

(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2004-504030

(P2004-504030A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 19/02	4 B O 2 4
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 29/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 O 1 4 B O 6 5
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-512371 (P2002-512371)	(71) 出願人	394010986
(86) (22) 出願日	平成13年7月9日 (2001.7.9)		アクゾ・ノベル・エヌ・ベー
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月10日 (2003.1.10)		オランダ国、6 8 2 4 ・ベー・エム・アー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/007888		ネム、フエルペルウエヒ・7 6
(87) 国際公開番号	W02002/006478	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成14年1月24日 (2002.1.24)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	00202495.8	(74) 代理人	100105131
(32) 優先日	平成12年7月13日 (2000.7.13)		弁理士 井上 満
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】細胞外マトリックスタンパク

(57) 【要約】

本発明は、炎症性疾患の予防、より詳しくは、関節リウマチの患者におけるタンパクへのT細胞寛容の誘導に有用なタンパクを示すものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 598 から伸長している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。

【請求項 2】

該ポリヌクレオチドが、配列番号 2、配列番号 19、配列番号 20 又は配列番号 21 のアミノ酸配列をコードする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

該ポリヌクレオチドが、配列番号 1 のヌクレオチド 59 ～ 1852 から伸長している配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 4】

該ポリヌクレオチドが、配列番号 1、配列番号 16、配列番号 17 もしくは配列番号 18 の配列、又は、配列番号 1 のヌクレオチド 59 ～ 2017、配列番号 16 のヌクレオチド 59 ～ 1969、配列番号 17 のヌクレオチド 59 ～ 1912 もしくは配列番号 18 のヌクレオチド 59 ～ 1894 から伸長している配列を含むものである、請求項 1 から 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 に記載の DNA を含む組換え発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 1 から 4 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、請求項 5 に記載の発現ベクター、又は配列番号 2、配列番号 19、配列番号 20 もしくは配列番号 21 の免疫調節断片。

20

【請求項 7】

請求項 6 に記載のポリペプチド、及び薬学的に許容できる担体を含む薬剤組成物。

【請求項 8】

治療に用いるための請求項 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

炎症性疾患に対する医薬製剤の製造のための請求項 6 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 10】

自己免疫疾患、より詳しくは関節リウマチの患者での、自己抗原に対して免疫寛容を誘導するための医薬製剤の製造のための請求項 6 に記載のポリペプチドの使用。

30

【請求項 11】

請求項 1 から 4 に記載の DNA 又は請求項 5 に記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞。

【請求項 12】

請求項 6 に記載のポリペプチドを発現する安定なトランスフェクションされた細胞である、請求項 11 に記載の細胞。

【請求項 13】

請求項 1 から 4 に記載の DNA、又は請求項 5 に記載の発現ベクター、請求項 11 もしくは 12 に記載の細胞、又は請求項 6 に記載のポリペプチドの、免疫寛容原（ポリ）ペプチドの同定のためのスクリーニングアッセイにおける使用。

40

【請求項 14】

a) 請求項 1 から 4 に記載のポリヌクレオチドの断片を適当な宿主細胞に導入するステップ；
b) 宿主細胞を、導入された配列の発現を可能にする条件下で培養するステップ；
c) 発現産生物をリンパ球と接触させるステップ；及び
d) リンパ球活性を確立させるステップを含む方法である、免疫寛容原ペプチドを同定する方法。

【請求項 15】

a) 請求項 1 から 4 に記載のポリヌクレオチドの断片を適当な宿主細胞に導入するステッ

50

プ；

- b) 宿主細胞を、導入されたDNA配列の発現を可能にする条件下で培養するステップ；
- c) 発現産生物を単離するステップ；
- d) 発現産生物を抗原提示細胞及びT細胞と接触させるステップ；及び
- e) T細胞を活性化させるステップを含む方法である、免疫寛容原ペプチドを同定する方法。

【請求項16】

- a) 配列番号2、配列番号19、配列番号20又は配列番号21の断片を化学的に合成するステップ；
- b) ペプチド断片を抗原提示細胞及びT細胞と接触させるステップ；及び
- c) T細胞を活性化させるステップを含む方法である、免疫寛容原ペプチドを同定する方法。

10

【請求項17】

請求項14から16の方法及び同定されたペプチドを薬学的に許容できる担体と混合するステップを含む、薬剤組成物の調製方法。

【請求項18】

免疫寛容原剤として適した製剤の調製のための、請求項14から16の方法で同定されたペプチドの使用。

【請求項19】

1又は2以上の請求項6に記載のポリペプチド及び検出試薬を含む診断用組成物。

20

【請求項20】

- a) 末梢血単核細胞(PBMC)を個体の血液サンプルから単離するステップ、b) 該PBMCを適当な条件下で培養するステップ、
- c) 該PBMC培養物を、SCIM-1、その断片及び／又は1もしくは2以上の請求項6に記載のペプチドの存在下でインキュベートするステップ、及び
- d) 個体中の活性化自己反応性T細胞の存在を指標する、T細胞の応答を検出するステップを含む、活性化自己反応性T細胞の検出のための診断方法。

【請求項21】

試験キットがSCIM-1又は1もしくは2以上の請求項6に記載のペプチドを含む、活性化自己反応性T細胞の検出のための試験キット。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、新規細胞外マトリックスタンパク、すなわちSCIM-1をコードする新規ポリヌクレオチド分子の分離に関するものである。コードされるタンパク又はその誘導体は、病状の診断、予防、又は治療に有用である。それらは、自己免疫疾患、より詳しくは関節リウマチの治療のための調節剤として使用することができる。

【0002】

免疫系の主な機能的役割は、外来すなわち非自己の抗原を持つ病原体の侵入から個体を保護することである。この機能を安全かつ効果的な方法で果たすために、外来の抗原と個体自身の体から誘導される自己抗原とを識別するためのメカニズムが必要とされる。この自己-非自己識別の過程の機能不全、すなわち自己抗原に対する免疫寛容の喪失は、組織損傷及び器官の機能損失を伴う自己免疫疾患を引き起こす、自己抗原に対する免疫反応を導き得る。

40

【0003】

自己免疫疾患は、ヒトの医療において主な問題である。いくつかの自己免疫疾患は、一つの抗原又は抗原複合体に対する免疫学的過程の結果生じている可能性があり、一方、他のものでは、自己免疫反応は、複数の器官に存在し得る多くの型の抗原を伴っている可能性がある。いくつかの一連の証拠によって、免疫系が自己免疫疾患の病状に関与することが示唆されている。第一に、個体において自己免疫疾患が進行する可能性は、その遺伝的背景に密接に関係している。MHC-ペプチド複合体を認識する応答T細胞に(自己)抗原

50

を提示する主要組織適合複合体 (MHC) クラス II 分子をコードする遺伝子は、疾患感受性に対して強い遺伝的関連性を示す。第二に、単球／マクロファージ及び T 細胞のような免疫系の細胞が標的器官に侵入する。第三に、自己免疫疾患の患者の T 細胞は、インビトロで、潜在的に関連する自己抗原に応答して増殖する。第四に、自己免疫の動物モデルにおける研究は、単球／マクロファージ及び T 細胞のような免疫系の細胞が疾患の活性の誘発及び発現に関与することを明白に実証している。

【0004】

関節リウマチ (RA) のような疾患は、自己免疫疾患の場合に発生し得る免疫病理学を説明することができる。RA は、一般的な臨床的症状が、滑膜細胞の増殖、パンヌスの形成、軟骨の破壊及び骨の侵食による持続的炎症性滑膜炎、及び究極的には機能不全を招く関節変形である、慢性多系統疾患として示される。

10

【0005】

RA のような免疫系が不要な、望ましくない炎症性応答を発生させる免疫不全疾患に対する従来の治療法は、不適當である。治療においては、その原因よりむしろ自己免疫疾患の症状の緩和に焦点が合わされてきた。自己免疫疾患の治療に用いる大部分の薬剤、例えばステロイド及び非ステロイド性抗炎症化合物は、非特異的であり、著しい毒性の副作用を有する。これは、自己免疫疾患が慢性の病状であり、長期にわたる薬剤の投与を必要とするために、特に問題である。

【0006】

抗原駆動性、非毒性の免疫調節治療は、非特異的免疫抑制に代わる非常に魅力的な、手段をもたらす。この抗原特異的治療は、標的 (自己) 抗原、又は (自己) 抗原から誘導される合成の T 細胞反応性ペプチドを用いる患者の治療を含む。これらの合成のペプチドは、(自己) 抗原の T 細胞エピトープに相当し、それ自身及び (自己) 抗原の両方に特異的 T 細胞寛容を誘導するために使用することができる。標的 (自己) 抗原の制御された投与は、免疫系の脱感作において非常に有効となり得る。免疫系の脱感作又は免疫寛容は、抗原もしくはエピトープを餌で与えられていたか又は吸入させられていた動物は、該抗原もしくはエピトープを全身性の経路を通じて導入するときに、該抗原もしくはエピトープに対する全身性免疫応答を発生させる能力がより少ないという、長期的に観察される現象に基づく。

20

【0007】

免疫療法のための抗原の使用に関しては、ヒト軟骨 (HC) gp-39 タンパクが関節炎の治療のための全身性免疫寛容の誘導に有効であることがごく最近報告されている (Jensen 等, Arthritis Rheum. 43: 645-655, 2000)。経鼻投与上で、HC gp-39 はマウスの II 型コラーゲン誘導性関節炎の進行を妨げた。治療の結果として、疾患の活性及び関節の破壊の両方が改善された。

30

【0008】

関節リウマチのような自己免疫疾患に関連するタンパクの探索において、新規遺伝子 SCIM-1 (滑膜／軟骨炎症関連メッセンジャー 1) が同定された。SCAM-1 mRNA によってコードされるタンパクは、以前に報告されていない。SCAM-1 mRNA の同定上、mRNA の断片のみが公開のドメインデータベース中に発現配列タグ (EST) として存在することが認められた。公開の EST から、同定された SCIM-1 cDNA を再配列することは不可能であった。SCIM-1 タンパクの最高の相同性は、フィブリン-1 の EGF 様ドメイン、すなわち 9 個の EGF 様ドメインを含む細胞外タンパクで見出された。フィブリン-1 は、フィブリノーゲンとの相互作用によって、血管壁の細胞外マトリックスを血小板上のインテグリン- α IIb β 3 と結合させ得る (Godyna 等, Blood 88: 2569-2577, 1996)。その EGF 様ドメインによって、フィブリン-1 は、ニドゲン、フィブロンectin、ラミニン、フィブリノーゲン、NOVH、アグリカン及びパーシカンと結合する (Tran 等, J. Biol. Chem. 272: 22600-22606, 1997; Perbal 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 869-874, 1999; Barth 等, Matrix

40

50

Biol. 17:635-646, 1998)。フィブリン-1の高い発現は、腫瘍の形成及び転移を妨げられると思われる (Qing等. Oncogene 15:2159-2168, 1997)。SCIM-1は、EGF様ドメインのそのRGDモチーフに関与させることによって、同様の能力を持つと考えられる。

【0009】

Sarkisian及びLafyatisの報告 (J. Immunol. 162:1772-1779, 1999)に基づいて、例えばRA患者からの繊維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) の増殖が、PDGFといったマイトジェンサイトカインに加えてインテグリン結合細胞外マトリックスタンパクによって与えられるシグナルを必要とすることから、SCIM-1とインテグリンの推定上の相互関係は、RAと関連しうる。Wang等 (Arthritis Rheum. 40:1298-1307, 1997)は、 α v、 α 4及び α 5インテグリンが、RA-FLSによる関節軟骨のIL-1 β 刺激性侵入に必要であることを示唆した。 10

【0010】

SCIM-1遺伝子は、滑膜及び軟骨組織において比較的高く発現されることがわかった。cDNA部分配列に基づいて、全長のcDNAをヒト軟骨細胞から分離した。多組織ノーザンブロット探索によって、SCIM-1遺伝子は健康なヒトのドナーからの主要軟骨細胞において発現される一方、いくつかの発現は脳及び肺においても観察されたが、これらの組織におけるSCIM-1 mRNAは長さが異なるようであった。心臓、胎盤、肝臓、骨格筋、脾臓、腎臓及び大腸のような他のヒト組織、又は、単球、動脈内皮細胞及び (培養された) 滑膜繊維芽細胞の細胞株においては、低い発現が観察されたか又は発現が観察されなかった。 20

【0011】

SCIM-1の発現は、発現が主要軟骨細胞のみで検出され、SV40で形質転換されたヒト主要軟骨細胞では検出されなかったことから、分化した軟骨細胞の表現型と正の相関関係があるように思われる。さらに、ヒト軟骨細胞におけるSCIM-1遺伝子の発現は、RAに関連するサイトカインTNF- α 及びIL β の存在下で促進されることが示された。軟骨細胞において、SCIM-1遺伝子の転写は、653個のアミノ酸のタンパクをコードする2.7kb mRNAを結果として生じる。多組織ノーザンブロットのデータ及び、インサイト及び公開のドメインデータベースの配列に基づいて、SCIM-1の転写は、関節、脳及び肺において異なるスプライシングを受けることが見出された。 30

【0012】

これらの予測されたタンパクモチーフに基づいて、SCIM-1タンパクは、細胞外マトリックスタンパク、又は、軟骨細胞及び滑膜細胞及びその他の可能ないくつかの細胞型の細胞表面に局在するタンパクであることが予測される。

【0013】

(例えばRAのような) (自己)免疫疾患における主な問題は、免疫系が不利に反応している正確な標的又は抗原の大部分は知られておらず、このことから抗原特異的な方法で疾患の実体を調節することは不可能となり得るということである。

【0014】

しかしながら、(自己)免疫応答における標的として関与する抗原の知識なしに抗原駆動性、非毒性の形態の免疫調節療法を用い得るならば、それは重要な利点となるであろう。このような抗原駆動性療法は、自己免疫過程の中で放出又は産生されることが期待される抗原の使用を伴った抗原特異的調節細胞の発生と関連する。このような抗原は、炎症又は組織破壊の間に使用できるようになるであろう。自己免疫疾患の場合において、局所的に産生される自己抗原は、その後該抗原により誘導される調節細胞を活性化又は再活性化させる。 40

【0015】

T細胞媒介性の軟骨破壊を治療するために、寛容誘導療法を効果的に使用するためには、炎症過程を引き起こすT細胞を活性化させ、この自己抗原に対する患者を脱感作しうるT 50

細胞反応性（ポリ）ペプチドを同定する必要があるにある。

【0016】

本発明の目的は、全身性の免疫寛容、より詳しくは特異的T細胞寛容を、好ましくはT細胞媒介性軟骨破壊の患者における応答性軟骨抗原に対して誘導する能力をもつ（ポリ）ペプチドを提供することである。SCAM-1は、前記の要求を満たし、及び、免疫系の調節における有効な寛容原として使用できることが見出された。

【0017】

本発明において、全身性の免疫寛容の誘導下では、当然のことながら抗原特異的リンパ球は、リンパ球が抗炎症サイトカインを産生する状態となる方法で、抗原提示細胞（APC）によって刺激される。抗炎症サイトカインは、例えば、IL-4、IL-10及び／又はTGF- β であってよい。APCによって寛容となるリンパ球は、体の他の領域、例えば炎症が進行している領域を、抗炎症状態にすることができる。

【0018】

免疫系は、T-及びB-リンパ球のような特異的細胞の活性化、及びインターロイキン、抗体及び補足因子といった可溶性因子の産生によって、外来の抗原から個体を保護し、且つ外来の抗原への露出に応答する。免疫系が応答する抗原は抗原提示細胞（APCs）によって分解され、抗原の断片は主要組織適合複合体（MHC）クラスII糖タンパクによって細胞表面上に示される。MHC糖タンパク-抗原-断片複合体は、T細胞に提示されて、そのT細胞受容体の効力によって、それが結合するMHCクラスIIタンパクと連携して抗原断片を認識する。T細胞は活性化、すなわち増殖及び／又はインターロイキンを産生して、攻撃下の抗原に向けられる活性化リンパ球の拡大を生じる（Grey等., Sci. Am., 261:38-46, 1989）。

【0019】

自己抗原はまた、連続的に処理されて、MHC糖タンパクによって抗原断片としてT細胞に提示される（Jardetsky等., Nature 353:326-329, 1991）。このように自己認識は免疫系に固有のものである。正常な環境下では、免疫系は自己抗原に寛容であり、これらの自己抗原による免疫応答の活性化は避けられる。自己抗原に対する寛容が失われるとき、免疫系は1もしくは2以上の自己抗原に対して活性化し、結果として自己反応性T細胞の活性化を、そして時には自己抗体の産生をも生じる。この現象を、自己免疫と呼ぶ。一般的に免疫応答は破壊的であり、すなわち侵入性の外来抗原を破壊することから、自己免疫応答は体自身の組織の破壊を引き起こしうる。

【0020】

このようにSCIM-1タンパクの断片がAPCによって発現され、それゆえSCIM-1の断片もまた免疫応答を誘発する能力をもつことは明らかである。

類似の機能を有するか、又は少なくともヒトSCIM-1タンパクと構造的に密接に関連している他の種のタンパクもまた、同様の寛容効果を果たし得る。従って、相同ポリペプチド又はその一部もまた本発明に含まれる。

【0021】

本発明のタンパクは、配列番号2を含むポリペプチドだけではなく、70%、好ましくは90%、より好ましくは95%、98%、最も好ましくは99%の類似性を持つポリペプチドも含む。さらに寛容効果を与える能力をもつこのようなポリペプチドの一部も含まれる。このような部分は、それ自体が例えば可溶化された形態で機能を持ってもよく、又は、キメラタンパクを得るための既知のバイオテクノロジー的方法か化学合成のいずれかによって、他のポリペプチドと関連してもよい。

【0022】

本明細書で使用される類似性という用語は、NCBI-BLAST2.0.10 [1999年8月26日]で定義される（Altschul等., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997）。

【0023】

SCIM-1タンパクの断片又は相同ポリペプチドは、当然のことながらタンパクの部分

配列である。これらの部分配列は、リンパ球機能を調節しうる。それらは以下の機能的免疫調節特性を持つことが好ましい：i) ペプチドは、疾患関連性MHC分子、好ましくはHLA-DRB1*0101、DRB1*0401、DRB1*0404、DRB1*0408、DRB1*0405、DQB*0301、又はDQB*0302によって結合することができる、及び、ii) ペプチドは、ヒト、好ましくは自己免疫の患者、より好ましくはRAの患者において、T細胞応答を誘発し得なければならない。このような応答は、例えばインビトロでのT細胞増殖アッセイにおいて又はT細胞サイトカイン産生検出アッセイ（例えばエライザもしくはエリスロット）において測定することができる（Coligan等., Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc., 1998）。好ましくは、ペプチドはまた、相当する前記のヒトMHCクラスII分子を遺伝子導入された動物のT細胞、及びSCIM-1（ポリ）ペプチドにて免疫化されたヒトCD4によって認識される必要がある。

10

【0024】

これらの部分配列の長さは、相当するMHC分子によって認識されるエピトープを含むならば重要ではない。好ましくは、これらのペプチドは、9-55個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つ。より好ましくは、ペプチドは、9-35個、特に9-25個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つ。さらにより好ましくは、9-15個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列をもつペプチドである。最も好ましくは、13もしくは14個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドである。

【0025】

特により小さいペプチドの配列において発生する変異は、全配列でのアミノ酸の差異によって、又は、該配列内のアミノ酸の欠失、置換、挿入、逆転もしくは付加によって説明することができる。生物学的及び免疫学的活性を本質的に変えないと思われるアミノ酸置換は説明してある。関連するアミノ酸の間でのアミノ酸交換、又は進化において頻繁に発生したアミノ酸交換は、とりわけSer/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Valである（Dayhof, M. D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., ワシントンD. C., 1978, 第5巻, 補遺3を参照）。この情報に基づいて、Lipman及びPearsonは、迅速かつ高感度なタンパクの比較（Science, 227:1435-1441, 1985）及び相同ポリペプチド間の機能的類似性の決定方法を開発した。

20

30

【0026】

例えば本発明のペプチドの二量体もしくは三量体のようなペプチドの多量体もまた、本発明の範囲内である。本発明の多量体は、多数の同一ペプチドからなるホモマー又は異なるペプチドからなるヘテロマーのいずれかであり得る。

【0027】

（ポリ）ペプチドは、ペプチドの片側又は両側のいずれかで伸長されても、さらに同じ免疫学的機能を発揮することは、当業者に明らかである。伸長した部分は、タンパクの生来の配列に類似のアミノ酸配列であってもよい。しかしながら、（ポリ）ペプチドは、人工の配列によって伸長されてもよい。（ポリ）ペプチドはその本来の機能を発揮する必要はなく、それ自体は不活性でもよいが、本発明の免疫学的機能をなお果たしていることは、明らかであろう。本発明の（ポリ）ペプチドはMHC分子に結合することができ、その結合溝は該ペプチドに占められる。また、好ましくはアミノ酸配列からなる可変のリンカー分子は、ペプチドに結合できる。MHC分子は、定常ドメインを持つ必要がなく、可変ドメインのみから構成されていてもよく、お互いに直接結合するか可変リンカー分子を通して結合するかのいずれかである。このような複合体の利点は、それが可溶形態で存在でき、したがってT細胞に直接認識され得ることである。

40

【0028】

よって本発明に従って、（ポリ）ペプチド、すなわち配列番号2のポリペプチドを含む抗原上に存在するMHCクラスII制限T細胞エピトープ又はこれらのエピトープを含む断

50

片に類似した（ポリ）ペプチドは、哺乳動物、より具体的には、リンパ球もしくはT細胞媒介性軟骨破壊、例えば関節炎、より具体的には関節リウマチを患うヒトにおいて、該抗原に対する全身性の免疫寛容を誘導する療法における使用に非常に適している。このような治療は、場合によって、DMARDs（疾患緩和性抗リウマチ薬、例えばスルファサラジン、抗マラリア薬（クロロキン、ヒドロキシクロロキン）、注射用もしくは経口用の金、メトトレキサート、D-ペニシラミン、アザチオプリン、シクロスポリン、マイコフェノレート）、NSAIDs（非ステロイド性抗炎症薬）、コルチコステロイドのような他の薬剤、又は自己免疫患者における疾患の治療過程に作用することが知られている他の薬物の投与と併用することができる。

【0029】

本発明のポリペプチドはまた、配列番号2のポリペプチドを含むタンパクもしくはその一部分である抗原と同じ組織に存在するが、該抗原以外の抗原に反応性をもつリンパ球の調節に使用されてもよい。抗原特異的T細胞寛容の誘導によって、自己免疫疾患を、全身性免疫寛容により治療することができる。より一般的には、調節される細胞は造血細胞である。一般的に、寛容原として機能するためにはペプチドは少なくとも2つの条件を満たす必要がある、すなわち免疫調節能力を有する必要がある、及びたいはいはより大きいタンパクの一部として局所的に発現される必要がある。

【0030】

従って本発明は、本発明の（ポリ）ペプチドを含む製剤を投与することによる、炎症性自己免疫疾患の患者を治療する方法を提供するものである。この（ポリ）ペプチドは、自己反応性T細胞によって認識され且つこれを刺激する能力をもつT細胞エピトープを含む。これらのT細胞は、例えば炎症性の疾患の患者の血中に見いだすことができる。該患者は、例えば、バセドウ病、若年性関節炎、原発性糸球体腎炎、多発性関節炎、骨関節炎、シェーグレン症候群、重症筋無力症、関節リウマチ、アジソン病、原発性胆管硬化症、ぶどう膜炎、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、多発性硬化症、又は糖尿病の患者である。それゆえ本発明のポリペプチドは、炎症性疾患を予防する医薬品製剤として用いることができる。SCIM-1の投与は全身性寛容を誘導する。より具体的には、ポリペプチドは、炎症性疾患、好ましくは免疫細胞介在性軟骨破壊を患う患者において特異的免疫寛容を誘導する医薬品製剤として使用することができる。好ましくは、免疫細胞はT細胞である。最も好ましい疾患は関節炎であり、より好ましくは関節リウマチである。

【0031】

本発明のポリペプチドを用いた自己免疫疾患の治療は、全身性免疫寛容が、非関連性であるが共局限性である抗原を生じるという事実を利用するものである。免疫応答を下方に調節し得るサイトカインのような抗原特異型多面性タンパクにおいて、調節細胞は分泌する。

【0032】

本発明のポリペプチドは、組替えDNA技術によって調製され得る。

【0033】

本発明は、本発明のタンパク又はポリペプチドをコードするようなDNA配列を提供するものである。

【0034】

本発明はまた、その一部が配列番号1で表される完全なmRNA配列を含むものである。完全なコーディングDNA配列は、配列番号1のヌクレオチド59-2017に示される。さらに、コドンの可変性に対応するために、本発明はまた、本明細書に開示される配列と同じアミノ酸配列をコードする配列を含む。同じ免疫学的機能を持つ個々のポリペプチドをコードするコード配列の一部もまた、その対立遺伝子もしくは種の変化形と同様に、本発明の一部である。遺伝子は、時には特定の組織においてスプライシング変異体として発現し、結果として、変化した5'もしくは3' mRNA、又は追加のエクソン配列の包含を生じる。これらの配列によってコードされたタンパクと同様に、これらの配列は、全て、同一又は類似の機能を果たすことが期待され、また本発明の一部に含まれる。

10

20

30

40

50

【0035】

詳しくは、配列番号16、配列番号17及び配列番号18は、配列番号1のヌクレオチド1852の下流の配列において配列番号1と異なる特異的スプライス変異体を示す。このスプライス変異体の翻訳は、配列番号19、配列番号20及び配列番号21それぞれに示すように、配列番号2におけるタンパクのトランケート体を導く。これらの後者の核酸のコード配列は、それぞれ59-1969、59-1912及び59-1894の位置から作動し、一般的に、配列番号2の最初の598個のアミノ酸を持つ。好ましくは、完全なタンパクは成熟したタンパクである。シグナル配列は、たいがい19個のアミノ酸であるが、長さはわずかに異なる。

【0036】

本明細書で与えられる配列情報は、誤って同定された塩基を含める必要があるほど狭義に解釈されるべきではない。本明細書で開示される特異的な配列は、次いでさらなる配列分析が容易にされ、それにより配列を誤って同定し得る完全な遺伝子を分離するために容易に用いることができる。

【0037】

従って、本発明はまた、SCIM-1をコードする分離されたポリヌクレオチド、その不完全な翻訳、又はその断片を提供するものである。

【0038】

本発明のDNAは、cDNAから得られてもよい。好ましくは、組織はヒト由来のものである。好ましくは、リボ核酸は、胎児の脳、胎児の肝臓、胎児の脾臓、胎盤、又はその他の組織から分離される。あるいは、コード配列は、ゲノムDNAであるか、DNA合成法を用いて調製される。ポリヌクレオチドはまた、RNAの形態であってもよい。ポリヌクレオチドがDNAである場合、一本鎖又は二本鎖の形態であってもよい。一本鎖は、コード鎖又は非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。

【0039】

さらに本発明は、わずかな変異又は多型性領域を有するポリヌクレオチドに関するものである。わずかな変異を有するポリヌクレオチドは、生来の成熟タンパクと同じ生物学的機能もしくは活性を持つポリペプチドをコードする。多型性領域は、診断目的として有用である。該ポリヌクレオチドは、好ましくは高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることにより同定することができる。本発明に従って、「ストリンジェンシー」という用語は、65℃の温度、1×SSC、0.1%SDSでの洗浄条件を意味し；高ストリンジェンシーは、SSCを0.3×SSCに、より好ましくは0.1×SSCに減らすことを指す。好ましくは、最初の2回の洗浄は、15～30分間ごとに2回続けて行われる。高ストリンジェンシー条件下で洗浄する必要がある場合は、0.1%SSCでさらに1回15分間行う。ハイブリダイズは、例えばpH7.5の0.5Mリン酸緩衝液/7%SDS中、65℃で、一晩中行われる。

【0040】

あるいは、同じ免疫学的機能を持つポリペプチドをコードする前記のポリヌクレオチドの断片もまた、本発明において具体的に示される。コードされたタンパク又はタンパクから誘導されたポリペプチドもまた、本発明の一部を形成する。

【0041】

本発明のタンパク、ペプチド、該ペプチドの多量体又はキメラペプチドをコードする核酸配列は、発現ベクターに挿入される。適当な発現ベクターは、複製及び発現に必要な制御領域を持つ。発現ベクターは宿主細胞において発現を起こす。適当な宿主細胞は、例えば、細菌、酵母菌、及び哺乳類細胞である。このような手法は当該技術分野において良く知られており、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989を参照されたい。

【0042】

10

20

30

40

50

本発明の（より小さい）（ポリ）ペプチドはまた、例として、例えば J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149 (1963) 及び Int. J. Peptide Protein Res. 35: 161-214 (1990) に記載された固相ペプチド合成のような、ペプチド合成のための周知の有機化学的方法により調製することができる。

【0043】

（ポリ）ペプチドは、エキソペプチダーゼが触媒する加水分解を減らす、C 及び／又は N 末端修飾により安定化されていてもよい。修飾は、C 末端のアシル化、（例えば、アシル化 = Ac-ペプチド）、N 末端のアミド導入（例えば、ペプチド-NH₂）、アシル化とアミド導入の併用（例えば、Ac-ペプチド-NH₂）及び、L-アミノ酸のかわりに D-アミノ酸の導入を含んでもよい（Powell 等., J. Pharm. Sci., 81: 731-735, 1992）。 10

【0044】

他の修飾は、エンドペプチダーゼによる加水分解の抑制に焦点を合わせたものである。これらの修飾の例は、L-アミノ酸のかわりに D-アミノ酸の導入、アミノ酸の修飾、ペプチド間での環化、例えば減少したペプチド結合 ψ [CH₂NH] 及び例えばペプトイド（N-アルキル化グリシン誘導体）といった修飾されたペプチド結合の導入である（Adang 等., Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 113: 63-78, 1994 及び、Simon 等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367-9371, 1992）。 20

【0045】

本発明の寛容原ペプチドは、以下

- a) SCIM-1 ペプチド断片をコードする DNA 断片を適当な宿主細胞に導入するステップ；
 - b) 宿主細胞を、導入された DNA 配列の発現を可能にする条件下で培養するステップ；
 - c) 発現産物をリンパ球と接触させるステップ；及び
 - d) リンパ球活性を確立するステップ
- を含む方法を用いて同定することができる。

【0046】

好ましくは発現産物を、インビボで、例えば産物を動物に投与することによってリンパ球と接触させる。リンパ球活性は、例えば抗炎症性サイトカインの決定により測定することができる。 30

【0047】

あるいは、ステップ b) における宿主細胞の発現産物は、分離されて順次に抗原提示細胞及び T 細胞に接触させられてもよく、T 細胞活性は確立されてもよい。

【0048】

前記のスクリーニング方法において、試験されるペプチドは化学的に合成されていてもよいことは明らかである。

【0049】

このように同定されるペプチドは、ペプチドと薬学的に許容できる担体との混合物を含む薬剤組成物の調製に使用することができる。 40

【0050】

本発明に従って、T 細胞媒介性の関節軟骨の破壊を患う患者を、1 又は 2 以上の本発明のペプチド及び薬学的に許容できる担体を含む治療組成物を用いて治療することができる。本発明の薬剤組成物の投与は、全身性の免疫寛容、特に 1 もしくは 2 以上の本発明のペプチドのアミノ酸配列によって特徴づけられるもしくは模倣される、同定された MHC クラス II 結合 T 細胞エピトープを示す、攻撃下の関節軟骨の自己抗原性タンパク及び他の自己抗原に対して、これらの患者の特異的自己反応性 T 細胞の寛容を誘導する。誘導寛容は、このように攻撃下の関節軟骨において局所的炎症性応答の低減を導く。

【0051】

本発明の（ポリ）ペプチドは、自己反応性 T 細胞において特異的な効果を持つため、非特 50

異的抑制効果を持つ免疫抑制剤と比較して、免疫系の他の構成成分を損なわないという利点を有する。

【0052】

全身性免疫寛容は、高用量もしくは低用量の本発明のペプチドの投与によって獲得することができる。ペプチドの量は、投与経路、投与時間、患者の年齢、同様に全般的な健康状態及び食事に依存する。

【0053】

一般的に、体重1kgあたり0.01から10000μgの用量のペプチド、好ましくは0.05から500μg、より好ましくは0.1から100μgのペプチドを使用することができる。

10

【0054】

薬学的に許容できる担体は当業者に既知のものであり、例えば、滅菌生理食塩水、乳糖、ショ糖、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストリン、寒天、ペクチン、ピーナツ油、オリーブ油、ゴマ油及び水を含む。他の担体は、例えば所望により、リポソームに包埋されるMHCクラスII分子であってもよい。

【0055】

さらに本発明の薬剤組成物は、1又は2以上のアジュバンドを含んでいてもよい。適当なアジュバンドは、数ある中でも、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、アンフィジェン、トコフェロール、モノリン酸リピッドA、ムラミールジペプチド、及びクイルAのようなサポニンを含んでいてもよい。好ましくは、本発明の寛容療法に使用されるアジュバンドは、粘膜上皮に結合するコレラトキシンBサブユニットもしくはカルボマーのような、粘膜性のアジュバンドである。アジュバンドの量はアジュバンドそのものの性質に依存する。

20

【0056】

さらに本発明の薬剤組成物は、1又は2以上の、例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ショ糖デキストリン及びブドウ糖を含む糖質、アルブミンもしくはカゼインといったタンパクのような安定化剤、又は、アルカリフォスファターゼのような緩衝剤を含んでいてもよい。

【0057】

適当な投与経路は、例えば、筋肉内注射、皮下注射、静脈注射又は腹腔内注射、経口投与、及び、スプレーのような経鼻投与である。

30

【0058】

(ポリ)ペプチドの(自己)免疫応答に対する能力を試験するために好ましい。マウス膠原誘導関節炎(CIA)、ラットアジュバント関節炎、マウス実験的アレルギー性脳脊髄炎、及び、マウスもしくは遺伝子導入マウス非肥満性糖尿病(NOD)のような、いくつかのネズミモデルが示されている。このようなモデルにおいて、抗原は、静脈内、腹腔内、経口又は経鼻で投与されてもよい(Libau等., Immunol. Today 18:599-603, 1997による再考)。これらのモデルにおける解読を容易にするためには、信頼区間を増やすことが重要である。本発明に従って、関節炎モデルにおける発生率及び臨床スコアを、関節炎の元要因、例えばCIAにおけるII型膠原と、細胞外マトリックスタンパクアグリカンから誘導されるペプチドを合わせることによって改善できることが見出された。このペプチドは、好ましくは元要因と同時に投与され得るが、個別での投与も可能である。

40

【0059】

SCIM-1又は本発明のペプチドは、関節軟骨の慢性炎症を伴う活性化自己反応性T細胞の存在を検出する診断方法における使用にも非常に適している。

【0060】

本発明の診断方法は、以下の：

- a) 末梢血単核細胞(PBMC)を個体の血液サンプルから分離するステップ、
- b) 該PBMCを適当な条件下で培養するステップ、

50

c) 該 P B M C 培養物を、自己抗原、又は、本発明に従って自己抗原から誘導される 1 もしくは 2 以上のペプチドの存在下でインキュベートするステップ、及び d) 個体中の活性化自己反応性 T 細胞の存在を指標して、T 細胞の応答、例えば増殖応答を検出するステップを含む。

【0061】

活性化 T 細胞の増殖応答を測定することにより応答を検出する場合、例えば ^3H -チミジンのような放射性同位体の取込みが増殖の目安となる。P B M C に存在する自己反応性 T 細胞の応答はまた、サイトカイン特異的エライザを用いてサイトカイン放出を測定する、又は ^5I クロム放出を用いて細胞毒性を測定することによって検出することもできる。他の検出方法は、例えば I I - 2 R の F A C S 分析による、活性化マーカーの発現の測定である。よって、1 もしくは 2 以上の本発明のペプチド及び適当な検出試薬を含む診断用組成物は、本発明の一部を形成する。検出法に依存して、検出試薬は、放射性同位体、酵素、又は、細胞表面もしくは活性化マーカーに特異的な抗体であってよい。

10

【0062】

1 もしくは 2 以上の本発明のペプチドを含む試験キットもまた、本発明の範囲に含まれる。これらの試験キットは、本発明の診断方法において使用することができる。

【0063】

従って本発明は、S C I M - 1 に反応性を持つ自己攻撃性 T 細胞が、T 細胞媒介性軟骨破壊、例えば関節炎、詳しくは関節リウマチを患う患者に存在するかどうかを検出する方法を提供するものである。S C I M - 1 特異的 T 細胞が存在する場合、S C I M - 1 又は本発明のペプチド又はその組み合わせを含む薬剤組成物を用いたこれらの T 細胞の寛容化は、関節炎の進行を遅らせるか又は抑制することができる。

20

【0064】

以下の実施例は本発明を説明するためのものであって、決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0065】

図面の説明

図 1

S C I M - 1 及び G A P D H に特異的なオリゴヌクレオチドを用いたヒト軟骨 c D N A 上の R T - P C R。S C I M - 1 遺伝子発現の検出は、健康な軟骨（膝、男性；交通事故；レーン 1）、及び 4 人の R A 患者の軟骨（膝／腰、女性 3 人、男性 1 人；レーン 2 - 5）に見られる。同じ 4 人の R A サンプルにおける G A P D H 遺伝子発現の検出は、レーン 7 - 10 に見られる。D N A 断片長マーカーとしての 1 0 0 b p ラダー（G i b c o - B R L）は、レーン 6 において平行に流した（レーンの中間の主要バンドは 6 0 0 b p に相当する）。

30

【0066】

図 2

S C I M - 1 プローブ（配列番号 1 の n t 5 6 0 - 1 0 4 8）は、カスタムメードの結合ノーザンブロットにおいてハイブリダイズされた（上部パネル）。表示されるヒト細胞／組織：U 9 3 7 単球 + P M A - イオノマイシン（レーン 1）、H A E C 内皮細胞 - / + T N F - α （それぞれレーン 2 - 3）、S C R O 1 4 . S F 主要滑膜繊維芽細胞 + T N F α （レーン 4）、P C G S V 4 0 . 0 4 形質転換軟骨細胞 - / + T N F α （それぞれレーン 5 - 6）、及び主要軟骨細胞 - / + T N F α （それぞれレーン 7 - 8）。レーンごとに、1 - 2 μg のポリ（A+）R N A が入れられた。対照として、ブロットは、ヒト β -アクチン遺伝子から誘導された ^{32}P -標識 c D N A を用いてプローブされた（下部パネル）。

40

【0067】

図 3

4 つの異なる S C I M - 1 m R N A 種によってコードされる選択的カルボキシ末端、すなわち変異体 A - D。コードされる C - 末端が表示され、及びアミノ酸は 1 文字コードで表

50

される。配列はアミノ酸 599 番から異なる。変異体 A-D のコードされたアミノ酸配列は配列番号 20-23 によってそれぞれ表わされ、相当する核酸は配列番号 16-19 によってそれぞれ表される。

【0068】

図 4

トランスフェクト CHO 細胞における SCIM-1 変異体 A/His6 発現の検出。pNGV1 (レーン 1) 又は pNGV1-SCIM 変異体 A (His6) (レーン 2 及びレーン 3) を用いて形質導入した CHO 細胞の培養上清のサンプルを、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離して、ウェスタンブロットを行った。抗 (His6)-タグモノクローナル抗体 (Dianova GMBH) を用いて、(His6)-末端を含むタンパクを検出した。タンパク分子量マーカーは、レーン 4 (M) に流した。

【0069】

実施例

実施例 1: SCIM-1 遺伝子の同定

LifeSeq データベース (Incyte Pharmaceuticals) から入手可能な cDNA ライブラリーを、関節組織のような RA 関連組織を表すカスタムメイドの組織カテゴリーを定義するために、それらの遺伝子の内容に基づいてクラスター化させた。cDNA ライブラリー間の距離は、平方ユークリッド距離の測定によって算出され、及び、結果は平均連鎖法を用いて系図にクラスター化させた (Fry 1993, Biological Data Analysis, Oxford University Press, ニューヨーク)。結果として得られた 2 つの集団は、それぞれ非腫瘍性の滑膜又は軟骨組織から誘導された 5 ライブラリーの cDNA を含んでいた。それぞれの 4038 から 5627 配列反応の滑膜 cDNA ライブラリーデータは利用可能であり、及び、それぞれの軟骨 cDNA ライブラリーの 1554 から 7231 配列反応のデータも利用可能である。これらの配列データは、その発現が比較的これらのクラスターに制限されると思われる遺伝子としてプローブされた。それぞれインサイト-エスト配列及び配列番号 1 の一部が重複して構成されている 2 つの cDNA 部分断片を、陽性のヒットとして同定した。それらの発現パターンが類似しているように見られたことから、それらが同じ遺伝子から派生したと推測された。

【0070】

実施例 2: RA の軟骨における SCIM-1 遺伝子発現

疾患組織における SCIM-1 遺伝子の発現を、SCIM-1 特異的オリゴヌクレオチド (配列番号 3, 5' TTGCCAATTACGCCCTACGGT 及び配列番号 4, 5' CCTGGTCAATTGTCAAGTCGG) を用いた RT-PCR によって、4 人の RA 患者及び 1 人の健康なドナーの軟骨サンプルから誘導された cDNA 上で検出した。関節軟骨は、膝の関節交換手術の中で得られた。軟骨から軟骨細胞を酵素的に分離し、トリゾール (Gibco-BRL) もしくは RNazol B (Cambio Scientific) を用いて RNA を分離した。 (Cornelissen 等., 1993, J. Tiss. Cult. Meth. 15: 139-146)。全量 20 µl のスーパースクリプト (登録商標) II (Gibco-BRL) を用いて、1 µg の全 RNA から cDNA の合成を行った。陽性対照として、SCIM-1 上の及びハウスキーピング遺伝子 GAPDH 上の RT-PCR において、反応ごとに 0.5 µl の cDNA を使用した。PCR は、パーキンエルマー 9600 において: 1 サイクル 5 分 94 °C、35 サイクル 30 秒 94 °C / 30 秒 55 °C / 1 分 72 °C、1 サイクル 5 分 72 °C で、50 ng / プライマー、200 µM dNTPs、及び 2.5 uTaq ポリメラーゼ (ファルマシア、#27-0799) を使用して行った。GAPDH 特異的オリゴヌクレオチドは、配列番号 5 (5' CCTTCAATTGACCTCAACTACATGG) 及び配列番号 6 (5' GGTCACACACCTGTGTGCTGTAGCC) であった。PCR サンプルをアガロースゲル上で分析した (図 1)。レーン 1-5 は、健康な軟骨 (巨視的に) 及び 4 / 4 人の関節炎患者において期待される長さの SCIM-1 cDNA 増幅産生物の明瞭なシグナルを示し

、一方、GAPDH特異的増幅シグナルは、RAcDNA標本間で同じ大きさである（レーン7-10）。RT-PCRデータは、SCIM-1遺伝子が疾患組織、すなわち試験された4/4人のRA患者の苦痛を伴う膝軟骨において発現されることを示す。SCIM-1遺伝子が、実際は少なくとも相当のパーセンテージのRA患者の疾患関節軟骨において発現される可能性がある。したがって、SCIM-1タンパクがRA患者の疾患軟骨において合成されることが予想される。

【0071】

実施例3：関節関連細胞におけるSCIM-1遺伝子の発現

SCIM-1遺伝子発現の組織分布を決定するために、多組織ノーザンブロットをSCIM-1 cDNA断片を用いてプローブした。プローブは、Ready-To-Goビーズ（Pharmacia）及び³²P-α-dCTP（Amersham）を用いて、ランダムプライマー法でSCIM-1 cDNA断片nt（560-1048）及び（1983-2427）（配列番号1による番号付け）を標識し産生された。標識されたプローブは、1mlセファデックスG50-媒体カラム上で遊離のヌクレオチドから分離され、及び、約 3×10^6 cpm/mlの標識プローブを、ハイブリダイゼーション混合物（0.5Mリン酸緩衝液 pH7.0、7% SDS、1mM EDTA）に添加し、16時間、~65℃で、ノーザンブロットにハイブリダイズした。ブロットを、最大0.5×SSC、65℃で洗浄し、及び、STORM（登録商標）840リン酸スクリーンに暴露した。配列番号1に関連したプローブnt 560-1048は、脳の~2.4kb mRNA及び肺の~3.0kb mRNAに弱くハイブリダイズした（クロンテックヒト多組織ノーザンブロットH2及びH1、それぞれcat #7759-1及び7760-1）。主要軟骨細胞における~2.6kbの明瞭なシグナル（図2、上部パネルレーン7-8）を除き、他の関節関連培養細胞におけるシグナルを検出されなかった。ハウスキーピング遺伝子対照としての（図2、下部パネル）β-アクチンハイブリダイゼーションシグナルを補正したところ、SCIM-1 mRNAのシグナルは、TNFα（24時間、10ng/ml）の因子3-4によって、増幅されたようであった。他のSCIM-1プローブ、すなわちnt（1983-2427）では、クロンテック多組織ノーザンブロットH3（cat #7767-1）及びH2上でシグナルは検出されなかった。主要軟骨細胞のRNA上でのプローブnt（1983-2427）のハイブリダイゼーションは、TNF-αによる3-4倍のSCIM-1遺伝子発現の上方調節（発現の増加）を含み、プローブnt（560-1048）と同じ2.6kb mRNAのシグナルを得た（表示なし）。軟骨細胞をIL-1と共にもしくは無しでインキュベートし誘導したプローブを用いたcDNAマイクロアレイのハイブリダイゼーションは、3倍のSCIM-1を発現し、IL-1依存的上方調節を示した。また、プローブnt（1983-2427）のシグナルは、脱分化細胞を示すらしいSV-40形質転換ヒト軟骨細胞のノーザンブロットでは得られなかった。このことによって、i) SCIM-1遺伝子発現は、限定的な組織分布を示す、ii) 脳、肺及び軟骨細胞で検出された、異なる長さのmRNAは、スプライス変異体を示し得る、及び、iii) SCIM-1遺伝子発現は、TNF及びIL-1のような炎症促進因子によって高められることが結論づけられた。

【0072】

実施例4：全長SCIM-1 cDNAの分離

ヒトSCIM-1の完全コード配列を、SMART-RACE（#K1811-1、クロンテック）によって、1μgのTNA-α刺激性主要ヒト軟骨細胞の全RNAから産生されるRACE-cDNA上のSCIM-1特異的オリゴヌクレオチドを用いて同定した。軟骨細胞を、健康な軟骨（膝）から酵素的（コラゲナーゼ）に分離し、単層培養（Ham's/F12、10% FCS）で、約3週間培養して、その後10ng/ml TNF-αで24時間刺激した。オリゴヌクレオチドを、インサイトデータベースから同定される2つの遺伝子断片（実施例1）に使用できる配列に基づいて設計した。一番目の遺伝子断片プライマーは、5' RACEプライマー配列番号7（5' GGGTCCATTGTACCCCGCCACGACG）、及び入れ子プライマー配列番号8（5' CTC AAA

10

20

30

40

50

G T C C C C A T C A T G G T C C)、3' R A C E プライマー配列番号9 (5' C T C A G C C G C T G T C C G T C T T C C G G)、及び入れ子プライマー配列番号10 (5' G C T T C A A C A A C A A C T G G C T G C G)であった。二番目の遺伝子断片プライマーは、5' R A C E プライマー配列番号11 (5' G G A T G G G C T T G G G G A G G G T C T A G C T C)、及び入れ子プライマー配列番号12 (5' G C A G C A G C A C A A G C C C A C T T T C)、3' R A C E プライマー配列番号13 (5' G T G C C C A G G G A G G T G G T G T C A C T G)、及び入れ子プライマー配列番号14 (5' G C A C A G G A A G T A T G A G G A C T T T A G T G)であった。S M A R T - R A C E P C Rは、クローンテックマニュアルP T 3 2 6 9 - 1 (1999年3月)に従って実施された。R A C E c D N A クローンの番号を配列することにより、実施例1で同定された2つの遺伝子断片を示唆する配列番号1のコンティグc D N Aを得た。これは、同じ遺伝子に対応し、S C I M - 1を示す。翻訳開始コドンはn t 59に見られ、オープンリーディングフレームは、653アミノ酸にエンコードされていた。軟骨細胞において測定された2.6kbの長さのm R N Aに関しては、同定された2589bpのS C I M - 1 c D N Aが、相当する遺伝子の完全コード領域を含む可能性が非常に高いと考えられた。

【0073】

完全S C I M - 1 c D N Aが利用可能になると、ブラスト検索(N C B I - B L A S T 2 . 0 . 1 0 1999年8月26日; A l t s c h u l 等., N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2, 1997)によって、インサイト及び公開データベースにおいて核酸及びタンパク配列とのと比較がなされた。いくつかの公開エスト配列、及び特許出願W O 9 9 / 5 8 6 6 0に記載の~1100bp c D N Aは、S C I M - 1 c D N Aの一部と一致することが見出された。不完全な重複の結果、完全S C I M - 1遺伝子を、これらの公開のc D N A断片から再構成することはできなかった。本発明の完全にコードされたS C I M - 1アミノ酸配列(配列番号2)に基づいて、S C I M - 1の機能的タンパクドメインに関して予測がされた。シグナル配列はアミノ酸1-19又は1-21で、インテグリン結合R G Fモチーフは263-265アミノ酸で、カルシウム結合E G F様ドメインは551-598アミノ酸で、推定上の疎水領域は614-635アミノ酸で、及び、M H CクラスI I D R 4 D w 4結合モチーフは12-20、39-47、149-157及び323-331アミノ酸で同定された。

【0074】

実施例5: S C I M - 1 スプライス変異体及びそれらの組織分布

全長S C I M - 1 c D N A及び、S C I M - 1 c D N Aと一致する配列を含む全てのインサイト及び公開c D N Aを含む複数配列比較(D N A m a m 4.11版)から、c D N Aの集団は、ヌクレオチド1852(配列番号1による番号付け)の下流の混成で不均質であることが見出された。この下流領域は、直接E G F様ドメインに続く、タンパクのC末端をコードする。4つの異なるC末端領域を、S C I M - 1、すなわち変異体A-D(表1;それぞれ配列番号19-21、C末端の差異はアミノ酸位置599から開始)として同定し、異なる組織(それぞれ配列番号16-18;3'末端がヌクレオチド位置1853から異なる)から誘導されたc D N Aから推定して、及び、選択的スプライシング事象の結果生じることが期待される。変異体A、B及びCにおいて、配列番号16-18は、それぞれが推定上のポリ-アデニル化シグナルA A T A A Aに先導される3'ポリ(A)末端を含むために、それぞれ相当するm R N Aの3'末端を含む可能性が最も高い。変異体A及びBの3'UTR領域の異なる長さは、それぞれ軟骨及び脳組織のノーザンブロット上で検出されるS C I M - 1 m R N Aの長さに一致する(実施例3を参照)。変異体A-Dそれぞれをコードする多様なデータベースに見られるc D N Aクローンの数は、S C I M - 1変異体Aが、関節組織(軟骨/滑膜)において、及び多少は腫瘍及びいくつかの他の組織において優勢に発現される一方、変異体Bの発現が、中枢神経系の組織(主に脳)に限定して起こることを強く示唆する。示唆された組織限定的発現は、S C I M - 1変異体B(配列番号9及び15)に特異的なオリゴヌクレオチドを用いた、全脳のc D

NA (クローンテックヒト脳クイッククローンcDNA、cat. 7187-1/ロット 9070843) 上での、及び主要軟骨細胞のcDNA (TNF- α と共に24時間培養、実施例4を参照) 上でのRT-PCRによって裏付けられた。cDNAの合成及びPCRの条件は、実施例2の記載通りである。対照として、ハウスキーピング遺伝子GAPDH (配列番号5及び6) 特異的オリゴヌクレオチドを用いてPCRを実行した。脳組織においてSCIM-1変異体Bとして期待される長さの強力な増幅シグナルが見られたのに対して、軟骨細胞内の発現は、ほとんど検出できなかった。GAPDH遺伝子発現上の対照PCRによって、両組織に同様のシグナルが得られ、このことは、PCRにおいて相当するcDNAの投入量が類似していたことを示す。変異体Bの発現は、 ~ 2.4 kb mRNAによって示され、主要軟骨細胞 (24時間/TNF- α) においてほとんど検出することができなかったという発見は、実施例3及び4のデータと一致する。ノーザンブロット上で、 ~ 2.6 kbの一本鎖のSCIM-1 mRNA変異体のみが、主要軟骨細胞 (24時間/TNF- α) において検出され (図2、レーン8)、このことによって、変異体Aは、変異体Aの配列 (配列番号1を参照) のみが得られる軟骨細胞cDNA上の3' RACE増幅として表わされると結論づけられた。

10

【0075】

実施例6：組換えSCIM-1の発現

SCIM-1 (変異体A) cDNAを、クローニングベクターpCR2.1TOPO (インビトロジェン) 中にクローニングして、EcoRI断片として真核発現ベクターpNGV1 (EMBL カタログ番号X99274) 中にサブクローニングした。その結果、cDNAは、SV40初期プロモータ及びコザック翻訳開始配列の後方に位置する。翻訳停止コドンの上流に、18個のヌクレオチドが挿入され、His6-タグをコードした。真核細胞において組換えSCIM-1 (His6) タンパクを産生するために、CHO細胞 (ATCC CCL61) を、5% FCS (Harlan sera lab) を含むDMEM/Hamm's F12中で培養した。トランスフェクタム (プロメガ) 及び、選択培地である5% FCS及び0.8 mg/ml ネオマイシン (G418 スルフェート Gibco BRL Life technology、フィルターは0.22 μ M ミリポ SLGV025BS フィルターを用いて殺菌) を含むDMEM/Hamm's F12を用いて、pNGV1-SCIM-1 (His6) 作成物を、CHO-K1細胞にトランスフェクションした。組換えタンパクを検出するために、細胞を、血清が入っていない培地 (0.8 mg/ml ネオマイシン含有) で一晩中培養して、一日間継続して発現させた。血清が入っていない培地の上清を、SDS-PAGE上で分析して、その後ウエスタンブロットを行い、続けて抗His6モノクローナル抗体を用いて検出した。ブロットを、PBS中5% スキムミルク/0.05% Tween-20でブロックし、マウス抗 (His6) -タグ抗体を用いて発色させた (Dianova GmbH cat. no Dia900. 室温でPBSTを用いて5分間の洗浄を3回行った後、ブロットを、抗マウスIgG-HRP (プロメガ cat no 3624512) を用いてインキュベートした。室温でPBSTを用いて5分間の洗浄を3回行った後、HRPに対する発色基質、すなわち、PBS中ジアミノベンジジン四塩酸塩、2.5 mM CoCl₂ 及び0.006% H₂O₂ を用いて検出を行った。)

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【図1】

SCIM-1 及びGAPDHに特異的なオリゴヌクレオチドを用いたヒト軟骨cDNA上のRT-PCR。

【図2】

SCIM-1 プローブ (配列番号1のnt 560-1048) は、カスタムメードの関節ノーザンブロットにおいてハイブリダイズされた (上部パネル)。

【図3】

4つの異なるSCIM-1 mRNA種によってコードされる選択的カルボキシ末端、すなわち変異体A-D。

50

【図 4】

核酸導入されたCHO細胞におけるSCIM-1変異体A／His6発現の検出。

【図 1】

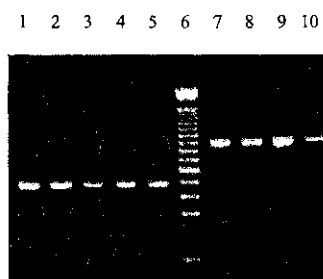


Figure 1

【図 2】

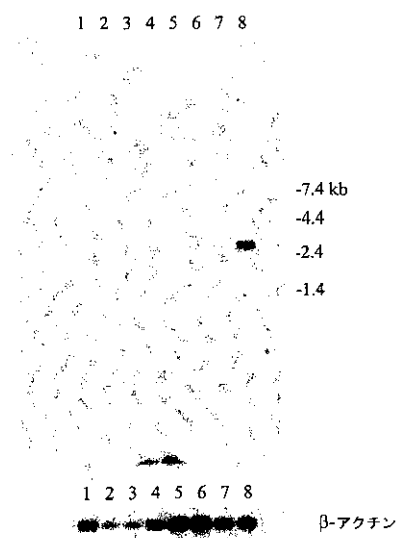


Figure 2

【図 3】

コードされたSCIM-1 ポリペプチドのカルボキシ末端	
変異体 A	
↓ aa598	
...NEDGTACV GTLGQSPGPRPTTPTAAAAATAAAAAA	
AGAATAAPVLVDGDLNLGSLVKESCEPSC (aa653)	
変異体 B	
...NEDGTACV AQVAFLLGGYSSAASRISEPLSRASYLSLGLSLCLQLVAL (aa637)	
変異体 C	
...NEDGTACV GWSFVLKIVTPQVGKSLGP (aa618)	
変異体 D	
...NEDGTACV ERTLLGLCNLLGK (aa612)	

Figure 3

【図 4】

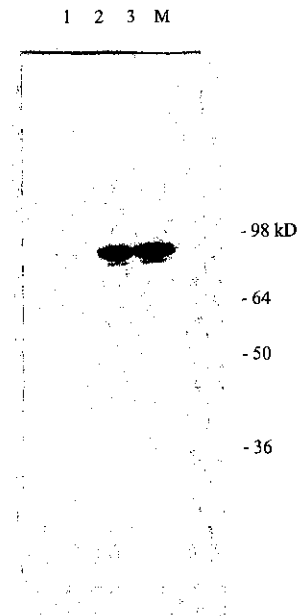


Figure 4

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06478 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
15/79, C07K 14/47, A61K 38/17, 48/00, G01N 33/53(74) Agents: VAN WEZENBEEK, P., M., G., F., P.O. Box 20,
5340 BIL Oss (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/07888

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, BA, BB,
BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE,
GD, GE, GR, HT, ID, IL, IN, IS, JP, KR, LC, LI, LU, LT,
LV, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO,
RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(22) International Filing Date: 9 July 2001 (09.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GL, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, 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, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Priority Data: 00202195.8 13 July 2000 (13.07.2000) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): AKZO
NOVEL N.V. [NL/NL]; Velperweg 76, NL-6824 BM Am-
sterdam (NL).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report
with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International BureauFor 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.(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): HIFUS, Hendrik,
Cornelis [NL/NL]; 41 bis, Rue du quatre Septembre,
F-92500 Rueil Malmaison (FR); NIELSEN, Robert,
Louis, Hubert [NL/NL]; Boitenhof 5, NL-5346 BIL
Oss (NL); MEEUWISSE, Cornelis, Maria, Leonardus
[NL/NL]; Opwetenselaan 1, NL-5612 DR Eindhoven
(NL).

WO 02/06478 A2

(54) Title: NOVELL EXTRACELLULAR MATRIX PROTEIN

(57) Abstract: The invention describes a novel protein and variants thereof as well as the genes coding for these proteins. The protein is useful in the prevention of inflammatory diseases, more specifically in the induction of T cell tolerance to the protein in patients suffering from rheumatoid arthritis.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

NOVEL EXTRACELLULAR MATRIX PROTEIN

The current invention relates to the isolation of a new polynucleotide molecule encoding a novel extracellular matrix protein, i.e. SCIM-1. The encoded protein or derivatives thereof, are useful for diagnosing, preventing or treating medical conditions. They can be used as modulatory agents for the treatment of autoimmune diseases, and more specifically rheumatoid arthritis.

The primary functional role of the immune system is to protect the individual against invading pathogens bearing foreign, that is non-self, antigens. In order to fulfil this function in a safe and effective manner, a mechanism is required to discriminate between foreign antigens and autoantigens derived from the individual's own body. Failure of this process of self-non-self discrimination, that is loss of immune tolerance to self-antigens, may lead to immune reactivity to autoantigens resulting in autoimmune disease, involving tissue damage and loss of organ function.

Autoimmune diseases are a major problem in human health care. Some autoimmune diseases may be the result of an immunological process directed at one antigen or antigenic complex whereas in others the autoimmune reaction may involve many types of antigens that may be present in multiple organs. Several lines of evidence have indicated that the immune system is involved in the pathology of autoimmune diseases.

First, the chances of individuals to develop an autoimmune disease are closely linked to their genetic backgrounds. Genes encoding major histocompatibility complex (MHC) class II molecules that present (auto)antigens to responding T cells which recognise MHC-peptide complexes show a strong genetic linkage to disease susceptibility. Second, cells of the immune system such as monocyte/macrophages and T cells infiltrate target organs. Third, T cells of patients with autoimmune diseases proliferate *in vitro* in response to potentially involved autoantigens. Fourth, studies in animal models of autoimmunity have unequivocally demonstrated that cells of the immune system such as monocyte/macrophages and T cells are involved in induction and expression of disease activity.

A disease as rheumatoid arthritis (RA) can illustrate the immunopathology that may occur in case of an autoimmune disease. RA presents itself as a chronic multisystem disease in which the common clinical manifestation is the persistent inflammatory synovitis accompanied by proliferation of synovial cells, pannus formation, cartilage

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 2 -

degradation and bone erosion, and ultimately joint deformity resulting in loss of function.

Existing therapies for the treatment of autoimmune disorders, such as RA, in which the immune system generates an unwanted and undesirable inflammatory response, are inadequate. Treatment has focused on relief of symptoms of autoimmune disease rather than on its cause. Most drugs used in the treatment of autoimmune diseases, e.g. steroids and non-steroidal anti-inflammatory compounds, are non-specific and have significant toxic side effects. This is especially problematic since autoimmune diseases are chronic conditions, which require the prolonged administration of drugs.

10

Antigen-driven, non-toxic immunomodulation therapy provides a very attractive alternative for the non-specific immunosuppression. This antigen-specific therapy involves the treatment of patients with the target (auto)antigen or with synthetic T cell-reactive peptides derived from the (auto)antigen. These synthetic peptides correspond to T cell epitopes of the (auto)antigen and can be used to induce specific T cell tolerance both to themselves and to the (auto)antigen. The controlled administration of the target (auto)antigen can be very effective in desensitisation of the immune system. Desensitisation or immune tolerance of the immune system is based on the long-observed phenomenon that animals which have been fed or have inhaled an antigen or epitope are less capable of developing a systemic immune response towards said antigen or epitope when said antigen or epitope is introduced via a systemic route.

With regard to the use of an antigen for immune therapy, the human cartilage (HC) gp-39 protein has very recently been reported to be effective in induction of systemic immune tolerance (Toosten *et al.* Arthritis Rheum. 43:645-655, 2000) for the treatment of arthritis. Upon intranasal administration HC gp-39 interfered with development of collagen type II-induced arthritis in mice. Both disease activity and joint destruction ameliorated as a result of the treatment.

In a search for proteins that are relevant for autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, we have identified a novel gene SCIM-1 (Synovium/Cartilage Inflammation-linked Messenger 1). The protein that is encoded by the SCIM-1 mRNA has not been reported earlier. Upon identification of the SCIM-1 mRNA it was established that only fragments of the mRNA were present in public domain databases as expressed sequence tags (ESTs). From the public ESTs it was not possible to reconstruct the identified SCIM-1 cDNA.

35

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 3 -

The best homology with the SCIM-1 protein was found with the EGF-like domains of fibulin-1, an extracellular protein containing 9 EGF-like domains. Fibulin-1 can bridge the extracellular matrix of the vessel wall with integrin- α IIb β 3 on platelets, via an interaction with fibrinogen (Godyna *et al.* Blood 88:2569-2577, 1996). Via its EGF-like domains fibulin-1 binds to nidogen, fibronectin, laminin, fibrinogen, NOVH, aggrecan, and versican (Tran *et al.* J. Biol. Chem. 272:22600-22606, 1997; Perbal *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:869-874, 1999; Barth *et al.* Matrix Biol. 17:635-646, 1998). High expression of fibulin-1 seems to interfere with tumor formation and invasion (Qing *et al.* Oncogene 15:2159-2168, 1997). It is conceivable that SCIM-1 has similar capabilities, involving its RGD-motif on EGF-like domain.

Based on the report of Sarkissian and Lafyatis (J. Immunol. 162:1772-1779, 1999), the putative interaction of SCIM-1 with integrins could be relevant for RA, since proliferation of fibroblast-like synoviocytes (FLS), e.g. from RA patients, required a signal provided by integrin-binding extracellular matrix proteins in addition to a mitogenic cytokine, e.g. PDGF. Wang *et al.* (Arthritis Rheum. 40:1298-1307, 1997) suggested that α v, α 4, and α 5 integrins are required for IL-1 β -stimulated invasion of articular cartilage by RA-FLS.

The SCIM-1 gene appeared to be expressed relatively high in the synovial and cartilage tissues. Based on a partial cDNA sequence, a full-length cDNA was isolated from human chondrocytes. Probing multiple tissue northern blots, it was shown that the SCIM-1 gene was expressed in primary chondrocytes from healthy human donors, while some expression was also observed in brain and lung, although the SCIM-1 mRNAs in these tissues seemed to differ in length. Only low or no expression was observed in other human tissues such as heart, placenta, liver, skeletal muscle, spleen, kidney and colon or cell lines of monocytes, arterial endothelial cells, and (cultured) synovial fibroblasts.

SCIM-1 expression appears to be positively correlated to a differentiated chondrocyte phenotype, since expression was only detected in primary chondrocytes but not in human primary chondrocytes transformed with SV40. Furthermore, it was shown that expression of the SCIM-1 gene in human chondrocytes was enhanced in the presence of the RA-related cytokines TNF α and IL β . In chondrocytes, transcription of the SCIM-1 gene results in a 2.7 kb mRNA which encodes a protein of 653 amino acids. Based on the multiple tissue Northern blot data and the sequences of Incyte and public domain databases, It was found that the SCIM-1 transcript undergoes a different splicing in tissues of the joint, brain, and lungs.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 4 -

Based on these predicted protein motifs the SCIM-1 protein is expected to be an extracellular matrix protein or a protein that is localized on the cell surface of chondrocytes and synoviocytes and possibly some other cell types.

5 The main problem in (auto)immune diseases (such as e.g. RA) is that the precise targets or antigens that the immune system is adversely reacting to are largely unknown, implicating that modulating a disease entity in an antigen-specific fashion may not be possible.

It would be an important advantage, however, if an antigen-driven, non-toxic form of immunomodulation therapy could be utilised without knowledge of the antigen(s) that are involved as a target in the (auto)immune response. Such an antigen-driven therapy would involve the generation of antigen-specific modulator cells with the use of an antigen that is expected to be released or produced during the autoimmune process. Such an antigen would become available during inflammation or tissue destruction. In
10 15 case of an autoimmune disease, the locally produced autoantigen should then activate or reactivate modulator cells induced with such an antigen.

To effectively use tolerance induction therapy to treat T cell mediated cartilage destruction, there is a great need to identify T cell-reactive (poly)peptides which can desensitise patients against the autoantigen that is activating the T cells responsible for
20 the inflammatory process.

It is an object of the invention to provide a (poly)peptide which is capable of inducing systemic immune tolerance, more in particular specific T cell tolerance, preferably to the responsible cartilage antigen in patients suffering from T cell-mediated cartilage destruction. It has been found that SCIM-1 fulfils the above mentioned requirements
25 and can be used as an effective toleragen in modulating the immune system.

In the present invention under induction of systemic immune tolerance is to be understood the stimulation of antigen specific lymphocytes by antigen presenting cells (APC) in such a way that the lymphocytes acquire a state in which they produce anti-inflammatory cytokines. Anti-inflammatory cytokines may for example be IL-4, IL-10,
30 and/or TGF- β . Lymphocytes brought to tolerance by APC are able to impose their anti-inflammatory state to other sites of the body, e.g. sites of ongoing inflammation.

The immune system protects individuals against foreign antigens and responds to exposure to a foreign antigen by activating specific cells such as T- and B-lymphocytes

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 5 -

and producing soluble factors like interleukins, antibodies and complement factors. The antigen to which the immune system responds is degraded by the antigen presenting cells (APCs) and a fragment of the antigen is expressed on the cell surface associated with a major histocompatibility complex (MHC) class II glycoprotein. The MHC-glycoprotein-antigen-fragment complex is presented to a T cell, which by virtue of its T cell receptor recognises the antigen fragment conjointly with the MHC class II protein to which it is bound. The T cell becomes activated, i.e. proliferates and/or produces interleukins, resulting in the expansion of the activated lymphocytes directed to the antigen under attack (Grey *et al.*, *Sci. Am.*, 261:38-46, 1989).

Self-antigens are also continuously processed and presented as antigen fragments by the MHC glycoproteins to T cells (Jardetsky *et al.*, *Nature* 353:326-329, 1991). Self recognition thus is intrinsic to the immune system. Under normal circumstances the immune system is tolerant to self-antigens and activation of the immune response by these self-antigens is avoided. When tolerance to self-antigens is lost, the immune system becomes activated against one or more self-antigens, resulting in the activation of autoreactive T cells and sometimes also the production of autoantibodies. This phenomenon is referred to as autoimmunity. As the immune response in general is destructive, i.e. meant to destroy the invasive foreign antigen, autoimmune responses can cause destruction of the body's own tissue.

It will thus be clear that fragments of the SCIM-1 protein will be expressed by the APC and that therefore also fragments of the SCIM-1 protein are capable of evoking an immune response. Also proteins of other species having a similar function or at least being structurally closely related to the human SCIM-1 protein might perform the same toleragenic effect. Thus, also homologous polypeptides or parts thereof are included in the invention.

The proteins according to the present invention include the polypeptide comprising SEQ ID NO:2 but also polypeptides with a similarity of 70%, preferably 90%, more preferably 95%, 98%, most preferably 99%. Also portions of such polypeptides still capable of conferring the toleragenic effects are included. Such portions may be functional per se, e.g. in solubilized form or they might be linked to other polypeptides, either by known biotechnological ways or by chemical synthesis, to obtain chimeric proteins.

As used herein the term similarity is as defined in NCBI-BLAST 2.0.10 [Aug-26-1999] (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997).

The fragments of the SCIM-1 protein or homologous polypeptides are to be understood subsequences of the protein. These subsequences can modulate lymphocyte

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 6 -

functioning. Preferably they have the following functional immunomodulating characteristics: i) peptides can be bound by the disease-associated MHC molecules, preferably HLA-DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0408, DRB1*0405, DQB*0301, or DQB*0302, and ii) peptides must be able to provoke a T cell response in humans, preferably autoimmune patients, more preferably RA patients. Such a response can for example be measured in an *in vitro* T cell proliferation assay or in an assay for the detection of T cell cytokine production (e.g. ELISA or ELISPOT) (Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 1998). Preferably the peptides must also be recognized by T cells in animals transgenic for the relevant human MHC class II molecules, as mentioned above, and human CD4 upon immunization with a SCIM-t (poly)peptide.

The length of these sub-sequences is not important provided that it comprises the epitope to be recognized by the relevant MHC molecule. Preferably these peptides have an amino acid sequence of 9-55 amino acid residues. More preferably the peptides have an amino acid sequence of 9-35, in particular 9-25 amino acid residues. Much more preferred are peptides having an amino acid sequence of 9-15 amino acid residues. Highly preferred are peptides having an amino acid sequence of 13 or 14 amino acid residues.

Variations that can occur in a sequence, especially of smaller peptides, may be demonstrated by (an) amino acid difference(s) in the overall sequence or by deletions, substitutions, insertions, inversions or additions of (an) amino acid(s) in said sequence. Amino acid substitutions that are expected not to essentially alter biological and immunological activities have been described. Amino acid replacements between related amino acids or replacements which have occurred frequently in evolution are, inter alia Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asu, Ile/Val (see Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3). Based on this information Lipman and Pearson developed a method for rapid and sensitive protein comparison (Science, 227:1435-1441, 1985) and determining the functional similarity between homologous polypeptides.

Also within the scope of the invention are multimers of the peptides such as for example a dimer or trimer of the peptides according to the invention. A multimer according to the invention can either be a homomer, consisting of a multitude of the same peptide, or a heteromer consisting of different peptides.

It will be clear to those skilled in the art that the (poly)peptides may be extended at either side of the peptide or at both sides and still exert the same immunological function. The extended part may be an amino acid sequence similar to the natural

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 7 -

sequence of the protein. However, the (poly)peptide might also be extended by non-natural sequences. It will be clear that the (poly)peptide need not to exert its original function and as such might be inactive while still performing its immunological function according to the invention. The (poly)peptide according to the invention might
 5 be connected to MHC molecules, such that the binding groove is occupied by the peptide. A flexible linker molecule, preferably also consisting of amino acid sequences might connect the peptide. The MHC molecules need not to possess their constant domains and might consist of their variable domains only, either directly connected to each other or connected through a flexible linker. The advantage of such a complex is
 10 that it might exist in a soluble form and can directly be recognised by T cells.

Thus, according to the invention the (poly)peptides, said (poly)peptides resembling the MHC Class II restricted T-cell epitopes present on the antigen comprising the polypeptide of SEQ ID NO:2 or fragments thereof comprising these epitopes are very
 15 suitable for use in a therapy to induce systemic immune tolerance to said antigen in mammals, more specifically humans, suffering from lymphocyte or T-cell mediated cartilage destruction, such as for example arthritis, more specifically rheumatoid arthritis. Optionally such a treatment can be combined with the administration of other medicaments such as DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs e.g.
 20 sulfasalazine, anti-malarials (chloroquine, hydroxychloroquine) injectable or oral gold, methotrexate, D-penicillamine, azathioprine, cyclosporine, mycophenolate), NSAIDs (non steroidal anti inflammatory drugs), corticosteroids or other drugs known to influence the course of the disease in autoimmune patients.

25 The polypeptides according to the invention can also be used to modulate lymphocytes that are reactive to antigens other than said antigen but are present in the same tissue as the antigen i.e. proteins or parts thereof comprising the polypeptide according to SEQ ID NO:2. By the induction of antigen-specific T-cell tolerance, autoimmune disorders can be treated by systemic immune tolerance. More in general, the cells to be
 30 modulated are hematopoietic cells. In general, in order to function as a toleragen the peptide must fulfil at least two conditions i.e. it must possess an immune modulating capacity and it must be expressed locally usually as part of a larger protein.

Thus, the present invention provides a method to treat patients suffering from inflammatory autoimmune diseases, by administration of a pharmaceutical preparation
 35 comprising the (poly)peptide according to the invention. The (poly)peptide comprises T-cell epitopes, which are recognised by and are able to stimulate autoreactive T-cells.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 8 -

These T cells may be found e.g. in the blood of patients suffering from inflammatory disorders. Such patients may suffer from diseases like Graves' diseases, juvenile arthritis, primary glomerulonephritis, polyarthritis, osteoarthritis, Sjögren's syndrome, myasthenia gravis, rheumatoid arthritis, Addison's disease, primary biliary sclerosis, uveitis, systemic lupus erythematosus, inflammatory bowel disease, multiple sclerosis or diabetes. The polypeptides according to the present invention therefore can be used in the preparation of a pharmaceutical to prevent inflammatory diseases. Administration of SCIM-1 will induce systemic immune tolerance. More specifically the polypeptides can be used in the preparation of a pharmaceutical to induce specific immune tolerance in patients suffering from inflammatory diseases, preferably immune-cell mediated cartilage destruction. The immune cell, preferably is a T cell. The most preferred disease is arthritis, more preferably rheumatoid arthritis.

Treatment of autoimmune disorders with the peptides according to the invention makes use of the fact that systemic immune tolerance is induced to unrelated but co-localised antigens. The regulatory cells secrete in an antigen specific fashion pleiotropic proteins such as cytokines which may downmodulate the immune response.

The polypeptides according to the invention can be prepared by recombinant DNA techniques.

The present invention provides for such a DNA sequence encoding a protein or polypeptide according to the invention.

The invention also includes the entire mRNA sequence part of which is indicated in SEQ ID NO: 1. A complete coding DNA sequence is shown in SEQ ID NO:1 nucleotides 59-2017. Furthermore, to accommodate codon variability, the invention also includes sequences coding for the same amino acid sequences as the sequences disclosed herein. Also portions of the coding sequences coding for individual polypeptides having the same immunological function are part of the invention as well as allelic and species variations thereof. Sometimes, a gene is expressed in a certain tissue as a splicing variant, resulting in an altered 5' or 3' mRNA or the inclusion of an additional exon sequence. These sequences as well as the proteins encoded by these sequences all are expected to perform the same or similar functions and form also part of the invention.

In particular, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:18 represent specific splice variants which differ from SEQ ID NO:1 in the sequence downstream of nucleotide 1852 of SEQ ID NO:1. Translation of this splice variants leads to a

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 9 -

truncated version of the protein in SEQ ID NO:2, as shown in SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:21, respectively. The coding sequences of these latter nucleic acids run from positions 59-1969, 59-1912 and 59-1894, respectively and have the first 598 amino acids of SEQ ID NO:2 in common. The complete proteins preferably are mature proteins. The signal sequence most likely is 19 amino acids but the length may differ slightly.

The sequence information as provided herein should not be so narrowly construed as to require inclusion of erroneously identified bases. The specific sequence disclosed herein can be readily used to isolate the complete genes which in turn can easily be subjected to further sequence analyses thereby identifying sequencing errors.

Thus, the present invention provides also for isolated polynucleotides encoding SCIM-1, truncated versions or fragments thereof.

The DNA according to the invention may be obtained from cDNA. The tissues preferably are from human origin. Preferably ribonucleic acids are isolated from fetal brain, fetal liver, fetal spleen, placenta or other tissues. Alternatively, the coding sequence might be genomic DNA, or prepared using DNA synthesis techniques. The polynucleotide may also be in the form of RNA. If the polynucleotide is DNA, it may be in single stranded or double stranded form. The single strand might be the coding strand or the non-coding (anti-sense) strand.

The present invention further relates to polynucleotides having slight variations or have polymorphic sites. Polynucleotides having slight variations encode polypeptides which retain the same biological function or activity as the natural, mature protein. Polymorphic sites are useful for diagnostic purposes. Such polynucleotides can be identified by hybridization under preferably highly stringent conditions. According to the present invention the term "stringent" means washing conditions of 1 x SSC, 0.1% SDS at a temperature of 65 °C; highly stringent conditions refer to a reduction in SSC towards 0.3 x SSC, more preferably to 0.1 x SSC. Preferably the first two washings are subsequently carried out twice each during 15-30 minutes. If there is a need to wash under highly stringent conditions an additional wash with 0.1 x SSC is performed once during 15 minutes. Hybridization can be performed e.g. overnight in 0.5M phosphate buffer pH7.5/7% SDS at 65 °C.

Alternatively, also fragments of the above mentioned polynucleotides which code for polypeptides having the same immunological function are embodied in the invention.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 10 -

Also the encoded proteins or polypeptides derived from the proteins form part of the invention.

A nucleic acid sequence coding for the protein, a peptide according to the invention, a multimer of said peptides or a chimeric peptide is inserted into an expression vector. Suitable expression vectors comprise the necessary control regions for replication and expression. The expression vector can be brought to expression in a host cell. Suitable host cells are, for instance, bacteria, yeast cells and mammalian cells. Such techniques are well known in the art, see for instance Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

The (smaller) (poly)peptides according to the invention can also be prepared by well known organic chemical methods for peptide synthesis such as, for example, solid-phase peptide synthesis described for instance in J. Amer. Chem. Soc. 85:2149 (1963) and Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214 (1990).

The (poly) peptides may be stabilised by C- and/or N- terminal modifications, which will decrease exopeptidase catalysed hydrolysis. The modifications may include: C-terminal acylation, (e.g. acylation = Ac-peptide), N-terminal amide introduction, (e.g. peptide-NH₂) combinations of acylation and amide introduction (e.g. Ac-peptide-NH₂) and introduction of D-amino acids instead of L-amino acids (Powell *et al.*, J. Pharm. Sci., 81:731-735, 1992).

Other modifications are focussed on the prevention of hydrolysis by endopeptidases. Examples of these modifications are: introduction of D-amino acids instead of L-amino acids, modified amino acids, cyclisation within the peptide, introduction of modified peptide bonds, e.g. reduced peptide bonds $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ and e.g. peptoids (N-alkylated glycine derivatives) (Adang *et al.*, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 113:63-78, 1994 and Simon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9367-9371, 1992).

The tolcerogenic peptides according to the invention can be identified by using a method comprising the steps of

- a) introducing into a suitable host cell a DNA fragment encoding SCIM-1 peptide fragments;
- b) culturing the host cells under conditions to allow expression of the introduced DNA sequence;

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 11 -

- c) bringing the expression product in contact with lymphocytes; and
d) establishing the lymphocyte activity.

Preferably, the expression product is contacted with lymphocytes *in vivo* e.g. by administration of the product to animals. The lymphocyte activity can e.g. be measured by determination of the anti-inflammatory cytokines.

Alternatively, the expression product of the host cells under step b might be isolated, brought subsequently into contact with antigen presenting cells and T cells and the T cell activity might be established.

It will be clear that in the above described screening methods the peptides to be tested might also be synthesized chemically.

The peptides thus identified can be used for the formulation of a pharmaceutical composition comprising mixing the peptide with a pharmaceutically acceptable carrier.

According to the invention, patients suffering from T-cell mediated destruction of the articular cartilage can be treated with a therapeutical composition comprising one or more peptides according to the invention and a pharmaceutical acceptable carrier. Administration of the pharmaceutical composition according to the invention will induce systemic immune tolerance, in particular tolerance of the specific autoreactive T cells of these patients, to the autoantigenic proteins in the articular cartilage under attack and other self antigens which display the identified MHC Class II binding T cell epitopes characterised or mimicked by the amino acid sequences of one or more of the peptides according to the invention. The induced tolerance thus will lead to a reduction of the local inflammatory response in the articular cartilage under attack.

The (poly)peptides according to the invention have the advantage that they have a specific effect on the autoreactive T cells thus leaving the other components of the immune system intact as compared to the non-specific suppressive effect of immunosuppressive drugs.

Systemic immune tolerance can be attained by administering high or low doses of peptides according to the invention. The amount of peptide will depend on the route of administration, the time of administration, the age of the patient as well as general health conditions and diet.

In general, a dosage of 0.01 to 10000 µg of peptide per kg body weight, preferably 0.05 to 500 µg, more preferably 0.1 to 100 µg of peptide can be used.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 12 -

Pharmaceutical acceptable carriers are well known to those skilled in the art and include, for example, sterile saline, lactose, sucrose, calcium phosphate, gelatin, dextrin, agar, pectin, peanut oil, olive oil, sesame oil and water. Other carriers may be, for example MHC class II molecules, if desired embedded in liposomes.

- 5 In addition the pharmaceutical composition according to the invention may comprise one or more adjuvants. Suitable adjuvants include, amongst others, aluminium hydroxide, aluminium phosphate, amphigen, tocopherols, monophosphoryl lipid A, muramyl dipeptide and saponins such as Quil A. Preferably, the adjuvants to be used in the tolerance therapy according to the invention are mucosal adjuvants such as the
10 cholera toxin B-subunit or carbomers, which bind to the mucosal epithelium. The amount of adjuvant depends on the nature of the adjuvant itself.

Furthermore the pharmaceutical composition according to the invention may comprise one or more stabilisers such as, for example, carbohydrates including sorbitol, mannitol, starch, sucrosedextrin and glucose, proteins such as albumin or casein, and
15 buffers like alkaline phosphates.

Suitable administration routes are e.g. intramuscular injections, subcutaneous injections, intravenous injections or intraperitoneal injections, oral administration and nasal administration such as sprays.

- 20 For testing the ability of the (poly)peptides to modulate (auto)immune responses several murine models have been shown to be suitable, such as collagen induced arthritis in mice (CIA), adjuvant arthritis in rats, experimental allergic encephalomyelitis in mice and non-obese diabetes in mice (NOD) or in transgenic mice. Antigen may be administered intravenously, intraperitoneally, orally or nasally in
25 such models (review by Liblau *et al.*, Immunol. Today 18:599-603, 1997). To facilitate the read-out in these models, it is of importance to increase the confidence interval. According to the present invention it has been found that incidence and clinical score in arthritis models can be improved by combining the original trigger of arthritis, e.g. collagen type II in CIA with a peptide derived from the extracellular matrix protein
30 aggrecan. This peptide might preferably be administered simultaneously with the original trigger although a separate administration might also be possible.

- SCIM-1 or the peptides according to the invention are also very suitable for use in a
35 diagnostic method to detect the presence of activated autoreactive T cells involved in the chronic inflammation of the articular cartilage.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 13 -

The diagnostic method according to the invention comprises the following steps:

- a) isolation of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a blood sample of an individual,
- b) culture said PBMC under suitable conditions,
- 5 c) incubation of said PBMC culture in the presence of the autoantigen or one or more peptides derived thereof according to the invention, and
- d) detection of a response of T cells, for example a proliferative response, indicating the presence of activated autoreactive T cells in the individual.

In case of detection of a response by measuring the proliferative response of the autoreactive T cells, the incorporation of a radioisotope such as for example ^3H -thymidine is a measure for the proliferation. A response of the autoreactive T cells present in the PBMC can also be detected by measuring the cytokine release with cytokine-specific ELISA, or the cytotoxicity with ^{51}Cr release. Another
10 detection method is the measurement of expression of activation markers by FACS analysis, for example of IL-2R. A diagnostic composition comprising one or more of the peptides according to the invention and a suitable detecting agent thus forms part of the invention. Depending on the type of detection, the detection agent can be a radioisotope, an enzyme, or antibodies specific for cell surface or activation markers.

Also within the scope of the invention are test kits which comprise one or more
20 peptides according to the invention. These test kits are suitable for use in a diagnostic method according to the invention.

Thus, the present invention provides for a method to detect whether autoaggressive T cells reactive towards SCIM-1 are present in patients suffering from T-cell mediated cartilage destruction such as for example arthritis, in particular rheumatoid arthritis. If
25 SCIM-1-specific T cells are present, tolerization of these T cells with a pharmaceutical composition comprising SCIM-1 or peptides according to the present invention or combinations thereof can delay or suppress arthritis development.

The following examples are illustrative for the invention and should in no way be
30 interpreted as limiting the scope of the invention.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 14 -

Legends to the figures**Figure 1**

RT-PCR on human cartilage cDNA, using oligonucleotides specific for SCIM-1 and GAPDH. Detection of SCIM-1 gene expression is shown for healthy cartilage (knee, male; traffic accident; **lane 1**), and cartilage from 4 RA patients (knee/hip, 3 female and 1 male; **lanes 2-5**). Detection of GAPDH gene expression for the same 4 RA samples is shown in **lanes 7-10**. As a DNA fragment length marker the 100 bp-ladder (Gibco-BRL) was run in parallel in **lane 6** (the major band in the middle of the lane corresponds to 600 bp).

Figure 2

SCIM-1 probe (nt560-1048 of SEQ ID NO:1) hybridized on custom-made joint Northern blot (**upper panel**). Represented human cells/tissues: U937 monocytes + PMA-ionomycin (**lane 1**), HAEC endothelial cells $-/+$ TNF α (**lanes 2-3**, respectively), SCRO14.SF primary synovial fibroblasts + TNF α (**lane 4**), PCG SV40.04 transformed chondrocytes $-/+$ TNF α (**lanes 5-6**, respectively), and primary chondrocytes $-/+$ TNF α (**lanes 7-8**, respectively). Per lane 1-2 μ g of poly(A $^{+}$) RNA was loaded. As a control the blot was probed with a 32 P-labelled cDNA derived from the human β -actin gene (**lower panel**).

Figure 3

Alternative carboxy terminal ends as encoded by 4 different SCIM-1 mRNA species, i.e. variants A-D. The encoded C-termini are indicated and amino acids are shown in one-letter code. Sequences are different as from amino acid 599. Encoded amino acid sequences of variants A-D are represented by SEQ ID NO:20-23, respectively, and the corresponding nucleic acids are represented by SEQ ID NO:16-19, respectively.

25

Figure 4

Detection of SCIM-1 variant A/His6 expression in transfected CHO cells. Samples of culture supernatant of CHO cells transfected with pNGV1 (**lane 1**) or pNGV1.SCIM1.variantA(His6) (**lanes 2 and 3**) were separated on an SDS-polyacrylamide gel and subsequently Western blotted. Proteins containing a (His6)-tail were detected using an anti(His6)-tag monoclonal antibody (Dianova GMBH). A protein molecular weight marker was run in **lane 4** (M).

30

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 15 -

Examples

Example 1: Identification of the SCIM-1 gene

The cDNA libraries that were available from the LifeSeq database (Incyte Pharmaceuticals) were clustered based on their gene content in order to define custom tissue categories that represent RA relevant tissues such as joint tissues. Distances between cDNA libraries were calculated using the squared Euclidian distance measurement, and the results were clustered into a tree using an unweighted average linkage method (Fry 1993, Biological Data Analysis, Oxford University Press, New York). Two of the resulting clusters contained cDNAs of 5 libraries each derived from non-tumor synovial or cartilage tissues. For each of the synovial cDNA libraries data of 4038 to 5627 sequence reactions were available, and 1554 to 7231 for each of cartilage cDNA libraries. These sequence data were probed for genes of which expression seemed to be relatively restricted to these clusters. Two partial cDNA fragments, each composed of overlapping Incyte-cst sequences and parts of SEQ ID NO:1, were identified as positive hits. Since their expression patterns appeared to be similar, it was assumed that they were derived from the same gene.

EXAMPLE 2: SCIM-1 gene expression in RA cartilage.

Expression of the SCIM-1 gene in diseased tissue was detected via RT-PCR with SCIM-1-specific oligonucleotides (SEQ ID NO:3, 5'TTGCCAATTACGCCTACGGT and SEQ ID NO:4, 5'CCTGGTCATTGTCAAAGTCGG) on cDNA that was derived from cartilage samples of 4 RA patients and 1 healthy donor. The arthritic cartilage was obtained during joint replacement surgery of the knee. Chondrocytes were isolated enzymatically from the cartilage (Cornelissen et al., 1993, J. Tiss. Cult. Meth. 15:139-146) upon which RNA was isolated using Trizol (Gibco-BRL) or RNazol B (Campro Scientific). With 1 µg of total RNA the synthesis of cDNA was performed using SuperscriptTMII (Gibco-BRL) in a total volume of 20 µl. For RT-PCR on SCIM-1 and on housekeeping gene GAPDH, as positive control, 0.5 µl cDNA per reaction was used. PCR was performed in a Perkin Elmer 9600: 1 cycle 5 min 94°C, 35 cycles 30 sec 94°C / 30 sec 55°C / 1 min 72°C, 1 cycle 5 min 72°C with 50 ng/primer, 200 µM dNTPs, and 2.5 u Taq polymerase (Pharmacia, #27-0799) in 25 µl total volume. Oligonucleotides specific for GAPDH were SEQ ID NO:5 (5'CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG) and SEQ ID NO:6 (5'GGTCCACCACCTGTTGCTGTAGCC). PCR samples were analysed on agarose

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 16 -

gel (Figure 1). Lanes 1-5 show clear signals of SCIM-1 cDNA amplification product of the expected length for the healthy cartilage (macroscopically) and 4/4 of the arthritis patients, while GAPDH-specific amplification signals are in the same order of magnitude among the RA cDNA preparations (lanes 7-10). The RT-PCR data indicate that the SCIM-1 gene is expressed in diseased tissue, i.e. afflicted knee cartilage, of 4/4 RA patients tested. It is likely that the SCIM-1 gene indeed is expressed in diseased articular cartilage of at least a considerable percentage of RA patients. Consequently, it is to be expected that the SCIM-1 protein is synthesised in diseased cartilage of RA patients.

10 EXAMPLE 3: SCIM-1 gene expression in joint-related cells

To determine tissue distribution of SCIM-1 gene expression multiple tissue Northern blots were probed with SCIM-1 cDNA fragments. Probes were generated via random primed labeling of SCIM-1 cDNA fragments nt(560-1048) and (1983-2427) (numbering according to SEQ ID NO:1) using Ready-To-Go beads (Pharmacia) and ³²P- α -dCTP (Amersham). Labeled probe was separated from free nucleotides on a 1 ml Sephadex G50-medium column and about 3×10^6 cpm/ml of labeled probe was added to the hybridization mix (0.5 M phosphate buffer pH 7.0, 7% SDS, 1 mM EDTA) and hybridized to the Northern blot for 16 h at -65°C . Blots were washed up to $0.5 \times \text{SSC}$ at 65°C and exposed to a STORMTM840 Phosphor screen. Probe nt 560-1048 relative to SEQ ID NO:1 hybridized weakly to a ~ 2.4 kb mRNA in brain and a ~ 3.0 kb mRNA in lung (Clontech human multiple tissue Northern blots H2 and H1, cat # 7759-1 and 7760-1, respectively). Except for a clear signal at ~ 2.6 kb in primary chondrocytes (Figure 2, upper panel lanes 7-8) no signals were detected in other joint-related, cultured cells. Upon correction for the β -actin hybridization signal, as housekeeping gene control (Figure 2, lower panel), the signal for SCIM-1 mRNA appeared to be enhanced with a factor 3-4 by TNF α (24 h, 10 ng/ml). With another SCIM-1 probe, i.e. nt(1983-2427), no signals were detected on Clontech's multiple tissue Northern blots H3 (cat # 7767-1) and H2. Hybridization with probe nt(1983-2427) on RNA of primary chondrocytes yielded a signal for the same 2.6 kb mRNA as with probe nt(560-1048) (not shown), including the 3-4 fold upregulation of SCIM-1 gene expression by TNF α . Hybridization of a cDNA microarray with probes derived of chondrocytes incubated with or without IL-1, showed a 3-fold IL-1-dependent upregulation of SCIM-1 expression. Also for probe nt(1983-2427) no signals were observed on Northern blot for SV40-transformed human chondrocytes, which are likely to represent dedifferentiated cells. It was concluded that i) SCIM-1 gene expression displays a restricted tissue distribution, ii) the different lengths of detected mRNAs in brain, lung

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 17 -

and chondrocytes could represent splice variants, and iii) SCIM-1 gene expression is enhanced by pro-inflammatory factors such as TNF and IL-1.

EXAMPLE 4: Isolation of the full length SCIM-1 cDNA

5 The complete coding sequence of human SCIM-1 was identified via SMART-RACE (#K1811-1, Clontech), using SCIM-1-specific oligonucleotides on RACE-cDNA that was generated from 1 µg total RNA of TNF α -stimulated primary human chondrocytes. The chondrocytes were enzymatically (collagenase) isolated from healthy cartilage (knee), grown for about 3 weeks in monolayer culture (Hamm's/F12, 10% FCS) and

10 subsequently stimulated with 10 ng/ml TNF α for 24 h. Oligonucleotides were designed based on sequences that were available for the two gene fragments identified from the Incyte database (Example 1). For the first gene fragment primers were: 5'RACE primer SEQ ID NO:7 (5'GGGTCCATTGTACCCCGCCACGACG), and nested primer SEQ ID NO:8 (5'CTCAAAGTCCCCATCATGGTCC), 3'RACE primer SEQ ID NO:9 (5'CTCAGCCGCTGTCCGTCTTCCGG), and nested primer SEQ ID NO:10 (5'GCTTCAACAACAAGTGGCTGCG). For the second gene fragment primers were: 5'RACE primer SEQ ID NO:11 (5'GGATGGGCTTGGGAGGGTCTAGCTC), and nested primer SEQ ID NO:12 (5'GCAGCAGCACAAGCCCACTTTC), 3'RACE primer SEQ ID NO:13 (5'GTGCCCAGGAGGTGGTGTCACTG), and nested primer

20 SEQ ID NO:14 (5'GCACAGGAAGTATGAGGACTTTAGTG). SMART-RACE PCRs were performed according to the Clontech manual PT3269-1 (March 1999). Sequencing of a number of RACE cDNA clones yielded the contig cDNA of SEQ ID NO:1, which indicated that the two gene fragments as identified in Example 1, corresponded to the same gene, designated SCIM-1. A translation start codon was

25 found at nt 59 and an open reading frame was found to encode 653 aa. With regard to the observed mRNA length of 2.6 kb in chondrocytes, the identified SCIM-1 cDNA of 2589 bp was considered very likely to contain the complete coding region of the corresponding gene.

Once the complete SCIM-1 cDNA had become available, a comparison was made with

30 nucleic acid and protein sequences in Incyte and public domain databases, via blastsearches (NCBI-BLAST 2.0.10 Aug-26-1999; Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 18 -

25:3389-3402, 1997). Several public est sequences and a ~1100 bp cDNA from patent application WO99/58660 were found to be identical to parts of the SCIM-1 cDNA. As a result of incomplete overlap, the complete SCIM-1 gene could not be reconstructed from these public cDNA fragments. Based on our complete encoded SCIM-1 amino acid sequence (SEQ ID NO:2) a prediction was made as to functional protein domains of SCIM-1. A signal sequence was identified at aa 1-19 or 1-21, an integrin-binding RGD motif at aa 263-265, a calcium-binding EGF-like domain at aa 551-598, a putative hydrophobic region at aa 614-635, and MHC class II DR4Dw4 binding motifs at aa 12-20, 39-47, 149-157, and 323-331.

10

EXAMPLE 5: SCIM-1 splice variants and their tissue distribution

From multiple alignments (DNAMAN version 4.11) involving the full length SCIM-1 cDNA and all Incyte and public cDNAs that contained sequences identical to the SCIM-1 cDNA, it was discovered that the population of cDNAs was heterogeneous downstream of nucleotide 1852 (numbering according to SEQ ID NO:1). This downstream region encodes for the C-terminal end of the protein, directly following the EGF-like domain. Four different C-terminal regions were identified for SCIM-1, i.e. variants A-D (Table 1; SEQ ID NO:19-21, respectively, the C-terminal differences starting at amino acid position 599), deduced from cDNAs that were derived from different tissues (SEQ ID NO:16-18, respectively; the 3' end differs as from nucleotide position 1853) and are expected to be the result of alternative splicing events. For the variants A, B, and C it is most likely that SEQ ID NO:16-18 comprises the 3' ends of the corresponding mRNAs, respectively, since each contains a 3' poly(A) tail preceded by a putative poly-adenylation signal AATAAA. The different lengths of the 3'UTR regions for variants A and B are in agreement with the lengths of the SCIM-1 mRNAs that were detected on Northern blots for cartilage and brain tissues, respectively (see example 3). The number of cDNA clones that were found in the various databases to encode each of the variants A-D, strongly suggests that SCIM-1 variant A is predominantly expressed in joint tissues (cartilage/synovium) and to some extent in tumours and some other tissues, whereas expression of variant B seems to be restricted to tissues of the central nervous system (mostly brain). The suggested tissue-restricted

20

25

30

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 19 -

expression was corroborated by an RT-PCR with oligonucleotides specific for the SCIM-1 variant B (SEQ ID NO:9 and 15) on cDNA of total brain (Clontech human brain Quick-clone cDNA, cat. 7187-1/lot 9070843) and on cDNA of primary chondrocytes (cultured for 24 h with TNF- α , see example 4). Synthesis of cDNA and

5 PCR conditions are as described in example 2. As a control PCR was performed with oligonucleotides specific for housekeeping gene GAPDH (SEQ ID NO:5 and 6). A strong amplification signal of the expected length for the SCIM-1 variant B mRNA in brain tissue was seen whereas expression in chondrocytes hardly could be detected. The control PCR on GAPDH gene expression yielded a similar signal for both tissues,

10 indicating that the input amounts of the corresponding cDNAs in the PCR were comparable. The finding that expression of variant B, represented by a ~2.4 kb mRNA, was hardly detectable in the primary chondrocytes (24 h/TNF- α) is in agreement with the data of examples 3 and 4. On Northern blot only a single SCIM-1 mRNA variant of ~2.6 kb was detected in primary chondrocytes (24 h/TNF- α) (Figure 2, lane 8) which

15 was concluded to represent variant A as 3' RACE amplification on chondrocyte cDNA yielded only variant A sequences (see SEQ ID NO:1).

EXAMPLE 6: Expression of recombinant SCIM-1

The SCIM-1 (variant A) cDNA was cloned into cloning vector pCR2.1TOPO

20 (Invitrogen) and subcloned as a Eco RI fragment to eukaryotic expression vector pNGV1 (EMBL accession number X99274). Consequently, the cDNA is situated behind the SV40 early promoter and a Kozak translation initiation sequence. Upstream of the translational stopcodon 18 nucleotides were inserted encoding a His6-tag. In order to produce recombinant SCIM-1(His6) protein in eukaryotic cells, CHO cells

25 (ATCC CCL61) were cultured in DMEM/Hamm's F12 containing 5% FCS (Harlan sera lab). The pNGV1-SCIM-1(His6) construct was transfected to CHO-K1 cells using Transfectam (Promega) and selection medium DMEM/Hamm's F12 containing 5% FCS and 0.8 mg/ml neomycin (G418 sulphate Gibco BRL Life technology, filter sterilised using a 0.22 μ M Millipore SLGV025BS filter). To detect recombinant

30 protein, cells were cultured o/n in serum-free medium (containing 0.8 mg/ml neomycin) and expression was allowed to continue for one day. Serum-free culture supernatant was analysed on SDS-PAGE followed by Western blotting and subsequent detection with anti-His6 monoclonal antibody. The blot was blocked with 5% skimmed

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 20 -

milk in PBS/0.05% Tween-20 and developed with a mouse-anti(His6)-tag antibody (Dianova GMBH cat. no. Dia 900. After three times washing with PBST for five minutes at RT, the blot was incubated with anti-mouse-IgG-HRP (Promega catno 3624S12). After three times washing with PBST for five minutes at RT, detection was
5 performed using a chromogenic substrate for HRP, i.e. diaminobezidine tetrahydrochloride in PBS, 2.5 mM CoCl₂ and 0.006% H₂O₂).

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 21 -

Claims

1. A polynucleotide encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence extending from amino acid number 1-598 of SEQ ID NO:2.
2. The polynucleotide according to claim 1 said polynucleotide encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 or SEQ ID NO:21.
3. The polynucleotide according to claim 1 or 2 said polynucleotide comprising the sequence extending from nucleotides 59-1852 of SEQ ID NO:1.
4. The polynucleotide according to claims 1-3, said polynucleotide comprising the sequences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:18 or the sequence extending from nucleotides 59-2017 from SEQ ID NO:1, nucleotides 59-1969 from SEQ ID NO:16, nucleotides 59-1912 from SEQ ID NO:17 or nucleotides 59-1894 from SEQ ID NO:18.
5. A recombinant expression vector comprising the DNA according to claims 1-4.
6. A polypeptide encoded by the polynucleotide according to claims 1-4, the expression vector according to claim 5 or immunomodulating fragments of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 or SEQ ID NO:21.
7. Pharmaceutical composition comprising the polypeptide according to claim 6, and a pharmaceutical acceptable carrier.
8. The polypeptide according to claim 6 for use in therapy.
9. Use of the peptide according to claim 6 for the manufacture of a pharmaceutical preparation against inflammatory diseases.
10. Use of the polypeptide according to claims 6 for the manufacture of a pharmaceutical preparation for the induction of immunological tolerance to an autoantigen in patients suffering from autoimmune disorders, more specifically rheumatoid arthritis.
11. A cell transfected with DNA according to claims 1-4 or the expression vector according to claim 5.
12. A cell according to claim 11 which is a stable transfected cell which expresses the polypeptide according to claims 6.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 22 -

13. Use of a DNA according to claims 1-4 or an expression vector according to claim 5, a cell according to claims 11 or 12 or a polypeptide according to claim 6 in a screening assay for identification of tolerogenic (poly)peptides.
14. A method for identifying tolerogenic peptides, said method comprising the steps of
 - a) introducing into a suitable host cell a fragment of the polynucleotide according to claims 1-4;
 - b) culturing the host cells under conditions to allow expression of the introduced sequence;
 - c) bringing the expression product in contact with lymphocytes; and
 - d) establishing the lymphocyte activity.
15. A method for identifying tolerogenic peptides, said method comprising the steps of
 - a) introducing into a suitable host cell a fragment of the polynucleotide according to claims 1-4;
 - b) culturing the host cells under conditions to allow expression of the introduced DNA sequence;
 - c) isolating the expression product;
 - d) bringing the expression product in contact with antigen presenting cells and T cells; and
 - e) establishing the T cell activity.
16. A method for identifying tolerogenic peptides, said method comprising the steps of
 - a) chemically synthesizing a fragment of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 or SEQ ID NO:21;
 - b) bringing the peptide fragment in contact with antigen presenting cells and T cells; and
 - c) establishing the T cell activity.
17. A method for the formulation of a pharmaceutical composition comprising the method of claims 14-16 and mixing the peptide identified with a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

- 23 -

18. Use of a peptide as identified in the method of claims 14-16 for the preparation of a pharmaceutical suitable as a tolerogenic agent.
19. Diagnostic composition comprising one or more of the polypeptide according to claim 6 and a detection agent.
- 5 20. A diagnostic method for the detection of activated autoreactive T cells comprising the following steps:
 - a) isolation of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a blood sample of an individual,
 - b) culture of said PBMC under suitable conditions,
 - 10 c) incubation of said PBMC culture in the presence of SCIM-1, fragments thereof and/or one or more peptides according to claim 6, and
 - d) detection of a response of T cells, indicating the presence of activated autoreactive T cells in the individual.
21. Test kit for the detection of activated autoreactive T cells, said test kit comprising
15 SCIM-1 or one or more of the peptides according to claims 6.

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

1/4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

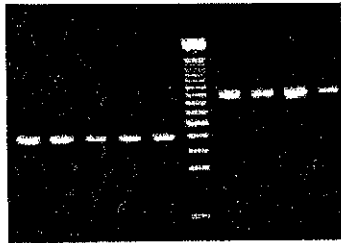


Figure 1

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

2/4

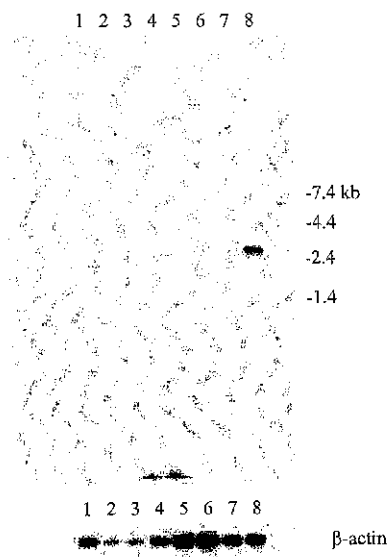


Figure 2

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

3/4

Encoded carboxy-terminal ends of SCIM-1 polypeptide	
Variant A	
↓ aa598	
...NEDGTACV GTLGQSPGPRPTTPTAAAATAAAAAA	
AGAATAAPVLVDGDLNLGSEVVKESCEPSC (aa653)	
Variant B	
...NEDGTACV AQVAFLLGGYSSAASRISEPLSRASYLSLGLGLCLQLYAL	aa637)
Variant C	
...NEDGTACV GWWSPVLKIVTPQVGKSLGP	(aa618)
Variant D	
...NEDGTACV ERTLLGLCNLLGK	(aa612)

Figure 3

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

4/4

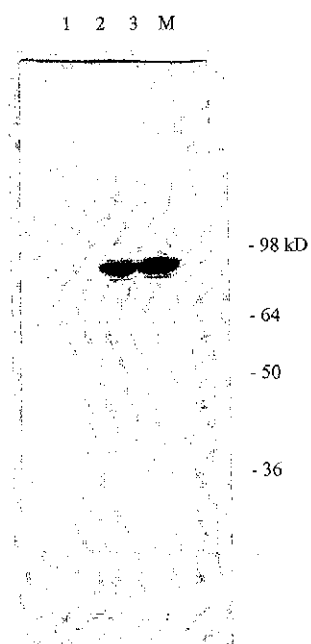


Figure 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

1

SEQUENCE LISTING

<110> Akzo Nobel N.V.

<120> Novel extracellular matrix protein

<130>

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2589

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
aagcagtggt aacaacgcag agtacgcggg ggtataaagc gagcgcgctg acccggcat 60
gtccaggatg ttaccgttcc tgctgctgct ctggttttctg cccatcactg aggggtccca 120
gcgggctgaa cccakgttca ctgcagtcac caactcagtt ctgctccctg actatgacag 180
taatcccaac cagctcaact atgggtgtggc agttactgat gtggaccatg atggggaactt 240
tgagatcgte gtggcggggg acaatggacc caactcggtt ctgaagratg accggggccca 300
gaagcggtcg gtgaacatcg cggatcgatga ggcgagctca cctactacg cgtcgcggga 360
ccggcagggg aacgccatcg gggtcacagc ctgcgacatc gacggggagc ggcggggagga 420
gatctacttc ctcaacacca ataatgcctt ctcggggggtg gccacgtaca ccgacaagtt 480
gttcaagttc cgcataacc ggtgggaaga catcctgagc gatgaggtca acgtggcccg 540
tggtgtggcc agcctctttg ccgacgcctc tgtggcctgt gtggacagaa agggctctgg 600
acgtactctc atctacattg ccaattacgc ctacggtaat gtgggcccctg atggcctcat 660
tgaatggac cctgaggcca gtgacctctc ccggggcatt ctggcgctca gagatgtggc 720
tgctgaggct ggggtcagca aatatacagg gggccgaggg gtccagcgtgg gccccatcct 780
cagcagcagt gccctggata tcttctgcga caatgagaat gggcctaact tccttttcca 840
caaccggggc gatggcaact ttgtggagcd tggggccagt gctgggtgtgg acgaccccca 900
ccagcatggg cggagtgctg cctggctgca ctccaacgt gatggcaag tggacatcgt 960
ctatggcaac tgggaatggc ccacccgct ctatctgcaa atgagcacc atgggaaggt 1020
ccgcttcggg gacatcgctt caaccaagtt ctacatgccc tccctgtctc gacgggtcat 1080
caccgcccac tttagcaatg acccaggact ggaatcttc ttcaacaaca ttgcctacgg 1140
cagctctcca gccaaacgcc tcttccgct catccgtaga gagcaggag acccctcat 1200
cgaggagctc aatcccgccg agcctctgga gctgagggc cggggcagag ggggtgtggt 1260
gacgacttc gacggagagc ggaatgtgga cctcatcttg tcccatggag agtccatggc 1320
tcagcgcctg tccgtcttcc ggggcaatca gggcttcaac aaccaactggc tgcagtggt 1380
gccacgcacc cggtttgggg cctttgccag gggagctaag gtctgtctct acaccaagaa 1440
gagtgaggcc cactgagga tcatcgacgg gggctcaggg taactgtgtg agatggagcc 1500
cgtggcacac ttggcctgg ggaaggatga agccagcagt gtggaggtga cgtggccaga 1560
tggcaagatg gtgagccgga acgtggccag cggggagatg aactcagtgc tggagatcct 1620
ctaccccggg gatgaggaca caattcagga ccagaccca ctggagtggt gccaggatt 1680
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

2

```

ctcccagcag gaaaatggcc attgcatgga caccastgaa tgcattccagt tcccattcgt 1740
gtgcccctcga gacaagcccg tatgtgtcaa cacttatgga agctacaggt gccggaccac 1800
caagaagtgc agtcggggct acgagcccaa cagggatggc acagcctgctg tggggactct 1860
cggccagtca cggggccccc gcccaaccac occcacgct gctgctgcca ctggcgtgc 1920
tgctgcccgt gctggagctg ccaactgctg accggtctct gtagatggag atctcaatct 1980
ggggtcgggtg gtttaaggaga gctgcsagcc cagctgctga gcagggtggt gacatgaacc 2040
aggcgatgga gtccagcagg ggagtgggaa agtgggcttg tgctgctgcc tagacagtac 2100
ggatgtaag gctggggagc tagaccctcc ccaagcccat ccatgcacat tacttagcta 2160
acnattagg agactcgtaa ggccaggccc tgtgctgggc acatagctgt gatcacagca 2220
gacagggctg ctgcctgat ggccgttaca ttccagtggg tctaattgac atatcttagg 2280
acacagatgt gccccaggag gtgggtgccc tgcacaggaa gtatgaggac tttagtgtcc 2340
tgagttcaca tctgtattca ggaactcaca aagctatgtg accttacacc agtcacttaa 2400
ctgttagac atccattacc gcatctgcaa aatggggatt aagaatagaa tcttgggggt 2460
agtgtggaga ttagattana tgtatgtaag acacttanca caaaacotgg cacatagtaa 2520
aggctcaata aaacacagtg cctctcactg ggctttgtca acacgtcaaa aaaaaaaaaa 2580
aaaaaaaaa

```

<210> 2

<211> 653

<212> FRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ser Arg Met Leu Pro Phe Leu Leu Leu Leu Trp Phe Leu Pro Ile
1 5 10 15

```

```

Thr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Glu Pro Met Phe Thr Ala Val Thr Asn
20 25 30

```

```

Ser Val Leu Pro Pro Asp Tyr Asp Ser Asn Pro Thr Glu Leu Asn Tyr
35 40 45

```

```

Gly Val Ala Val Thr Asp Val Asp His Asp Gly Asp Phe Glu Ile Val
50 55 60

```

```

Val Ala Gly Tyr Asn Gly Pro Asn Leu Val Leu Lys Tyr Asp Arg Ala
65 70 75 80

```

```

Gln Lys Arg Leu Val Asn Ile Ala Val Asp Glu Arg Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

```

```

Tyr Ala Leu Arg Asp Arg Gln Gly Asn Ala Ile Gly Val Thr Ala Cys
100 105 110

```

```

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Arg Glu Glu Ile Tyr Phe Leu Asn Thr Asn
115 120 125

```

```

Asn Ala Phe Ser Gly Val Ala Thr Tyr Thr Asp Lys Leu Phe Lys Phe

```


WO 02/06478

PCT/EP01/07888

3

130 135 140
 Arg Asn Asn Arg Trp Glu Asp Ile Leu Ser Asp Glu Val Asn Val Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Val Ala Ser Leu Phe Ala Gly Arg Ser Val Ala Cys Val Asp
 165 170 175
 Arg Lys Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Asn Tyr Ala Tyr
 180 185 190
 Gly Asn Val Gly Pro Asp Ala Leu Ile Glu Met Asp Pro Glu Ala Ser
 195 200 205
 Asp Leu Ser Arg Gly Ile Leu Ala Leu Arg Asp Val Ala Ala Glu Ala
 210 215 220
 Gly Val Ser Lys Tyr Thr Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Gly Pro Ile
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Ser Ala Ser Asp Ile Phe Cys Asp Asn Glu Asn Gly Pro
 245 250 255
 Asn Phe Leu Phe His Asn Arg Gly Asp Gly Thr Phe Val Asp Ala Ala
 260 265 270
 Ala Ser Ala Gly Val Asp Asp Pro His Gln His Gly Arg Gly Val Ala
 275 280 285
 Leu Ala Asp Phe Asn Arg Asp Gly Lys Val Asp Ile Val Tyr Gly Asn
 290 295 300
 Trp Asn Gly Pro His Arg Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr His Gly Lys
 305 310 315 320
 Val Arg Phe Arg Asp Ile Ala Ser Pro Lys Phe Ser Met Pro Ser Pro
 325 330 335
 Val Arg Thr Val Ile Thr Ala Asp Phe Asp Asn Asp Gln Glu Leu Glu
 340 345 350
 Ile Phe Phe Asn Asn Ile Ala Tyr Arg Ser Ser Ser Ala Asn Arg Leu
 355 360 365
 Phe Arg Val Ile Arg Arg Glu His Gly Asp Pro Leu Ile Glu Glu Leu
 370 375 380
 Asn Pro Gly Asp Ala Leu Glu Pro Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Val
 385 390 395 400

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

4

Val Thr Asp Phe Asp Gly Asp Gly Met Leu Asp Leu Ile Leu Ser His
 405 410 415
 Gly Glu Ser Met Ala Glu Pro Leu Ser Val Phe Arg Gly Asn Gln Gly
 420 425 430
 Phe Asn Asn Asn Trp Leu Arg Val Val Pro Arg Thr Arg Phe Gly Ala
 435 440 445
 Phe Ala Arg Gly Ala Lys Val Val Leu Tyr Thr Lys Lys Ser Gly Ala
 450 455 460
 His Leu Arg Ile Ile Asp Gly Gly Ser Gly Tyr Leu Cys Glu Met Glu
 465 470 475 480
 Pro Val Ala His Phe Gly Leu Gly Lys Asp Glu Ala Ser Ser Val Glu
 485 490 495
 Val Thr Trp Pro Asp Gly Lys Met Val Ser Arg Asn Val Ala Ser Gly
 500 505 510
 Glu Met Asn Ser Val Leu Glu Ile Leu Tyr Pro Arg Asp Glu Asp Thr
 515 520 525
 Leu Gln Asp Pro Ala Pro Leu Glu Cys Gly Gln Gly Phe Ser Gln Gln
 530 535 540
 Glu Asn Gly His Cys Met Asp Thr Asn Glu Cys Ile Gln Phe Pro Phe
 545 550 555 560
 Val Cys Pro Arg Asp Lys Pro Val Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Tyr
 565 570 575
 Arg Cys Arg Thr Asn Lys Lys Cys Ser Arg Gly Tyr Glu Pro Asn Glu
 580 585 590
 Asp Gly Thr Ala Cys Val Gly Thr Leu Gly Gln Ser Pro Gly Pro Arg
 595 600 605
 Pro Thr Thr Pro Thr Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala
 610 615 620
 Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Pro Val Leu Val Asp Gly Asp Leu Asn
 625 630 635 640
 Leu Gly Ser Val Val Lys Glu Ser Cys Glu Pro Ser Cys
 645 650

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

5

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ttgccaatta cgctacggt

20

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ootgggcatt gtcaagtcg g

21

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
cccttcattg acctcaacta catgg

25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
gggtccaccac cctgttgctg tagcc

25

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gggtccattg taccocgccg cgacg

25

<210> 8
<211> 22
<212> DNA

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

6

<213> Homo sapiens

<400> 8

ctcaagtc ccatcatggt cc

22

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ctcagccgct gtcggtttc cgg

23

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gcttcaaca caactggctg cg

22

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggatgggctt ggggagggtc tagctc

26

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gcagcagcac aagccactt tc

22

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gtgcccagg agtggtgtc actg

24

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

7

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 gcaacaggaag tatgaggact ttagtg 26

<210> 15
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 gggattttaa gtgcataaa ctgaagg 27

<210> 16
 <211> 2039
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 aagcagtggt aacaaagcag agtacgggg ggtataaag gagcgcgctg acccggcat 60
 gtocaggatg ttaccgttcc tggctgctgt ctggcttctg cccataactg aggggtccca 120
 ggggctgaa cccatgttca ctgcagtcac caactcagtt ctgcctcctg actatgacag 180
 taatccaccc cagctcaact atgggtgtggc agttactgat gtgaccatg atggggactt 240
 tgagatcgtc gtggcggggg acaatggacc caacctgggt ctgaagtatg accggggcca 300
 gaagcggctg gtgaacatcg cggctcgatga ggcagctca cctactacg cgtcggggga 360
 ccggcagggg aacgccatcg gggtcacagc ctgcgacatc gacggggagc gccgggggga 420
 gatctacttc ctcaacacca ataatgcctt ctgggggggt gccacgtaca ccgacaagtt 480
 gttcaggttc cgcataaacc ggtgggaaga catctgagc gatgaugtca acgtgggccg 540
 tgggtgtggc agcctctttg ccggacgctc tgtggcctgt gtggacagaa agggctctgg 600
 acgtactctc atctacattg ccaattacgc ctacggtaat gtgggcctct atgcccctat 660
 tgaatggac cctgaggcca gtgacctctc ccgggggaat ctggcgctca gagatgtggc 720
 tggctgaggt ggggtcagca aatatacagg gggccgaggo gtcagcgttg gcccatctc 780
 cagcagcagt gctcggata tcttctgcga caatgagaat gggcctaact tctttttcca 840
 caaccggggc gatggcaact ttgtggagcg tggggcagc gctgggtgtg acgaccccca 900
 ccagcatggg cgaggtgtcg ccttggctga cttcaacctg gatggcaagc tggadacgt 960
 ctatggcaac tggaaatggc ccaaccgctc ctatctgcaa atgagcacc atgggaaggt 1020
 ccgcttccgg gacatcgctc caccacaagt ctccatgccc tccctgtcc gcacggtcat 1080
 caccgccgac tttagcaatg accaggagct ggagatcttc ttcaacaaca ttgcctacgg 1140
 cagctctcca gccaacggcc tcttcggctc catcgtaga gagcacggag acccctccat 1200
 cggaggagtc aatccgggc agccttggc gcttgagggc cggggcacag ggggtgtggt 1260
 gaacgaattc gaaggagaag ggaatgtgga cctcatcttg tccatggag agtccatggc 1320
 tcagcagctg tccgtcttcc ggggcaatca gggcttcaac aacaaatggc tgcgagtggc 1380

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

8

```

gccacgcacc cggtttgggg cctttgcacg gggagctaac gtctgtctct acaccaagaa 1440
gagtcggggcc caactgaggc tcatcgacgg gggctcaggg taactgtgtg agatggagcc 1500
cgtggcacaac tttggcctgg ggaaggatga agctagcagt gtggaggtga cgtggcaga 1560
tggcaagatg gtgagccgga acgtggccag cggggagatg aactcagtgc tggagatcct 1620
ctaccccccg gatgaggaca cacttcagga cccagcccca ctggagtgtg gccaggatb 1680
ctcccgagcg gaaaatggcc attgcatgga cccaatgaa tgcattcagt tccatttctg 1740
gtgcctctga gacaagcccg tatgtgtcaa cactatgga agctacaggt gccggaccaa 1800
caagaagtgc agtcggggct acgagcccaa caggatggc acagcctgcg cgtctcaagt 1860
ggccttttta ggtgggtatt cttcagcccg cttcagaatc tctgaacctc tctctcgggc 1920
ctcatatctt tctctaggcc ttggaatttg cttcagtta tatgcacttt aatcccatc 1980
aataaaggaa aaaaacaaac aaaactaaca gcttttgttg aaaactaaa aaaaaaaaa 2039

```

```

<210> 17
<211> 2089
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 17
aagcagtggt aacaacgcag agtacgcggg ggtataaagc gagcgcgctg acccggcat 60
gtccagagatg ttacncttcc tctgtctgct ctggtttctg cccatcactg aggggtccca 120
gctgggctgaa cccatgttca ctgcagtcac caactcagtt ctgctcctct actatgacag 180
taatcccaac cagctcaact atgggttggc agttactgat gtggaccatg atggggactt 240
tgagatcgtc gtggcggggt acaatggacc caacttgggt ctggaatgat accgggcca 300
gaagcggctg gtgaacatcg cgtctgatga ggcagctca cctactacg cgtctcggga 360
ccggcagggg aacgccatcg gggctcagcg ctgcgacatc gacggggagc gccgggagga 420
gatctacttc ctcaacacca ataattcctt ctcgggggtg gccacgtaca ccgacaagtt 480
gttcaagttc gcccaataac ggtgggaaga catcctgagc gatgaggtca acgtggccc 540
tggtgtggcc agcctcttgg cgggacgctc tgtggcctgt gtggacagaa agggctctgg 600
acgtactctc atctacattg ccaattacgc ctacggtaat gtgggcctct atgcctcat 660
tgaatggac cctgagggca gtgacctctc cggggcatt ctggcgtca gagatgtggc 720
tgcctgagct ggggtcagca aatatacagg gggccgagga gtcagcgtgg gccccatcct 780
cagcagcagt gctcggata tctctcggca caatgagaat gggcctaact tcttttcca 840
caacccgggc gatggacctt ttgtggacgc tgcggcagtt gctgggtgtg acgaacccca 900
ccagcatggc cagaggtgtg cctgggtgca ctccaacgt gatggcaag tggacatcgt 960
ctatggcaac tgggaatggc cccacgcct ctatctgcaa atgagcaacc atgggaaggt 1020
ccgttccggc gacatcgct caccacagtt ctccatgcac tccctgtct gccaggtcat 1080
caccgcgac tttgacaatg accaggagct ggagatcttc tccaacaaca ttgctaccc 1140
cagctctcca gcccaacgcc tcttcggct catcctaga gagcacggag acccctcat 1200
cgaggagctc aatcccgcg acgcttggc gcttgaggcc cggggcacag ggggtgtggt 1260
gacgcacttc gacggagagc ggatgctgga cctcatcttg tccatggag agtccatggc 1320
tcagcgcctg tccgtcttcc ggggcaatca gggcttcaac aacaaatggc tgcagatggt 1380
gccacgcacc cggtttgggg cctttgcag gggagctaac gtctgtctct acaccaagaa 1440
gagtcggggcc caactgaggc tcatcgacgg gggctcaggg taactgtgtg agatggagcc 1500
cgtggcacaac tttggcctgg ggaaggatga agcagcagb gtcggagtgga cgtggcaga 1560
tggcaagatg gtgagccgga acgtggccag cggggagatg aactcagtgc tggagatcct 1620
ctaccccccg gatgaggaca cacttcagga cccagcccca ctggagtgtg gccaggatb 1680
ctcccgagcg gaaaatggcc attgcatgga cccaatgaa tgcattcagt tccatttctg 1740
gtgcctctga gacaagcccg tatgtgtcaa cactatgga agctacaggt gccggaccaa 1800

```

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

9

```

caagaagtgc agtcggggct acgagcccaa cagggatggc acagcctcgc tgggctgggt 1860
gagccctctg ttgaagatag tgacacacaa agttgggaag agccttggtc cctgaatcac 1920
tgaatcaactg cttgaatcaa ccgctgggaa tacctgttga tcaggaaacac ttacctggaa 1980
cttoactgag caggatataa acttctattg tattaagcta ttaatacatt aagatttggg 2040
ggtgtacctc tacataataa attccattt cctcttgaaa aaaaaaaaaa 2089

```

<210> 18

<211> 2145

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

aagcagtggt aacaacgcag agtacgggg ggtataaagc gagogogctg accccggcat 60
gtccaggatg ttaccgttcc tgcctctgct ctggtttctg cccatcaactg aggggtccca 120
gggggctgaa cccatgttca ctgagtcac caactcagtt ctgctcctg actatgacag 180
taatccccc cagctcaact atgggtggc agttactgat gtggaccatg atggggactt 240
tgagatcgtc gtggcggggt acaatggacc caacctggtt ctgaagtatg accggggcca 300
gaagcggctg gtgaacatcg cggtcgatga ggcgagctca cctactacg cgtggggga 360
ccggcagggg aacgcacatg gggtcacagc ctgcgacatc gacggggagc gccggggagg 420
gatctacttc ctcaacacca ataatgcctt ctggggggtg gccacgtaca ccgacaagtt 480
gttcaagttc cgcataaacc ggtgggaaga catcctgagc gatgaggtca acgtggccc 540
tgggtgtggc agcctctttg ccggaogctc tctggcctgt gtggacagaa agggctcttg 600
acgtactctc atctacattg ccaattaagc ctacggtaat gtggccctg atgcctcat 660
tgaatggac cctgaggcca gtgacctctc ccggggcatt ctggcctca gagatgtggc 720
tgctgaggct ggggtcagca aatatcacgg gggccgaggc gtccagctgg gccccatcct 780
cagcccgagt gctcgggata tcttctggca caatgagaat gggcctaact tccttttcca 840
caacgggggc gatggcactt ttgtggaagc tgcggccagt gctgggtgtg acgaccccca 900
ccagcatggg ccaggtgtcg ccttggtctg cttaaacgtg gatggcaaa tggaatcgt 960
ctatggcaac tgggaatggc cccacggcct ctatctgcaa atgagaccc atgggaaggt 1020
ccgcttcagg gacatcgctt caccacagtt ctccatgccc tccctgttc gcacggctat 1080
caccccgcaa tttagcaatg accaggagct ggagatcttc ttcaacaaca ttgctcacg 1140
cagctcctca gccaacggc tcttccggct catccgtaga gagcaggag acccctcat 1200
caggagctc aatcccgagg acgccttggg gcttgagggc cggggccacg ggggtgtgtg 1260
gacggaetic gagggagaag ggtatgtgga cctcatctt tcccatggag agtccatggc 1320
tcagccgtg tccgtcttcc ggggcaatca gggcttcaac aaccaactgg tggagtggt 1380
gcccacgccc cggtttgggg cctttgccc gggagctaa gtctgtct acaccaagaa 1440
gagtggggcc cactgagga tcatcgagg gggctcagge tacctgtgtg agatggagcc 1500
cgtgcacac ttggcctgg ggaagtgat agccagcagt gtggaagtga cgtggcaga 1560
tggcaagatg gtgagccgga agtggccag cggggagatg aactcaagtgc tggagatcct 1620
ctaccccggt gatgaggaca cacttcaggc ccagcccca ctggagtggt gccaggatt 1680
ctccacgag gaaatggcc attgcatgga caccatgaa tgcctcagt tcccatctg 1740
gtgccctcga gacaagcccg tagtgtcaa cactatgga agotacaggt gccggaccaa 1800
caagaagtgc agtcggggct acgagcccaa cagggatggc acagcctagc tggaaagaa 1860
cttctactt ggtctctgca atctcttgg aaaaatagaat gctcctgtag ccagaacact 1920
cttbggaah gatgtaacgc caagaaatg gctcacgacc agcctcagta gtgaaggctt 1980
gttataaac atagatctat tcttctagg gaaaaaagt catcccagga tataataaaa 2040
ttacacttaa gaatgcagca acccttttaa aaacatctt aacaaaaaa agccctgccc 2100
gtttctgat atcatagtaa tactctaat aaatccaaa atatg 2145

```

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

10

<210> 19
 <211> 637
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 19
 Met Ser Arg Met Leu Pro Phe Leu Leu Leu Leu Trp Phe Leu Pro Ile
 1 5 10 15
 Thr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Glu Pro Met Phe Thr Ala Val Thr Asn
 20 25 30
 Ser Val Leu Pro Pro Asp Tyr Asp Ser Asn Pro Thr Gln Leu Asn Tyr
 35 40 45
 Gly Val Ala Val Thr Asp Val Asp His Asp Gly Asp Phe Glu Ile Val
 50 55 60
 Val Ala Gly Tyr Asn Gly Pro Asn Leu Val Leu Lys Tyr Asp Arg Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Arg Leu Val Asn Ile Ala Val Asp Glu Arg Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Tyr Ala Leu Arg Asp Arg Gln Gly Asn Ala Ile Gly Val Thr Ala Cys
 100 105 110
 Asp Ile Asp Gly Asp Gly Arg Glu Glu Ile Tyr Phe Leu Asn Thr Asn
 115 120 125
 Asn Ala Phe Ser Gly Val Ala Thr Tyr Thr Asp Lys Leu Phe Lys Phe
 130 135 140
 Arg Asn Asn Arg Trp Glu Asp Ile Leu Ser Asp Glu Val Asn Val Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Val Ala Ser Leu Phe Ala Gly Arg Ser Val Ala Cys Val Asp
 165 170 175
 Arg Lys Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Asn Tyr Ala Tyr
 180 185 190
 Gly Asn Val Gly Pro Asp Ala Leu Ile Glu Met Asp Pro Glu Ala Ser
 195 200 205
 Asp Leu Ser Arg Gly Ile Leu Ala Leu Arg Asp Val Ala Ala Glu Ala
 210 215 220

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

11

Gly Val Ser Lys Tyr Thr Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Gly Pro Ile
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Ser Ala Ser Asp Ile Phe Cys Asp Asn Glu Asn Gly Pro
 245 250 255
 Asn Phe Leu Phe His Asn Arg Gly Asp Gly Thr Phe Val Asp Ala Ala
 260 265 270
 Ala Ser Ala Gly Val Asp Asp Pro His Gln His Gly Arg Gly Val Ala
 275 280 285
 Leu Ala Asp Phe Asn Arg Asp Gly Lys Val Asp Ile Val Tyr Gly Asn
 290 295 300
 Trp Asn Gly Pro His Arg Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr His Gly Lys
 305 310 315 320
 Val Arg Phe Arg Asp Ile Ala Ser Pro Lys Phe Ser Met Pro Ser Pro
 325 330 335
 Val Arg Thr Val Ile Thr Ala Asp Phe Asp Asn Asp Gln Glu Leu Glu
 340 345 350
 Ile Phe Phe Asn Asn Ile Ala Tyr Arg Ser Ser Ser Ala Asn Arg Leu
 355 360 365
 Phe Arg Val Ile Arg Arg Glu His Gly Asp Pro Leu Ile Glu Glu Leu
 370 375 380
 Asn Pro Gly Asp Ala Leu Glu Pro Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Val
 385 390 395 400
 Val Thr Asp Phe Asp Gly Asp Gly Met Leu Asp Leu Ile Leu Ser His
 405 410 415
 Gly Glu Ser Met Ala Gln Pro Leu Ser Val Phe Arg Gly Asn Gln Gly
 420 425 430
 Phe Asn Asn Asn Trp Leu Arg Val Val Pro Arg Thr Arg Phe Gly Ala
 435 440 445
 Phe Ala Arg Gly Ala Lys Val Val Leu Tyr Thr Lys Lys Ser Gly Ala
 450 455 460
 His Leu Arg Ile Ile Asp Gly Gly Ser Gly Tyr Leu Cys Glu Met Glu
 465 470 475 480

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

12

Pro Val Ala His Phe Gly Leu Gly Lys Asp Glu Ala Ser Ser Val Glu
 485 490 495

Val Thr Trp Pro Asp Gly Lys Met Val Ser Arg Asn Val Ala Ser Gly
 500 505 510

Glu Met Asn Ser Val Leu Glu Ile Leu Tyr Pro Arg Asp Glu Asp Thr
 515 520 525

Leu Gln Asp Pro Ala Pro Leu Glu Cys Gly Gln Gly Phe Ser Gln Gln
 530 535 540

Glu Asn Gly His Cys Met Asp Thr Asn Glu Cys Ile Gln Phe Pro Phe
 545 550 555 560

Val Cys Pro Arg Asp Lys Pro Val Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Tyr
 565 570 575

Arg Cys Arg Thr Asn Lys Lys Cys Ser Arg Gly Tyr Glu Pro Asn Glu
 580 585 590

Asp Gly Thr Ala Cys Val Ala Gln Val Ala Phe Leu Gly Gly Tyr Ser
 595 600 605

Ser Ala Ala Ser Arg Ile Ser Glu Pro Leu Ser Arg Ala Ser Tyr Leu
 610 615 620

Ser Leu Gly Leu Gly Leu Cys Leu Gln Leu Tyr Ala Leu
 625 630 635

<210> 20

<211> 618

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Ser Arg Met Leu Pro Phe Leu Leu Leu Trp Phe Leu Pro Ile
 1 5 10 15

Thr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Glu Pro Met Phe Thr Ala Val Thr Asn
 20 25 30

Ser Val Leu Pro Pro Asp Tyr Asp Ser Asn Pro Thr Gln Leu Asn Tyr
 35 40 45

Gly Val Ala Val Thr Asp Val Asp His Asp Gly Asp Phe Glu Ile Val
 50 55 60

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

13

Val Ala Gly Tyr Asn Gly Pro Asn Leu Val Leu Lys Tyr Asp Arg Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Arg Leu Val Asn Ile Ala Val Asp Glu Arg Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Tyr Ala Leu Arg Asp Arg Gln Gly Asn Ala Ile Gly Val Thr Ala Cys
 100 105 110
 Asp Ile Asp Gly Asp Gly Arg Glu Glu Ile Tyr Phe Leu Asn Thr Asn
 115 120 125
 Asn Ala Phe Ser Gly Val Ala Thr Tyr Thr Asp Lys Leu Phe Lys Phe
 130 135 140
 Arg Asn Asn Arg Trp Glu Asp Ile Leu Ser Asp Glu Val Asn Val Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Val Ala Ser Leu Phe Ala Gly Arg Ser Val Ala Cys Val Asp
 165 170 175
 Arg Lys Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Asn Tyr Ala Tyr
 180 185 190
 Gly Asn Val Gly Pro Asp Ala Leu Ile Glu Met Asp Pro Glu Ala Ser
 195 200 205
 Asp Leu Ser Arg Gly Ile Leu Ala Leu Arg Asp Val Ala Ala Glu Ala
 210 215 220
 Gly Val Ser Lys Tyr Thr Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Gly Pro Ile
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Ser Ala Ser Asp Ile Phe Cys Asp Asn Glu Asn Gly Pro
 245 250 255
 Asn Phe Leu Phe His Asn Arg Gly Asp Gly Thr Phe Val Asp Ala Ala
 260 265 270
 Ala Ser Ala Gly Val Asp Asp Pro His Gln His Gly Arg Gly Val Ala
 275 280 285
 Leu Ala Asp Phe Asn Arg Asp Gly Lys Val Asp Ile Val Tyr Gly Asn
 290 295 300
 Trp Asn Gly Pro His Arg Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr His Gly Lys
 305 310 315 320
 Val Arg Phe Arg Asp Ile Ala Ser Pro Lys Phe Ser Met Pro Ser Pro

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

14

```

325              330              335
Val Arg Thr Val Ile Thr Ala Asp Phe Asp Asn Asp Gln Glu Leu Glu
340              345              350
Ile Phe Phe Asn Asn Ile Ala Tyr Arg Ser Ser Ser Ala Asn Arg Leu
355              360              365
Phe Arg Val Ile Arg Arg Glu His Gly Asp Pro Leu Ile Glu Glu Leu
370              375              380
Asn Pro Gly Asp Ala Leu Glu Pro Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Val
385              390              395              400
Val Thr Asp Phe Asp Gly Asp Gly Met Leu Asp Leu Ile Leu Ser His
405              410              415
Gly Glu Ser Met Ala Gln Pro Leu Ser Val Phe Arg Gly Asn Gln Gly
420              425              430
Phe Asn Asn Asn Trp Leu Arg Val Val Pro Arg Thr Arg Phe Gly Ala
435              440              445
Phe Ala Arg Gly Ala Lys Val Val Leu Tyr Thr Lys Lys Ser Gly Ala
450              455              460
His Leu Arg Ile Ile Asp Gly Gly Ser Gly Tyr Leu Cys Glu Met Glu
465              470              475              480
Pro Val Ala His Phe Gly Leu Gly Lys Asp Glu Ala Ser Ser Val Glu
485              490              495
Val Thr Trp Pro Asp Gly Lys Met Val Ser Arg Asn Val Ala Ser Gly
500              505              510
Glu Met Asn Ser Val Leu Glu Ile Leu Tyr Pro Arg Asp Glu Asp Thr
515              520              525
Leu Gln Asp Pro Ala Pro Leu Glu Cys Gly Gln Gly Phe Ser Gln Gln
530              535              540
Glu Asn Gly His Cys Met Asp Thr Asn Glu Cys Ile Gln Phe Pro Phe
545              550              555              560
Val Cys Pro Arg Asp Lys Pro Val Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Tyr
565              570              575
Arg Cys Arg Thr Asn Lys Lys Cys Ser Arg Gly Tyr Glu Pro Asn Glu
580              585              590

```

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

15

Asp Gly Thr Ala Cys Val Gly Trp Trp Ser Pro Val Leu Lys Ile Val
 595 600 605

Thr Pro Gln Val Gly Lys Ser Leu Gly Pro
 610 615

<210> 21
 <211> 612
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Met Ser Arg Met Leu Pro Phe Leu Leu Leu Trp Phe Leu Pro Ile
 1 5 10 15

Thr Glu Gly Ser Gln Arg Ala Glu Pro Met Phe Thr Ala Val Thr Asn
 20 25 30

Ser Val Leu Pro Pro Asp Tyr Asp Ser Asn Pro Thr Gln Leu Asn Tyr
 35 40 45

Gly Val Ala Val Thr Asp Val Asp His Asp Gly Asp Phe Glu Ile Val
 50 55 60

Val Ala Gly Tyr Asn Gly Pro Asn Leu Val Leu Lys Tyr Asp Arg Ala
 65 70 75 80

Gln Lys Arg Leu Val Asn Ile Ala Val Asp Glu Arg Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95

Tyr Ala Leu Arg Asp Arg Gln Gly Asn Ala Ile Gly Val Thr Ala Cys
 100 105 110

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Arg Glu Glu Ile Tyr Phe Leu Asn Thr Asn
 115 120 125

Asn Ala Phe Ser Gly Val Ala Thr Tyr Thr Asp Lys Leu Phe Lys Phe
 130 135 140

Arg Asn Asn Arg Trp Glu Asp Ile Leu Ser Asp Glu Val Asn Val Ala
 145 150 155 160

Arg Gly Val Ala Ser Leu Phe Ala Gly Arg Ser Val Ala Cys Val Asp
 165 170 175

Arg Lys Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Asn Tyr Ala Tyr
 180 185 190

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

16

Gly Asn Val Gly Pro Asp Ala Leu Ile Glu Met Asp Pro Glu Ala Ser
 195 200 205
 Asp Leu Ser Arg Gly Ile Leu Ala Leu Arg Asp Val Ala Ala Glu Ala
 210 215 220
 Gly Val Ser Lys Tyr Thr Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Gly Pro Ile
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Ser Ala Ser Asp Ile Phe Cys Asp Asn Glu Asn Gly Pro
 245 250 255
 Asn Phe Leu Phe His Asn Arg Gly Asp Gly Thr Phe Val Asp Ala Ala
 260 265 270
 Ala Ser Ala Gly Val Asp Asp Pro His Gln His Gly Arg Gly Val Ala
 275 280 285
 Leu Ala Asp Phe Asn Arg Asp Gly Lys Val Asp Ile Val Tyr Gly Asn
 290 295 300
 Trp Asn Gly Pro His Arg Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr His Gly Lys
 305 310 315 320
 Val Arg Phe Arg Asp Ile Ala Ser Pro Lys Phe Ser Met Pro Ser Pro
 325 330 335
 Val Arg Thr Val Ile Thr Ala Asp Phe Asp Asn Asp Gln Glu Leu Glu
 340 345 350
 Ile Phe Phe Asn Asn Ile Ala Tyr Arg Ser Ser Ser Ala Asn Arg Leu
 355 360 365
 Phe Arg Val Ile Arg Arg Glu His Gly Asp Pro Leu Ile Glu Glu Leu
 370 375 380
 Asn Pro Gly Asp Ala Leu Glu Pro Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Val
 385 390 395 400
 Val Thr Asp Phe Asp Gly Asp Gly Met Leu Asp Leu Ile Leu Ser His
 405 410 415
 Gly Glu Ser Met Ala Gln Pro Leu Ser Val Phe Arg Gly Asn Gln Gly
 420 425 430
 Phe Asn Asn Asn Trp Leu Arg Val Val Pro Arg Thr Arg Phe Gly Ala
 435 440 445

WO 02/06478

PCT/EP01/07888

17

Phe Ala Arg Gly Ala Lys Val Val Leu Tyr Thr Lys Lys Ser Gly Ala
 450 455 460
 His Leu Arg Ile Ile Asp Gly Gly Ser Gly Tyr Leu Cys Glu Met Glu
 465 470 475 480
 Pro Val Ala His Phe Gly Leu Gly Lys Asp Glu Ala Ser Ser Val Glu
 485 490 495
 Val Thr Trp Pro Asp Gly Lys Met Val Ser Arg Asn Val Ala Ser Gly
 500 505 510
 Glu Met Asn Ser Val Leu Glu Ile Leu Tyr Pro Arg Asp Glu Asp Thr
 515 520 525
 Leu Gln Asp Pro Ala Pro Leu Glu Cys Gly Gln Gly Phe Ser Gln Gln
 530 535 540
 Glu Asn Gly His Cys Met Asp Thr Asn Glu Cys Ile Gln Phe Pro Phe
 545 550 555 560
 Val Cys Pro Arg Asp Lys Pro Val Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Tyr
 565 570 575
 Arg Cys Arg Thr Asn Lys Lys Cys Ser Arg Gly Tyr Glu Pro Asn Glu
 580 585 590
 Asp Gly Thr Ala Cys Val Glu Arg Thr Leu Leu Leu Gly Leu Cys Asn
 595 600 605
 Leu Leu Gly Lys
 610

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(11) International Publication Number
WO 02/06478 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, C12N 15/65, A61K 38/17, C12N 5/10,
C12Q 1/68, G01N 33/68

(21) International Application Number: PCT/EP01/07858

(22) International Filing Date: 9 July 2001 (09.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00203495.8 13 July 2000 (13.07.2000) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): AKZO
NOVEL N.V. [NL/NL]; Veluweweg 76, NL-6824 HM Am-
sterdam (NL).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): HEUS, Hendrik,
Cornelis [NL/NL]; 41 bis, Rue du quatre Septembre,
F-92500 Rueil Malmaison (FR); NIELSEN, Robert,
Louis, Hubert [NL/NL]; Buitendijk 5, NL-5346 WJ
Oss (NL); MEELWISSE, Cornelis, Maria, Leonardus
[NL/NL]; Opwatersemsloten 1, NL-5612 DR Eindhoven
(NL).(74) Agent: VAN WEZENBEEK, P., M., G., F.; P.O. Box 20,
5340 BH Oss (DE).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AU, BA, BB,
BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EL,
GD, GE, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR,
LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, MY, NO, NZ, PL, RO,
RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, 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, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
18 April 2002For 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 02/06478 A3

(54) Title: EXTRACELLULAR MATRIX PROTEIN

(57) Abstract: The invention describes a protein useful in the prevention of inflammatory diseases, more specifically in the induction of T cell tolerance to the protein in patients suffering from rheumatoid arthritis.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

[CORRECTED VERSION]

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/006478 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/67, C12N 5/85, A61K 38/17, C12N 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/66

(21) International Application Number: PCT/EP01/07888

(22) International Filing Date: 9 July 2001 (09.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00202495.8 13 July 2000 (13.07.2000) EP

(81) Designated States (national): AL, AG, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GD, GB, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NG, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

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

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 18 April 2002

(71) Applicant (for all designated States except US, AKZO) NOBEL, N.V. [NL/NL], Velperweg 76, NL-6825 BM Arnhem (NL)

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HEITS, Hendrik, Cornelis [NL/NL], 41 bis, Rue de quatre Septembre, F-92200 Rueil-Malmaison (FR); NELISSEN, Robert, Louis, Hubert [NL/NL], Bollenhof 5, NL-5345 WJ Oss (NL); MEERWISSE, Cornelis, Maria, Leonardus [NL/NL], Opwetensmolen 1, NL-5512 DR Eindhoven (NL).

(48) Date of publication of this corrected version: 6 March 2002

(15) Information about Correction: see PCT Gazette No. 10/2003 of 6 March 2003, Section II

(74) Agent: VAN WEZENBEEK, P., M., G., F., P.O. Box 20, NL-5340 BII Oss (NL).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/006478 A3

(54) Title: EXTRACELLULAR MATRIX PROTEIN

(57) Abstract: The invention describes a protein useful in the prevention of inflammatory diseases, more specifically in the induction of T cell tolerance to the protein in patients suffering from rheumatoid arthritis.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/07888
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/85 A61K38/17 C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EMBL, EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE SMALL 'Online! Database Entry 090X63. 1 May 2000 (2000-05-01) KAWASAKI H. ET AL.: "Characterization of region specific genes from rat brain" Database accession no. 090X63 XP002154770 the whole document --- -/-	6
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier documents that published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date or another claim or other special reason (see, specifically) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
31 January 2002		15/02/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1, 8010 Larenstein 2 44 - 2500 HV The Hague Tel: (+31) 70 340 2040, Tx: 31 551 epo nl Fax: (+31) 70 340 3016		Authorized officer Montero Lopez, B

2

Form PCT/EP 2001/1 (Revised Sheet 1) (10/01/1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/07888

C. Continued Documents Considered to be Relevant		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to column No.
A	WAGENER R ET AL: "Primary structure of matrilin -3, a new member of a family of extracellular matrix proteins related to cartilage matrix protein (matrilin -1) and von Willebrand factor" FEBS LETTERS,NL ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM. vol. 413, 1997, pages 129-134. XP002082216 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-10
A	DATABASE EMBL "Online!" Database Entry AK001182, 22 February 2000 (2000-02-22) ISOGAI T. ET AL.: "Homo sapiens cDNA FLJ10320 fis, clone NT2RM2000502" Database accession no. AK001182 XP002154771 the whole document	1-10
E	WO 01 53531 A (PHARMACIA CORPORATION) 26 July 2001 (2001-07-26) page 3, line 13 -page 8, line 20 page 14, line 14 -page 76, line 3 SEQ ID NO:30	1,2,5-13
P, X	DATABASE EMBL "Online!" Database Entry HSA276171, 20 July 2000 (2000-07-20) BOLTON M.C.: "Homo sapiens mRNA for ASPIC (acidic secreted protein in cartilage) (ASPIC1 gene)" Database accession no. AJ276171 XP002188783 the whole document	1-4

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern. Patent Application No.
 PCT/EP 01/07888

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE EMBLNEW 'Online! Database Entry HSA279016, 14 September 2000 (2000-09-14) STECK E. ET AL.: "Homo sapiens mRNA for chondrocyte expressed protein 68 kDa (CEP-68 gene)" Database accession no. AJ279016 XP002188784	1-4
P,X	& STECK E. ET AL.: "Chondrocyte expressed protein-68 (CEP-68), a novel human marker gene for cultured chondrocytes" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 353, January 2001 (2001-01), pages 169-174, abstract page 170, right-hand column, last paragraph -page 171, right-hand column, paragraph 2 page 172, left-hand column, paragraph 2 -page 173, right-hand column, paragraph 3 -----	1-6, 11, 12
P,X	DATABASE SWALL 'Online! Database Entry Q9NQ79, 1 October 2000 (2000-10-01) BOLTON M.C. ET AL.: "Cloning of ASPIC, a novel protein secreted by human normal and osteoarthritic cartilage, identified by 2D electrophoresis and mass spectrometry" Database accession no. Q9NQ79 XP002188785 the whole document -----	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/EP 01/07888

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0153531 A	26-07-2001	AU 2752601 A WO 0153531 A2	31-07-2001 26-07-2001

Form PCT/IS 210 (patent family members), July 1992

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 37/06	A 6 1 P 37/06	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	K
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 N 5/00	A
	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,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AU,BA,BB,BG,BR,BZ,CA,CN,CO,CR,CU,CZ,DM,DZ,EC,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KP,KR,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MG,MK,MN,MX,MZ,NO,NZ,PL,RO,RU,SG,SI,SK,SL,TR,TT,UA,US,UZ,VN,YU,ZA

(72)発明者 ヒュース, ヘンドリック・コルネリス
フランス国、エフー 9 2 5 0 0 ・リュイユ・マルメゾン、リュ・ドユ・カトル・セプタンブル、4
1 ・ビス

(72)発明者 ネリツセン, ローベルト・ルイス・ヒューベルト
オランダ国、エヌ・エルー 5 3 4 6 ・ウエー・イエー・オツス、ブイテンホフ・5

(72)発明者 メーウイツセ, コルネリス・マリア・レオナルドウス
オランダ国、エヌ・エルー 5 6 1 2 ・デー・エル・アイントホーフエン、オブウエテンセモーレン
・1

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BA11 BB14 BB20 BB29 BB50 BB51 CA18 CA25
CB01 CB13 DA12 DA13 DA14 DA35 DA36 FA11 FB01 FB02
FB03 FB05 FB08
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04
GA11
4B063 QA18 QA19 QQ08 QX10
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 AA14 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA53
CA56 CA59 NA13 NA14 ZA962 ZB072 ZB082 ZB112 ZB152
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	细胞外基质蛋白		
公开(公告)号	JP2004504030A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002512371	申请日	2001-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克苏诺贝尔的基础		
[标]发明人	ヒユースヘンドリック・コルネリス ネリツセン・ローベルト・ルイス・ヒューベルト メーウイツセ・コルネリス・マリア・レオナルドウス		
发明人	ヒユース,ヘンドリック・コルネリス ネリツセン,ローベルト・ルイス・ヒューベルト メーウイツセ,コルネリス・マリア・レオナルドウス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/17 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/85 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/4713		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P19/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P37/06 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.K G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BA11 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB29 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA18 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB13 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QX10 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA14 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	井上 充 小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	2000202495 2000-07-13 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明描述了新的蛋白质及其变体，以及编码这些蛋白质的基因。该蛋白质可用于预防炎性疾病，更具体地讲，可用于在类风湿性关节炎患者中诱导对该蛋白质的T细胞耐受性。

