document	1-6,8
Y	----- COLONNA M ET AL.: "Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY (WILEY-VCH VERLAG GMBH), vol. 30, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 697-704, XP002208841 Weinheim, Deutschland page 702, column 1, paragraph 3 page 700, column 2, paragraph 3	1-9, 15-32, 66,67
L	DATABASE EMBL 'Online' standard: RNA: HUM: 1271 BP, 1 September 1999 (1999-09-01) BATES E. ET AL.: "Homo sapiens mRNA for dendritic cell immunoreceptor" Database accession no. AJ133532 XP002208844 Sequence information belonging to cited journal article of Bates et al. 1999. the whole document	1-6,8
A	DRICKAMER KURT: "C-type lectin-like domains" CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD., LONDON, GB, vol. 9, no. 5, October 1999 (1999-10), pages 588-590, XP002175480 ISSN: 0959-440X the whole document ----- -/--	1-71

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor Application No. PCT/EP 01/11812
G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
P, X	ARCE I. ET AL.: "Molecular and genomic characterization of human DLEC, a novel member of the C-type lectin receptor gene family preferentially expressed on monocyte-derived dendritic cells" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY (WILEY-VCH VERLAG GMBH, vol. 31, 30 August 2001 (2001-08-30), pages 2733-2740, XP002208842 Weinhelm, Deutschland published online DOI 10.1002/1521-4141(200109)31:9<2733::AID-IMMU2733>3.0.CO;2-X	1-9, 15-32, 66,67
P, X	DATABASE EMBL 'Online!' standard; cDNA; 1312 BP, 6 August 2001 (2001-08-06) SCHMITZ J. ET AL.: "Nucleotide sequence of EDCA-2 antigen" Database accession no. AAF90241 XP002208845 Identical to Accession number AX155223 the whole document	1-3,18, 19,21,23
P, X	-& WO 01 35487 A (MILT- MILTENYI BIOTECH GMBH) 25 May 2001 (2001-05-25)	1-71
P, X	DATABASE EMBL 'Online!' standard; DNA 827 BP, 18 December 2001 (2001-12-18) WERNER G. ET AL.: "Dendritic cell (DC) DCLEC gene" Database accession no. AAD19729 XP002208846 Identical to Accession number AX357481 the whole document	1-3,18, 19,21,23
P, X	-& WO 01 72773 A ((NOVS) NOVARTIS AG) 4 October 2001 (2001-10-04) the whole document	1-71

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 216

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: partially: 6, 13-17, 33, 52, 60, 62, and 68-71

Present claims 8, 13-17, 33, 52, 60, 62, and 68-71 relate to a reagent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely specifically interacting or binding to the polypeptides or polynucleotides of the present application.

The claims cover all reagents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such reagents. In the present case, the claims so lack 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 claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the reagents 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, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to reagents being, antibodies, antisense polynucleotides, polypeptides, RNA, and ribozymes.

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. PCT/EP 01/11812
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)(e) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Present claims 13, 52-57, 59 and 68-71 are interpreted as claims directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	partially: 8, 13-17, 33, 52, 60, 62, and 68-71 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependant 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:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/EP 01/11812	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 0136487	A	25-05-2001	AU 1723301	A	30-05-2001
			WO 0136487	A2	25-05-2001
WO 0172773	A	04-10-2001	AU 5623201	A	08-10-2001
			WO 0172773	A2	04-10-2001
			AU 5496101	A	26-11-2001
			WO 0187064	A1	22-11-2001
			US 2002019368	A1	14-02-2002

Form PCT/IS/210 (patent family annex) (July 1999)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/14	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/02	1 0 1
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 2
C 0 7 K 14/705	A 6 1 P 43/00	1 1 3
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/64	Z
C 1 2 N 9/64	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	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 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 5/00	E
	A 6 1 K 37/02	

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

(72) 発明者 アレックス・スモリアー

アメリカ合衆国 0 2 4 6 7 マサチューセッツ州ブルックライン、ボイルストン・ストリート 7 3 4

番

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB20 BB50 CB01 DA13 DA36 FB01 FB02 FB03
FB08 FB12 GC10
4B024 AA01 AA11 BA14 BA63 CA02 CA09 CA12 CA20 DA03 DA12
EA04 GA11 HA11 HA13 HA14 HA17
4B050 CC01 CC03 CC05 DD11 EE01 FF14E LL01 LL03 LL05
4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ08 QQ36 QQ41 QQ43
QQ53 QQ61 QQ79 QQ89 QQ95 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42
QR48 QR56 QR57 QR62 QR77 QR80 QS16 QS25 QS33 QS34
QS36 QX01 QX02 QX07
4B064 AG20 CA01 CA06 CA10 CA19 CC01 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA58X AA77X AA87X AA93X AA93Y AB01 AC14 AC20 BA02
BA30 CA24 CA33 CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA21 BA23 CA36 DC50
MA01 NA14 ZA021 ZA151 ZA161 ZA221 ZA321 ZA361 ZA441 ZA541
ZA591 ZA661 ZA701 ZA811 ZB021 ZB071 ZB111 ZB131 ZB151 ZC121
ZC131 ZC331 ZC351 ZC422
4C085 AA13 AA14 BB17 CC03 DD62 EE01
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA89 EA20 EA50
FA74 GA26

专利名称(译)	调节人树突状细胞免疫受体		
公开(公告)号	JP2004511254A	公开(公告)日	2004-04-15
申请号	JP2002536339	申请日	2001-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳股份公司		
[标]发明人	アレックススモリアー		
发明人	アレックススモリアー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/08 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P3/00 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K14/705 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.U A61K45/00 A61K48/00 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P25/00 A61P25/02.101 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.112 A61P43/00.113 C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.Z C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N5/00.B C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/FF14E 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ95 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG20 4B064/CA01 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA77X 4B065/AA87X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA33 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/CA36 4C084/DC50 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA221 4C084/ZA321 4C084/ZA361 4C084/ZA441 4C084/ZA541 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA701 4C084/ZA811 4C084/ZB021 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZC121 4C084/ZC131 4C084/ZC331 4C084/ZC351 4C084/ZC422 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫		
优先权	60/240096 2000-10-16 US 60/314661 2001-08-27 US		

摘要(译)

调节人树突状细胞免疫受体的试剂和与人树突状细胞免疫受体基因产物结合的试剂可在预防，改善或纠正功能障碍或疾病（包括但不限于癌症，哮喘，肥胖症，糖尿病，中枢神经系统疾病，和心血管疾病。

Fig. 17

BLASTP-273_eewwise06b6b1DV81DV81DV8-A 間のアライメント
 信頼的な領域は黒色で示す

アンチロマンタン抗体フラグメント酸化水素還元ドメイン-11サブユニット: (非レクタンH1)

このドメインは非レクタンH1フラグメントである: 1-111 (重複)

アミノ酸配列: 28% 類似性
 位置: 1-111
 アミノ酸配列: 28% 類似性
 位置: 1-111

Q: 4 CPTWTFSGVSLGDTQVTFKQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

IE: 1 CTWVWVSGVSCVWVFSQKAKDQVCGEAFALVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

GLSDVGRHQRHWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

GLDAGHWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

Fig. 18

HMMPFAM-273_eewwise06b6b1DV81DV8-A 間のアライメント

C 基レクタンドメイン

このドメインは以下でのスコアリングである: 93.6

スコアリングマトリックス: BLOSUM62 (コンセンサスハサムの推測に使用)

Q: 30 RKGSA--GALIVVTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

IE: 1 LADQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL

HWQVCTVKNMRTFSSQKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPLGKNSVWQKDLVYTRRQDFTLQKIKNSRYPL