

(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2005-505285

(P2005-505285A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(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 39/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	4 B O 6 4
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 177 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-534549 (P2003-534549)	(71) 出願人	591123609
(86) (22) 出願日	平成14年10月4日 (2002. 10. 4)		イミュネックス・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月9日 (2004. 4. 9)		I M M U N E X C O R P O R A T I O N
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/031996		アメリカ合衆国カリフォルニア州9132
(87) 国際公開番号	W02003/031578		O-1799, サウザンド・オークス, ワ
(87) 国際公開日	平成15年4月17日 (2003. 4. 17)		ン・アムゲン・センター・ドライブ
(31) 優先権主張番号	60/328, 026	(74) 代理人	100089705
(32) 優先日	平成13年10月9日 (2001. 10. 9)		弁理士 社本 一夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠次
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物C型レクチン

(57) 【要約】

本発明は、抗原提示細胞と関連する、新規哺乳動物C型レクチンポリペプチドを提供する。樹状細胞C型レクチン(DCL)と称する、以下の4つの新規遺伝子: DCL1、DCL2、DCL3およびDCL4、それとともに、スプライシング変異体svDCL2、svDCL3およびsvDCL4、並びに本明細書においてDCL5と称するヒト相同体が発見された。本発明は、DCLポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、組換え発現ベクター、組換え発現ベクターでトランスフェクションした宿主細胞、本発明のポリペプチドを産生し、そして単離する方法、および多様なスクリーニングアッセイを提供する。多様な疾患を治療する療法組成物および方法もまた提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ～ 2 4 5 および配列番号 2 のアミノ酸 7 7 ～ 2 4 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列；
- (c) 少なくとも 1 つの D C L 活性を有する、細胞外ドメインのすべてまたは一部を含んでなる、配列番号 2 のアミノ酸配列；
- (d) 少なくとも 1 つの D C L 活性を有する、少なくとも 2 5 の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ～ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；
- (e) C 型レクチンドメインを有する、少なくとも 2 5 の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ～ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；
- (f) 免疫受容体チロシン依存性阻害性様モチーフ (I T I M) アミノ酸配列を有する、少なくとも 2 5 の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ～ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；
- (g) 免疫原性である、少なくとも 2 5 の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ～ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；
- (h) 少なくとも 2 5 のアミノ酸を含んでなり、そして (a) ～ (g) いずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有し、アミノ酸同一性パーセントが少なくとも 8 0 % であり、少なくとも 1 つの D C L 活性を有する、アミノ酸配列；および
- (i) 少なくとも 2 0 のアミノ酸を含んでなり、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端一部切除 (t r u n c a t i o n)、および N 末端一部切除からなる群より選択される、少なくとも 1 つの修飾を有し、少なくとも 1 つの D C L 活性を有する、(a) ～ (c) いずれかのアミノ酸配列
- からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 のポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

- (a) 配列番号 1；
- (b) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 ～ 7 3 8；および
- (c) (a) ～ (b) の対立遺伝子変異体
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 2 のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 2 および 3 いずれかのポリヌクレオチドに対応する、単離ゲノムポリヌクレオチド。

【請求項 5】

長さ少なくとも 1 5 のヌクレオチドを有し、中程度のストリンジェンシーの条件下で、請求項 3 のポリヌクレオチドの相補核酸にハイブリダイズし、少なくとも 1 つの D C L 活性を有するポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 3 の核酸のヌクレオチド配列とヌクレオチド配列同一性を共有し、ヌクレオチド配列同一性パーセントが少なくとも 8 0 % であり、少なくとも 1 つの D C L 活性を有するポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 2 ～ 6 いずれかに記載の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含んでなる、発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 2 ～ 6 いずれかに記載の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含んでなる、形質転換宿主細胞。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

形質転換宿主細胞が、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、並びにヒト、サル (m o n k e y)、類人猿 (a p e) およびげっ歯類などの哺乳動物細胞からなる群より選択される、請求項 8 の形質転換宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 2 ~ 6 いずれかのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを産生するための方法であって、前記ポリペプチドの発現を促進する条件下で、形質転換宿主細胞を培養することを含んでなり、該形質転換宿主細胞が、請求項 2 ~ 6 いずれかに記載の、少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含んでなる、前記方法。

【請求項 11】

前記ポリペプチドを精製することをさらに含んでなる、請求項 10 の方法。

10

【請求項 12】

請求項 11 の方法によって産生されるポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 1 のポリペプチドに結合する、単離抗体。

【請求項 14】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 13 の抗体。

【請求項 15】

モノクローナル抗体が、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である、請求項 14 の抗体。

【請求項 16】

抗体が、請求項 1 のポリペプチドの 1 以上の D C L 活性をアゴナイズする、請求項 15 の抗体。

20

【請求項 17】

(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列；
 (b) 配列番号 5 のアミノ酸 1 ~ 2 1 5 および配列番号 5 のアミノ酸 4 2 ~ 2 1 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列；
 (c) 少なくとも 1 つの D C L 活性を有する、細胞外ドメインのすべてまたは一部を含んでなる、配列番号 5 のアミノ酸配列；
 (d) 少なくとも 1 つの D C L 活性を有する、少なくとも 2 5 の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ~ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；
 (e) C 型レクチンドメインを有する、少なくとも 2 5 の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ~ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；
 (f) 免疫原性である、少なくとも 2 5 の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ~ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；
 (g) 少なくとも 2 5 のアミノ酸を含んでなり、そして (a) ~ (f) いずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有し、アミノ酸同一性パーセントが少なくとも 8 0 % であり、少なくとも 1 つの D C L 活性を有する、アミノ酸配列；および
 (h) 少なくとも 2 0 のアミノ酸を含んでなり、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端一部切除、および N 末端一部切除からなる群より選択される、少なくとも 1 つの修飾を有し、少なくとも 1 つの D C L 活性を有する、(a) ~ (c) いずれかのアミノ酸配列

30

40

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチド。

【請求項 18】

請求項 17 のポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 19】

(a) 配列番号 2 3 ；
 (b) 配列番号 2 3 のヌクレオチド 1 ~ 6 4 8 ；および
 (c) (a) ~ (b) の対立遺伝子変異体

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 18 のポリヌクレオチド。

50

【請求項 20】

請求項 18 および 19 いずれかのポリヌクレオチドに対応する、単離ゲノムポリヌクレオチド。

【請求項 21】

長さ少なくとも 15 のヌクレオチドを有し、中程度のストリンジェンシーの条件下で、請求項 19 のポリヌクレオチドの相補核酸にハイブリダイズし、少なくとも 1 つの DCL 活性を有するポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 22】

請求項 19 の核酸のヌクレオチド配列とヌクレオチド配列同一性を共有し、ヌクレオチド配列同一性パーセントが少なくとも 80 % であり、少なくとも 1 つの DCL 活性を有するポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチド。 10

【請求項 23】

請求項 18 ~ 22 いずれかに記載の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含んでなる、発現ベクター。

【請求項 24】

請求項 18 ~ 22 いずれかに記載の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含んでなる、形質転換宿主細胞。

【請求項 25】

形質転換宿主細胞が、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、並びにヒト、サル、類人猿およびげっ歯類などの哺乳動物細胞からなる群より選択される、請求項 24 の形質転換宿主細胞。 20

【請求項 26】

請求項 18 ~ 22 いずれかのポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを産生するための方法であって、前記ポリペプチドの発現を促進する条件下で、形質転換宿主細胞を培養することを含んでなり、該形質転換宿主細胞が、請求項 18 ~ 22 いずれかに記載の、少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含んでなる、前記方法。

【請求項 27】

前記ポリペプチドを精製することをさらに含んでなる、請求項 26 の方法。

【請求項 28】

請求項 27 の方法によって産生されるポリペプチド。 30

【請求項 29】

請求項 17 のポリペプチドに結合する、単離抗体。

【請求項 30】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 29 の抗体。

【請求項 31】

モノクローナル抗体が、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である、請求項 30 の抗体。

【請求項 32】

請求項 17 のポリペプチドの、1 以上の DCL 活性をアゴナイズする、請求項 31 の抗体。 40

【請求項 33】

ポリペプチドが、抗原結合、抗原インターナリゼーション、抗原プロセッシングおよび抗原提示；抗原提示細胞（APC）活性化、APC 分化、APC 成熟、APC ホーミングおよび APC 遊出（transmigration）；結合、および興奮性の方式または阻害性の方式いずれかでの細胞内シグナル伝達経路の調節を含む、細胞間相互作用；可溶性因子の分泌を通じた細胞外コミュニケーション；C 型レクチン活性；炭水化物認識ドメイン活性；アスパルチルプロテアーゼ活性および免疫受容体チロシン依存性阻害性様モチーフ（ITIM）活性からなる群より選択される活性を有する、請求項 1 または 17 のポリペプチド。

【請求項 34】

D C L ポリペプチド活性を調節する化合物を同定する方法であって

(a) 請求項 1 または請求項 1 7 のポリペプチドと試験化合物を混合し ; そして

(b) 試験化合物が、前記ポリペプチドの D C L ポリペプチド活性を改変するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法。

【請求項 3 5】

D C L ポリペプチドの結合活性を阻害する化合物を同定する方法であって

(a) 請求項 1 または請求項 1 7 のポリペプチドおよび前記ポリペプチドの結合パートナーと試験化合物を混合し ; そして

(b) 試験化合物が、前記ポリペプチドの結合活性を阻害するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法。

10

【請求項 3 6】

D C L 活性を増加させる方法であって、請求項 1 および 1 7 いずれかのポリペプチド、並びに前記ポリペプチドのアゴニストからなる群より選択される、少なくとも 1 つの化合物を提供することを含んでなる、前記方法。

【請求項 3 7】

アゴニストが、抗体、ペプチド、ペプチド擬似体 (p e p t i d o m i m e t i c)、ミモトープ (m i m o t o p e) またはペプチボディ (p e p t i b o d y) からなる群より選択される、請求項 3 6 の方法。

【請求項 3 8】

1 以上の D C L 活性を減少させる方法であって、請求項 1 および 1 7 いずれかのポリペプチドの少なくとも 1 つのアнтаゴニストを提供することを含んでなる、前記方法。

20

【請求項 3 9】

アンタゴニストが、抗体、ペプチド、ペプチド擬似体、ミモトープまたはペプチボディからなる群より選択される、請求項 3 8 の方法。

【請求項 4 0】

感染性疾患を治療する方法であって、請求項 1 および 1 7 いずれか記載の 1 以上のポリペプチドを、感染性病原体由来の 1 以上の抗原とカップリングさせて投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 4 1】

感染性病原体に対する免疫反応を増大させる方法であって、請求項 1 および 1 7 いずれか記載の 1 以上のポリペプチドを、感染性病原体由来の 1 以上の抗原とカップリングさせて投与することを含んでなる、前記方法。

30

【請求項 4 2】

癌を治療する方法であって、請求項 1 および 1 7 いずれか記載の 1 以上のポリペプチドを、1 以上の腫瘍抗原とカップリングさせて投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 4 3】

癌に対する免疫反応を増大させる方法であって、請求項 1 および 1 7 いずれか記載の 1 以上のポリペプチドを、1 以上の腫瘍抗原とカップリングさせて投与することを含んでなる、前記方法。

40

【請求項 4 4】

免疫系の細胞において、抗原特異的寛容を誘導する方法であって、請求項 1 および 1 7 いずれか記載の 1 以上のポリペプチドを、自己免疫または炎症と関連する 1 以上の抗原とカップリングさせて投与することを含んでなる、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願へのクロスリファレンス

本出願は、35 U . S . C . § 1 1 9 (e) に基づいて、米国仮出願第 6 0 / 3 2 8 , 0 2 6 号、2001 年 10 月 9 日提出の優先権を主張し、前記出願の開示は、本明細書に援

50

用される。

【 0 0 0 2 】

発明の分野

本発明は、抗原提示細胞において発現される、新規C型レクチンファミリーメンバーを提供し、そして1つの特定の態様において、細菌リポ多糖(LPS)での刺激に反応して、樹状細胞上で上方制御されるC型レクチンを提供する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

発明の背景

宿主防御系は、感染性病原体および傷害から宿主を保護する、自然免疫および適応免疫に頼る。自然免疫系には、補体、ナチュラルキラー細胞および食細胞などの、いくつかの免疫制御構成要素が含まれ、そして病原性傷害および/または組織傷害を迅速に認識する能力とともに、適応免疫系の細胞に多様なシグナルを送る能力によって特徴付けられる。自然免疫系の細胞は、病原体間で共有されるパターン、例えば細菌リポ多糖(LPS)、炭水化物、および二本鎖ウイルスRNAを認識する、多様な受容体を用いる。適応免疫系、または体液性免疫および細胞仲介性免疫は、免疫グロブリンファミリーの遺伝子を再編成する能力によって特徴付けられ、これによって、非常に多様な抗原特異的クローンおよび免疫学的記憶が可能になる。抗原提示細胞(APC)は、適応免疫系の細胞を指導し、そして制御するように働く。

【 0 0 0 4 】

樹状細胞(DC)は、一次T細胞反応を誘導し、それによって、抗原特異的免疫反応を可能にし、そして免疫学的記憶を確立することが知られる唯一の細胞である点で、ユニークなAPCである。DCはプロフェッショナルAPCであり、Bリンパ球およびTリンパ球の特に効率的な刺激因子である。DCは、ミスマッチMHC、スーパー抗原(Bhardwaj, N.ら, J. Exp. Med., 178, 633-642(1993))、感染性病原体由来のタンパク質(Inaba, K.ら, J. Exp. Med., 178, 479-488(1993))および腫瘍(Mayordomo, J.I.ら, Nature Med., 1, 1297-1302(1995); Hsu, F.J.ら, Nature Med., 2, 52-58(1996))に対して、未刺激(naive)T細胞をプライミングする能力を有する。DCは、T細胞を活性化するのに非常に効率的であり、そして混合リンパ球反応において、1つのDCは、100~3,000のT細胞を活性化することが可能である。研究者らは、いまだに、DCのT細胞結合および活性化効率の基礎を特定できずにいるが、DCのユニークな刺激特性は、部分的に、MHC産物およびMHC-ペプチド複合体が、B細胞および単球などの他のAPCよりも、DC上に10~100倍多いという事実に起因する可能性がある(Inaba, K.ら, J. Exp. Med., 186, 665-672(1997))。さらに、成熟DCのサブセットは、IL-10の抑制効果に抵抗し、そして高レベルのIL-12を合成し、これが次に、ナチュラルキラー細胞の形の自然免疫、並びにT細胞およびB細胞による獲得免疫を増進する(Koch, F.ら, J. Exp. Med., 184, 741-747(1996))。さらに、DCは、LFA-3/CD58、ICAM-1/CD54およびB7-2/CD86などの、接着および同時刺激を増進する、T細胞上の受容体と相互作用する多くのアクセサリー分子を上方制御し、そして発現する(Banchereauら, Nature, 392, 245-252(1998))。

【 0 0 0 5 】

DCは多くの組織に位置し、ここで、抗原を捕捉し、そしてプロセッシングすることによって、歩哨(sentinel)の役割を果たす。1つの形では、DCの前駆体は骨髄から遊走し、そして血液中を循環して、体の特定の部位に移り、そこで成熟する。この輸送は、部分的に、ケモカイン受容体および接着分子の発現によって導かれる。DC輸送パターンおよび機能の間のこの関連から、発生および成熟中のDCのケモカイン反応性が調べら

10

20

30

40

50

れてきた。樹状細胞サブセットに対するケモカインの影響の概説に関しては、Dieu-Nosjean, J. Leuk. Biol. 66(2):252-62, 1999を参照されたい。一般的に、抗原および活性化シグナルへの曝露に際して、DCが活性化され、そしてDCは、同時刺激分子および接着分子を上方制御し、そして組織を離れ、求心性リンパ管を介して、排出リンパ節のT細胞リッチ副皮質に向かって遊走する。活性化されたDCはその後、T細胞ホーミングおよび活性化に関与するケモカインおよびサイトカインを分泌し、そしてプロセッシングした抗原をT細胞に提示する。例えば、DC特異的C型レクチンであるDC-SIGNは、血管リガンドICAM-2上にDC-SIGN陽性細胞を束縛し、そして回転させるのを補助することが示されている。このプロセスは、血液からの流出の必要条件である可能性があり、そして、DC-SIGN:ICAM-2相互作用が、休止内皮および活性化内皮両方を横切る、ケモカインに誘導されるDCの遊出(transmigration)を制御することが示されている(Teunis, B.H.ら, Nature 1:353-357, 2000)。さらに、DC-SIGNは、休止T細胞上に発現されるICAM-3との一過性の接触を仲介し、そしてICAM-3への結合が、DCおよびT細胞間の最初の接着を確立するのに重要な役割を果たし、そしてそれに続いて、他の接着分子との低アピディティー相互作用を促進して、生産的なT細胞受容体会合、その後、接着強化を可能にすることが立証されている(Teunis, B.H.ら, Cell 100:575-585, 2000)。

【0006】

未成熟DCは、抗原捕捉において、非常に効率的であり、そして、マクロピノサイトーシス；免疫複合体のインターナライゼーションのためのC型レクチン受容体またはI型(CD64)およびII型(CD32)Fcγ受容体を介した、受容体仲介エンドサイトーシス、並びに微粒子の食作用などの、いくつかの経路を用いる。微粒子の食作用には、CD36およびαVβ3またはαVβ5インテグリン(Albert, M.L.ら, J. Exp. Med. 188:1359-68, 1998; Rubartelli, A.ら, Eur. J. Immunol. 27:1893-900, 1997)、ウイルスおよび細菌とともに細胞内寄生虫(Moll, H.ら, Immunol Today, 14:383-87, 1993)を含む、アポトーシス細胞断片および壊死細胞断片が含まれる。DCはまた、ペプチドが装填された熱ショックタンパク質gp96およびHsp70をインターナライズする能力も有する(Arnold-Schildd, D.ら, J. Immunol. 162:3757-60, 1999)。広く発現されているα2-マクログロブリン受容体であるCD91は、gp96の受容体であることが示されている(Binder, J.R.ら, J. Immunol. 1:151-55, 2000)。特定のDCサブタイプにおいて、抗原の取り込みは、未成熟DCが、表現型的变化および機能的変化を経て、最終的に抗原捕捉細胞から抗原提示細胞に完全に移行するように誘導する。

【0007】

C型(Ca²⁺依存性)レクチン受容体、例えばマンノース受容体(Hart, D.N.ら, Blood 90:3245:87, 1997)およびDEC-205(Jiang, W.ら, Nature 375:151-55, 1995)を介した、受容体仲介エンドサイトーシスの役割は、DC生物学の重要な興味の対象である。補体活性化経路を含むマンノース結合レクチン経路(MBL)は、炭水化物認識ドメイン(CRD)を介した炭水化物へのMBLの結合によって仲介される。CRD結合は、糖選択的およびカルシウム依存性である。MBLは、微生物表面上の炭水化物構造のアレイに結合し、該アレイは、次に、溶解性膜攻撃複合体を通じ、補体を介して直接殺すことによって、または生物の食作用を促進することによって、抗菌反応を仲介する。自己構造および非自己構造間を区別する能力は、CRDの特異性に、そしてCRDの空間配置に存する。MBL経路の概説に関しては、Gadjeva, M.ら, Curr. Opin. Immunol. 13:74-78, 2001を参照されたい。

【0008】

いくつかのグループが、マクロファージおよびDCに特有の、いくつかの新規C型レクチンを同定してきており、これらは例えば、ネズミ・マクロファージ限定C型レクチン(mMCL)(Balch, S.ら, J. Biol. Chem. 273:18656-64, 1998);ランゲルハンス細胞特異的C型レクチン、ランゲリン(Valleadeau, J., Immunity 12:71-81, 2000);ネズミ腹腔マクロファージにおけるNF-IL6の転写標的である、マクロファージ誘導性C型レクチン、ミンクル(Matsumoto, M.ら, J. Immunol. 163:5039-48, 1999);ヒト樹状細胞免疫受容体で、マクロファージレクチンおよび肝アジア糖タンパク質受容体に相同性を持つ、II型糖タンパク質であるDCIR(Bates, E.ら, J. Immunol. 163:1973-83, 1999およびUSPN 6,277,959);並びに、T細胞同時刺激シグナルを搬送するのに関与すると考えられる、ネズミ・デクチン-1およびデクチン-2(DC関連C型レクチン;それぞれ、Ariizumi, K.ら, J. Biol. Chem., 275:20157-167, 2000およびAriizumi, K.ら, J. Biol. Chem., 275:11957-963, 2000)である。

10

20

30

40

50

【0009】

現在まで、APCおよび特にDC生物学におけるC型レクチンの役割は、完全には理解されていない。例えば、C型レクチンは、APC/DC活性化、分化、成熟、遊走、抗原捕捉、抗原プロセッシングおよび提示とともに、T細胞、B細胞および免疫系の他の細胞との相互作用に役割を果たす可能性がある。APC/DC生物学のこれらの側面を操作すると、炎症、腫瘍学、自己免疫、感染性疾患、移植、アジュバントおよびワクチンの分野で有用である可能性がある。本発明はこうした課題に取り組む。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の概要

本発明は、APCにおいて発現される、新規C型レクチンファミリーメンバーの発見に基づき、そして1つの特定の態様において、LPSでの刺激に反応して、DC上で上方制御されるC型レクチンの発見に基づく。

【0011】

別の側面において、本発明は、本明細書において、樹状細胞C型レクチン(DCL)と称する、ネズミ樹状細胞と会合する、新規哺乳動物C型レクチンポリペプチドを提供する。すなわち、DCL1(配列番号2)、DCL2(配列番号6)、DCL3(配列番号12)およびDCL4(配列番号22)とともに、スプライシング変異体svDCL2(配列番号10)、svDCL3(配列番号16)およびsvDCL4(配列番号22)、並びに本明細書においてDCL5(配列番号24)と称するヒト相同体(homologue)である。本発明は、DCLポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびDCLポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。本発明はさらに、DCLポリペプチドを単離する方法、および該組換え発現ベクターでトランスフェクションした宿主細胞を、C型レクチンポリペプチドを発現するのに適した条件下で培養し、そして発現されたレクチンポリペプチドを回収することによって、組換えDCLポリペプチドを産生する方法をさらに提供する。

【0012】

本発明は：

- (a) 配列番号2、6、10、12、16、18、22または24のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号2のアミノ酸1~245および配列番号2のアミノ酸77~245からなる群より選択されるアミノ酸配列；
- (c) 少なくとも1つのDCL活性を有する、細胞外ドメインのすべてまたは一部を含んでなる、配列番号2のアミノ酸配列；
- (d) 少なくとも1つのDCL活性を有する、少なくとも25の隣接するアミノ酸を含ん

でなる、(a) ~ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；

(e) C型レクチンドメインを有する、少なくとも25の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ~ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；

(f) 免疫受容体チロシン依存性阻害性様モチーフ (ITIM) アミノ酸配列を有する、少なくとも25の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ~ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；

(g) 免疫原性である、少なくとも25の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a) ~ (c) いずれかのアミノ酸配列の断片；

(h) 少なくとも25のアミノ酸を含んでなり、そして(a) ~ (g) いずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有し、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、少なくとも99%、および少なくとも99.5%からなる群より選択され、少なくとも1つのDC L活性を有する、アミノ酸配列；および

(i) 少なくとも20のアミノ酸を含んでなり、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端一部切除 (truncation)、およびN末端一部切除からなる群より選択される、少なくとも1つの修飾を有し、少なくとも1つのDC L活性を有する、アミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、該アミノ酸配列から本質的になる、またはより好ましくは該アミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチドを提供する。

【0013】

本発明の他の側面は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸であり、好ましい態様は：

(a) 配列番号1、5、9、11、15、17、21および23；並びに

(b) (a) の対立遺伝子変異体

からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなる、またはより好ましくは該ヌクレオチド配列を含んでなる、単離核酸である。

【0014】

本発明はまた、本発明の核酸に対応する、単離ゲノム核酸も提供する。

本発明の他の側面は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸、および中程度のストリンジェンシーの条件下で、本発明のポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズする、好ましくは長さ少なくとも15の隣接するヌクレオチドを有する、単離核酸である。本発明の好ましい態様において、こうした核酸は、C型レクチンポリペプチド活性を有するポリペプチドをコードするか、または本発明の核酸のヌクレオチド配列とヌクレオチド配列同一性を共有し、ヌクレオチド配列同一性パーセントが：少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、少なくとも99%、および少なくとも99.5%からなる群より選択される、ヌクレオチド配列を含んでなる。

【0015】

本発明にさらに提供するのとは、本発明の少なくとも1つの核酸を含んでなる、発現ベクターおよび組換え宿主細胞であり、そして好ましい組換え宿主細胞は、前記核酸が宿主細胞ゲノムに組み込まれているものである。

【0016】

やはり提供するのとは、本発明の核酸にコードされるポリペプチドを産生するための方法であって、前記ポリペプチドの発現を促進する条件下で、組換え宿主細胞を培養することを含んでなり、該組換え宿主細胞が、本発明の少なくとも1つの核酸を含んでなる、前記方法である。本発明の別の側面において、前記方法によって産生されるポリペプチドを提供する。

【0017】

さらに、本発明の範囲内には、DC Lポリペプチド、またはDC Lポリペプチドを発現する細胞を精製するかまたは分離する方法がある。こうした方法には、固相マトリックスに

少なくとも1つの結合パートナーを結合させ、そしてDCLポリペプチド(類)を含有する混合物またはDLCポリペプチド(類)を発現する細胞の混合物を、DCLポリペプチド(類)が結合するものに接触させ、そしてその後、接触表面および溶液を分離することが含まれる。

【0018】

本発明のさらなる側面には、以下にさらに詳細に記載するような、本発明のポリペプチドに結合する単離抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体等が含まれる。さらなる態様には、前記ポリペプチドのDCL活性をアゴナイズする、こうした抗体が含まれる。さらなる態様には、天然リガンド(類)へのDCLポリペプチドの結合を阻害する(アンタゴナイズする)、こうした抗体が含まれる。

10

【0019】

本発明はさらに、DCLポリペプチドの阻害剤を設計する方法であって、こうしたポリペプチドいずれかの三次元構造を決定し、基質の結合部位でありそうな部位の三次元構造を解析し、予測される反応性部位を組み込む分子を合成し、そして該分子のポリペプチド阻害活性を決定する工程を含んでなる、前記方法を提供する。

【0020】

本発明のさらなる側面において、DCLポリペプチド活性を改変する化合物を同定する方法であって

(a) 本発明のポリペプチドと試験化合物を混合し；そして

(b) 試験化合物が、前記ポリペプチドのDCLポリペプチド活性を改変するかどうかを決定する

20

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

【0021】

本発明の別の側面において、DCLポリペプチドの結合活性を阻害する化合物を同定する方法であって

(a) 本発明のポリペプチドおよび前記ポリペプチドの結合パートナーと試験化合物を混合し；そして

(b) 試験化合物が、前記ポリペプチドの結合活性を阻害するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

【0022】

30

別の態様において、結合パートナーは、抗原であることが可能であり、また、オリゴ糖、多糖、炭水化物、糖タンパク質、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ糖脂質等であることが可能な天然リガンドであり；該天然リガンドは、細菌、ウイルス、真菌または原生動物ポリペプチドとともに細胞膜会合ポリペプチドからなる群より選択可能である。あるいは、結合パートナーは、DCL活性に対してアゴニスト性またはアンタゴニスト性いずれかの抗体を含んでなることが可能である。また、結合パートナーは、DCL天然リガンドの断片、誘導体、融合タンパク質またはペプチド擬似体(peptidomimetic)を含んでなることが可能である。

【0023】

本発明はまた、DCLポリペプチド活性を増加させる方法であって、本発明のポリペプチドおよび前記ポリペプチドのアゴニストからなる群より選択される、少なくとも1つの化合物を提供することを含んでなる、前記方法も提供する。該方法のさらなる態様は、本発明の少なくとも1つのポリペプチドを投与することによって、患者において、前記活性を増加させることをさらに含んでなる。アゴニストは、抗体、単離DCLポリペプチド(類)またはその断片(類)、DCLペプチド(類)および/またはペプチド擬似体(類)を含んでなることが可能である。

40

【0024】

DCLポリペプチド活性には、限定されるわけではないが、抗原結合、抗原インターナリゼーション、抗原プロセッシングおよび抗原提示；抗原提示細胞(APC)活性化、APC分化、APC成熟、APCホーミングおよびAPC遊出(transmigration

50

）；結合、および興奮性の方式または阻害性の方式いずれかでの細胞内シグナル伝達経路の調節を含む、細胞間相互作用；自己分泌、傍分泌および／または内分泌様式で作用する、可溶性因子の分泌を通じた細胞外コミュニケーション；C型レクチン活性；炭水化物認識ドメイン活性；アスパルチルプロテアーゼ活性および免疫受容体チロシン依存性阻害性様モチーフ（ITIM）活性が含まれる。DCLポリペプチドを発現しているAPCに結合可能な細胞の例には免疫系の細胞が含まれ、T細胞、B細胞、NK細胞とともにその前駆細胞が含まれる。

【0025】

本発明にさらに提供されるのは、すぐ上に記載するような活性を1以上減少させる方法であって、本発明のポリペプチドの少なくとも1つのアンタゴニストを提供することを含んでなる、前記方法であり；該方法の好ましい態様は、本発明のポリペプチドの少なくとも1つのアンタゴニストを投与することによって、患者において、前記活性を減少させることを含んでなり、そしてさらに好ましい態様において、アンタゴニストは、前記ポリペプチドいずれかの活性を阻害する、抗体、単離DCLポリペプチドまたはその断片、DCLペプチドおよび／またはペプチド擬似体である。

10

【0026】

他の側面において、本発明は、DCL組成物を利用して、DCL活性および／またはDCL関連細胞事象の潜在的なアゴニストおよび／またはアンタゴニストに関してスクリーニングするアッセイを提供する。さらに、そのアンタゴニストおよび／またはアゴニストの合理的設計において、DCLポリペプチド、ポリヌクレオチド、断片、変異体、突然変異タンパク質（mut_ein）、融合タンパク質、抗体、結合タンパク質等を用いる方法もまた、本発明の側面である。

20

【0027】

本発明はさらに、自己免疫障害、炎症、癌、移植関連状態、および感染性疾患を治療する方法であって、本発明のポリペプチド、並びに前記ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストからなる群より選択される、少なくとも1つの化合物を投与することを含んでなる、前記方法を提供する。

【0028】

発明の詳細な説明

本発明は、哺乳動物細胞、および特にDC細胞系譜の抗原提示細胞に関連するカルシウム依存性（C型）レクチンファミリーの新規メンバーを同定し、単離し、そして性質決定することに関する。本発明は、ネズミ樹状細胞上に発現され、本明細書において、DCL1、DCL2、DCL3およびDCL4と称する、C型レクチンドメインを有する新規ポリペプチドとともに、スプライシング変異体svDCL2、svDCL3およびsvDCL4、並びに本明細書においてDCL5と称するヒト相同体を提供する。便宜上、DCL1、DCL2、DCL3、DCL4およびDCL5（それとともにスプライシング変異体および相同体）を、しばしば、集合的にDCLポリペプチドと称する。用語DCLを用いる場合、DCL1、2、3、4および／または5とともに、スプライシング変異体svDCL2、svDCL3およびsvDCL4の1以上を、単独でまたはいずれかの組み合わせで意味すると理解される。

30

40

【0029】

本発明は、DCLポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびDCLポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。本発明はさらに、DCLポリペプチドを単離する方法、および組換え発現ベクターでトランスフェクションまたは形質転換した宿主細胞を、本発明のポリペプチドを発現するのに適した条件下で培養し、そして発現されたポリペプチドを回収することによって、組換えDCLポリペプチドを産生する方法を提供する。

【0030】

本発明は、記載する特定の方法論、プロトコル、細胞株、動物種または属、構築物、および試薬には限定されないと理解されるものとし、これは、こうしたものが多様でありうる

50

ためである。また、本明細書において用いる専門用語は、特定の態様を記載する目的のものであり、そして本発明の範囲を限定することは意図されず、本発明の範囲は、付随する請求項によってのみ限定されるであろう。

【0031】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すのに用いる分子（例えば核酸、プラスミド、またはウイルス）いずれかを指すのに用いられる。用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適したベクターを指し、そして挿入された異種核酸配列の発現を指示し、そして／または調節する核酸配列を含有する。発現には、限定されるわけではないが、転写、翻訳、およびイントロンが存在するならばRNAスプライシングなどのプロセスが含まれる。

10

【0032】

用語「機能可能であるように連結された」は、本明細書において、フランキング配列の配置を指し、こうして記載するフランキング配列は、その通常の機能を行うように構成されるかまたは組み立てられている。したがって、コード配列に機能可能であるように連結されたフランキング配列は、コード配列の複製、転写および／または翻訳を達成可能である可能性がある。例えば、プロモーターがコード配列の転写を指示可能である場合、コード配列はプロモーター配列に機能可能であるように連結されている。フランキング配列は、正しく機能する限り、コード配列に隣接している必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが転写される介在配列が、プロモーター配列およびコード配列の間に存在することが可能であり、そしてプロモーター配列はなお、コード配列に「機能可能であるように連結された」とみなされる。

20

【0033】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されているか、または核酸配列で形質転換されることが可能であり、そしてその後、選択した目的の遺伝子を発現することが可能である細胞を指すように用いられる。該用語には、親細胞の子孫が含まれ、子孫は、選択した遺伝子が存在する限り、元来の親に対して、形態または遺伝子構成が同一であってもなくても、この用語に含まれる。

【0034】

用語「DCLポリペプチド断片」は、配列番号2、6、10、12、16、18、22および24いずれかに示すようなポリペプチドのアミノ末端での一部切除（リーダー配列を含むかまたは含まない）、および／またはカルボキシル末端での一部切除を含んでなるポリペプチドを指す。用語「DCLポリペプチド断片」はまた、DCLポリペプチドオルソログ（ortholog）、DCLポリペプチド誘導体、またはDCLポリペプチド変異体のアミノ末端および／またはカルボキシル末端一部切除体も指し、あるいはDCLポリペプチド対立遺伝子変異体またはDCLポリペプチドスプライシング変異体にコードされるポリペプチドのアミノ末端および／またはカルボキシル末端一部切除体も指す。DCLポリペプチド断片は、選択的RNAスプライシングから、またはin vivoプロテアーゼ活性から生じる可能性もある。DCLポリペプチドの膜結合型もまた、本発明に意図される。好ましい態様において、一部切除および／または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100アミノ酸より多いアミノ酸を含んでなる。こうして産生したポリペプチド断片は、約25の隣接アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含んでなるであろう。こうしたDCLポリペプチド断片は、場合によって、アミノ末端メチオニン残基を含んでなることが可能である。こうした断片を用いて、例えばDCLポリペプチドに対する抗体を生成可能であると認識されるであろう。

30

40

【0035】

用語「DCLポリペプチドオルソログ」は、配列番号2または配列番号5いずれかに示すようなDCLポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドを指す。例えば、マウスおよびヒトDCLポリペプチドは、互いにオルソログとみなされる。

50

【0036】

用語「DCLポリペプチド変異体」は、配列番号2または配列番号5いずれかに示すDCLポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を含むかまたは含まない）に比較した際、少なくとも1つのアミノ酸配列置換、欠失（内部欠失および/またはDCLポリペプチド断片など）、および/または付加（内部付加および/またはDCL融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含んでなるDCLポリペプチドを指す。変異体は、天然存在（例えば、DCLポリペプチド対立遺伝子変異体、DCLポリペプチドオルソログ、およびDCLポリペプチドスプライシング変異体）であることが可能であるし、または人工的に構築可能である。こうしたDCLポリペプチド変異体は、配列番号1または配列番号4いずれかに示すようなDNA配列にしたがって、多様であるDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製可能である。好ましい態様において、変異体は、1～3、または1～5、または1～10、または1～15、または1～20、または1～25、または1～50、または1～75、または1～100、または100アミノ酸より多いアミノ酸の置換、挿入、付加および/または欠失を有し、ここで、置換は保存的、または非保存的、あるいはその組み合わせいずれかであることが可能である。

10

【0037】

用語「DCLポリペプチド変異体」は、DCL1（配列番号2）、DCL2（配列番号6）、DCL3（配列番号12）およびDCL4（配列番号22）とともにスプライシング変異体svDCL2（配列番号10）、svDCL3（配列番号16）およびsvDCL4（配列番号22）、並びに本明細書においてDCL5（配列番号24）と称するヒト相同体いずれかに示すようなポリペプチド；DCLポリペプチド断片；DCLポリペプチドオルソログ；または本明細書に定義されるように、化学的に修飾されているDCLポリペプチド変異体を指す。用語「DCLポリペプチド変異体」はまた、本明細書に定義するように、化学的に修飾されている、DCLポリペプチド対立遺伝子変異体またはDCLポリペプチドスプライシング変異体にコードされるポリペプチドも指す。

20

【0038】

用語「成熟DCLポリペプチド」は、リーダー配列を欠くDCLポリペプチドを指す。成熟DCLポリペプチドはまた、アミノ末端（リーダー配列を含むかまたは含まない）および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解プロセッシング、より大きい前駆体からのより小さいポリペプチドの切断、N連結および/またはO連結グリコシル化等の他の修飾もまた含むことが可能である。典型的な成熟DCLポリペプチドは、DCL1（配列番号2）、DCL2（配列番号6）、DCL3（配列番号12）およびDCL4（配列番号22）とともにスプライシング変異体svDCL2（配列番号10）、svDCL3（配列番号16）およびsvDCL4（配列番号22）、並びに本明細書においてDCL5（配列番号24）と称するヒト相同体のアミノ酸配列に示される。

30

【0039】

用語「DCL融合ポリペプチド」は、DCL1（配列番号2）、DCL2（配列番号6）、DCL3（配列番号12）およびDCL4（配列番号22）とともにスプライシング変異体svDCL2（配列番号10）、svDCL3（配列番号16）およびsvDCL4（配列番号22）、並びに本明細書においてDCL5（配列番号24）と称するヒト相同体に示すようなポリペプチド、本明細書に定義するような、DCLポリペプチド断片、DCLポリペプチドオルソログ、DCLポリペプチド変異体、またはDCL誘導体のアミノ末端またはカルボキシル末端への、1以上のアミノ酸（異種タンパク質またはペプチドなど）の融合を指す。用語「DCL融合ポリペプチド」はまた、本明細書に定義するような、DCLポリペプチド対立遺伝子変異体またはDCLポリペプチドスプライシング変異体にコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端への1以上のアミノ酸の融合も指す。

40

【0040】

用語「生物学的に活性であるDCLポリペプチド」は、DCL1（配列番号2）、DCL2（配列番号6）、DCL3（配列番号12）、DCL4（配列番号22）およびDCL

50

5 (配列番号24)とともにスプライシング変異体 s v D C L 2 (配列番号10)、s v D C L 3 (配列番号16)およびs v D C L 4 (配列番号22)のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに特徴的な、少なくとも1つのD C L 活性を有するD C L ポリペプチドを指す。D C L 活性の例には、限定されるわけではないが、抗原結合、抗原インターナリゼーション、抗原プロセッシングおよび抗原提示；抗原提示細胞 (A P C) 活性化、A P C 分化、A P C 成熟、A P C ホーミングおよびA P C 遊出；結合、および興奮性の方式または阻害性の方式いずれかでの細胞内シグナル伝達経路の調節を含む、細胞間相互作用；自己分泌、傍分泌および/または内分泌様式で作用する、可溶性因子の分泌を通じた細胞外コミュニケーション；C型レクチン活性；炭水化物認識ドメイン活性；アスパルチルプロテアーゼ活性および免疫受容体チロシン依存性阻害性様モチーフ (I T I M) 活性が含まれる。D C L ポリペプチドを発現しているA P Cに結合可能な細胞の例には免疫系の細胞が含まれ、T細胞、B細胞、NK細胞とともにその前駆細胞が含まれる。

10

【0041】

さらに、D C L ポリペプチドは、免疫原として活性である可能性があり；すなわち、D C L ポリペプチドは、それに対して抗体を作製可能な、少なくとも1つのエピトープを含有する。

【0042】

用語「天然存在」または「天然」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞等の生物学的材料との関連で用いた場合、天然に見られ、そして人に操作されていない材料を指す。同様に「非天然存在」または「非天然」は、本明細書において、天然には見られないか、あるいは人によって構造的に修飾されているかまたは合成されている材料を指す。

20

【0043】

用語「形質転換」は、本明細書において、細胞の遺伝的特性の変化を指し、そして細胞が新規D N Aを含有するように修飾されている場合、該細胞は形質転換されている。例えば、細胞が天然状態から遺伝的に修飾されている場合、該細胞は形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入後、形質転換D N Aは、細胞の染色体に物理的に組み込まれることによって細胞のD N Aと組換え可能であるし、複製されることなくエピソーム要素として一過性に維持されることが可能であるし、またはプラスミドとして独立に複製されることが可能である。D N Aが細胞の分裂とともに複製される場合、細胞は安定に形質転換されているとみなされる。

30

【0044】

「ペプチボディ」は、F cドメインおよび少なくとも1つのペプチドを含んでなる分子を指す。こうしたペプチボディは、その多量体または二量体または断片であることが可能であり、そしてこれらを誘導体化することが可能である。ペプチボディは、W O 00/24782およびW O 01/83525にはるかに詳細に記載され、該文献は、本明細書に完全に援用される。ペプチドは、D C L 1 (配列番号2)、D C L 2 (配列番号6)、D C L 3 (配列番号12)およびD C L 4 (配列番号22)とともにスプライシング変異体 s v D C L 2 (配列番号10)、s v D C L 3 (配列番号16)およびs v D C L 4 (配列番号22)、並びに本明細書においてD C L 5 (配列番号24)と称するヒト相同体のアミノ酸配列に由来することが可能である。

40

【0045】

「ペプチド」は、本明細書において、1~40アミノ酸の分子を指す。別の態様は、5~20アミノ酸の分子を含んでなる。典型的なペプチドは、天然存在分子の細胞外ドメインの一部を含んでなるか、またはD C L 1 (配列番号2)、D C L 2 (配列番号6)、D C L 3 (配列番号12)およびD C L 4 (配列番号22)とともにスプライシング変異体 s v D C L 2 (配列番号10)、s v D C L 3 (配列番号16)およびs v D C L 4 (配列番号22)、並びに本明細書においてD C L 5 (配列番号24)と称するヒト相同体のランダム化配列を含んでなることが可能である。

【0046】

ペプチド配列を指すのに用いられるような用語「ランダム化」は、完全にランダムな配列

50

(例えばファージディスプレイ法またはRNA-ペプチドスクリーニングによって選択されるもの)および天然存在分子の1以上の残基が、天然存在分子のその位で現れないアミノ酸残基と交換されている配列を指す。ペプチド配列を同定する典型的な方法には、ファージディスプレイ、大腸菌(E. coli)ディスプレイ、リボソームディスプレイ、RNA-ペプチドスクリーニング、化学薬品スクリーニング等が含まれる。

【0047】

用語「Fcドメイン」は、天然FcおよびFc変異体分子および以下に定義するような配列を含む。Fc変異体および天然Fcと同様、用語「Fcドメイン」には、全抗体から消化されるか、または他の手段によって産生されるかいずれかの、単量体型または多量体型の分子が含まれる。

10

【0048】

用語「天然Fc」は、単量体型または多量体型いずれかの、全抗体の消化から生じる非抗原結合断片の配列を含んでなる分子または配列を指す。天然Fcの元来の免疫グロブリン供給源は、好ましくはヒト起源であり、そして免疫グロブリンのいずれであることも可能であるが、IgG1およびIgG2が好ましい。天然Fcは、共有結合(すなわちジスルフィド結合)および非共有結合によって、二量体型または多量体型に連結可能な、単量体ポリペプチドで構成される。天然Fc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス(例えばIgG、IgA、IgE)またはサブクラス(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgA2)に応じて、1~4の範囲である。天然Fcの一例は、IgGのパパイン消化から生じるジスルフィド結合二量体である(Elisonら(1982), Nucleic Acid Res. 10:4071-9を参照されたい)。用語「天然Fc」は、本明細書において、単量体型、二量体型、および多量体型の総称である。

20

【0049】

用語「Fc変異体」は、天然Fcから修飾されているが、なお、サルベージ受容体FcRnの結合部位を含んでなる分子または配列を指す。国際出願WO 97/34631(1997年9月25日公開)およびWO 96/32478は、典型的なFc変異体とともに、サルベージ受容体との相互作用を記載し、そして本明細書に完全に援用される。したがって、用語「Fc変異体」は、非ヒト天然Fcからヒト化させた分子または配列を含んでなる。さらに、天然Fcは、本発明の融合分子に必要なでない構造的特徴または生物学的活性を提供するため、除去可能である部位を含んでなる。したがって、用語「Fc変異体」は、(1)ジスルフィド結合形成、(2)選択した宿主細胞との不適合性、(3)選択した宿主細胞における発現に際してのN末端不均一性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、または(7)抗体依存性細胞傷害性(ADCC)に影響を及ぼすか、またはこれらに関与する、1以上の天然Fc部位または残基を欠く、分子または配列を含んでなる。Fc変異体を以下にさらに詳細に記載する。

30

【0050】

「ペプチド擬似体」は、a)代謝安定性、b)優れた生物学的利用能、c)高い受容体親和性および受容体選択性、並びにd)最少の副作用などの、プロトタイプ天然ペプチドより好ましい薬理学的特性を示すペプチド類似体である。ペプチド擬似体の設計およびペプチド擬似体の産生法が当該技術分野に知られる(例えばU.S.P.N. 6,407,059および6,420,118を参照されたい)。ペプチド擬似体は、DCL1~5の細胞外ドメインの結合部位、並びにスプライシング変異体svDCL2、svDCL3およびsvDCL4由来であることが可能である。別の態様において、ペプチド擬似体は、DCL1~5、並びにスプライシング変異体svDCL2、svDCL3およびsvDCL4由来のペプチドと同一の三次元構造を有する非ペプチド化合物、あるいは上に列挙する分子由来のペプチドの一部が、同一の三次元構造を有する非ペプチド部分と交換されている化合物を含んでなる。

40

【0051】

50

「ミモトープ」は、本明細書において、タンパク質上の結合部位を模倣するペプチド配列と定義される (Partidos, CDら, Combinatorial Chem & High Throughput Screening, 2002 5:15-27を参照されたい)。ミモトープは、タンパク質のコンホメーションに依存する結合部位を模倣する能力を有することが可能である。これらのミモトープの配列は、連続する直鎖天然配列を同定しないか、または必ずしも天然存在タンパク質で生じない。ミモトープおよび産生法は、U.S.P.N.5,877,155およびU.S.P.N.5,998,577に解説され、これらは本明細書に完全に援用される。

【0052】

用語「酸性残基」は、酸性基を含んでなる側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な酸性残基にはDおよびEが含まれる。 10

用語「アミド残基」は、酸性基のアミド誘導体を含んでなる側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な残基にはNおよびQが含まれる。

【0053】

用語「芳香族残基」は、芳香族基を含んでなる側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な芳香族残基にはF、Y、およびWが含まれる。

用語「塩基性残基」は、塩基性基を含んでなる側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な塩基性残基にはH、K、およびRが含まれる。

【0054】

用語「親水性残基」は、極性基を含んでなる側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な親水性残基にはC、S、T、N、およびQが含まれる。 20

用語「非官能性残基」は、酸性基、塩基性基、または芳香族基を欠く側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な非官能性アミノ酸残基にはM、G、A、V、I、Lおよびノルロイシン(Nle)が含まれる。

【0055】

用語「中性疎水性残基」は、塩基性基、酸性基、または極性基を欠く側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な中性疎水性アミノ酸残基にはA、V、L、I、P、W、M、およびFが含まれる。

【0056】

用語「極性疎水性残基」は、極性基を含んでなる側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な極性疎水性アミノ酸残基にはT、G、S、Y、C、Q、およびNが含まれる。 30

【0057】

用語「疎水性残基」には、塩基性基または酸性基を欠く側鎖を有するD型またはL型のアミノ酸残基を指す。典型的な疎水性アミノ酸残基にはA、V、L、I、P、W、M、F、T、G、S、Y、C、Q、およびNが含まれる。

【0058】

用語「被験者」は、本明細書において、哺乳動物を指す。例えば、本発明に意図される哺乳動物には、ヒト；霊長類；イヌ、ネコなどのすべての種類のペット；ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、ウマ等の家畜動物；マウス、ラット、ウサギ、モルモットなどの一般的な実験動物；それとともに、動物園におけるような捕獲された動物または自由な野生動物が含まれる。本明細書全体を通じて、用語、宿主は、被験者と交換可能に用いられる。 40

【0059】

本明細書において、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに単数形を指示しない限り、複数の対象を含む。したがって例えば、「免疫(an immunization)」には、複数のこうした免疫が含まれ、そして「細胞(the cell)」への言及には、1以上の細胞および当業者に知られるその同等物への言及が含まれるなどである。本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、明らかに異なって示されない限り、本発明が属する当該技術分野の一般的な当業者に、一般的に理解されるのと同じの意味を有する。

【0060】

本明細書において、樹状細胞またはDCは、リンパ組織または非リンパ組織に見られる、表現型的に、そして/または形態学的に類似の細胞種の多様な集団のメンバーいずれかを指す。DCは、一種の「プロフェッショナル」抗原提示細胞であり、そしてMHC拘束T細胞を感作する高い能力を有する。細胞系譜および成熟段階に応じて、DCは、機能、または表現型、特に細胞表面表現型によって、認識可能である。これらの細胞は、独特の形態、食作用能/エンドサイトーシス能、高レベルの表面MHCクラスII発現およびT細胞、特に未刺激T細胞に抗原を提示する能力によって特徴付けられる(Banchereauら, Annu. Rev. Immunol., 18:767-811, 2000およびUSPN 6,274,378、前記文献は、こうした細胞の説明に関して、本明細書に援用される)。例示目的のための、本明細書に記載するDCは、ペール様の突起、および細胞表面マーカーCD1a⁺、CD4⁺、CD86⁺、またはHLA-DR⁺の発現によって特徴付け可能である。成熟DCは、典型的にはCD11c⁺であり、一方、DCの前駆体には、表現型CD11c⁻、IL-3Rα^{low}を有するもの；およびCD11c⁻IL-3Rα^{high}であるものが含まれる。in vivoで、GM-CSFで処理すると、CD11b^{high}、CD11c^{high} DCが優先的に拡大され、一方、Flt-3リガンドは、CD11c⁺IL-3Rα^{low} DCおよびCD11c⁻IL-3Rα^{high}

10

DC前駆細胞を拡大することが示されている。本発明のC型レクチンを発現するDCは、リンパ系系譜および/または骨髄系系譜の未成熟または成熟樹状細胞であることが可能である。機能的には、抗原提示の決定に関する、いかなる好適なアッセイによって、樹状細胞を同定することも可能である。こうしたアッセイには、試験抗原の提示によって、その後、T細胞増殖の決定、IL-2の放出などによって、抗原でプライミングされたT細胞または未刺激T細胞を刺激する能力を試験することが含まれる可能性がある。

20

【0061】

C型レクチンは、本明細書において、炭水化物部分に対する親和性および炭水化物部分に結合する能力とともに、本明細書において「C型レクチン活性」と称する、当該技術分野に周知の他の特質を有するCa⁺⁺依存性結合タンパク質のいずれかを指す。Weiss, W.I., Immunol. Rev., 163:19-34, 1998およびFeizi, T., Immunol. Rev., 173:79-88, 2000に概説されるように、C型レクチンにはまた、コレクチン、セレクチンおよび免疫系のC型レクチンスーパーファミリーも含まれる。

30

【0062】

細菌抗原および炎症誘発性サイトカインなどの外部刺激に反応して、DC中で上方制御される遺伝子を同定すると、多様な種類の刺激に、免疫系がどのように反応するか解明するのに役立つ可能性がある。一般的に言って、DCは、それぞれ、病原体、内因性炎症シグナルまたはT細胞フィードバックシグナルに相当する、細菌リポ多糖(LPS)およびCpG DNA、TNF-αまたはCD40リガンドに反応して成熟する。細菌抗原にin vitroで、またはin vivoで曝露された後、DCは、2つのシグナル伝達経路の1つによって：DC生存を可能にするERKキナーゼ経路を介して、または最終的に高いT細胞刺激能およびIL-12放出を生じる、同時刺激分子およびMHCクラスII分子の発現増加、ケモカインの放出および遊走によって特徴付けられる、NF-κBシグナル伝達経路を介して、成熟を経験する。細菌LPSは、自然免疫系に認識される主要な分子の1つである(Verhasselt, H.ら, J. Immunol. 158:2919-25, 1997)。LPS複合体および可溶性LPS結合タンパク質による膜会合CD14の連結によって、TNF分泌およびIL-1分泌などの炎症誘発性シグナルが導かれ、これが局所APCの代謝回転とともに、組織損傷部位での前駆細胞の補充を増加させる。また、トール様受容体2(TLR2)は、LPS結合タンパク質に依存し、そしてCD14に増進される反応において、LPSに活性化されるシグナル伝達受容体であることが示されてきている(Yang, R.B.ら, Nature 395:284-88, 1998)。トール様受容体4(TLR4)は、LPS反応において、

40

50

細胞内シグナル伝達を行い、NF- κ B活性化を導き、そしてTLR4欠損マウスは、LPSに反応低下性である(Brightbill, H.D.ら, Science 285:732-36, 1999)。さらに、TLR2は、ペプチドグリカンおよびリポテイコ酸などの、グラム陽性菌の構成要素によって誘発される反応を仲介するが、TLR4はこうした反応を仲介しない(Yoshimura, A.ら, J. Immunol. 163:1-5, 1999; Schwander, R.ら, J. Biol. Chem. 274:17406-9, 1999)。他のトール様受容体には、細菌フラジェリンを認識し、そして該フラジェリンによって活性化されるトール様受容体5(TLR5)(Hayashi, F.ら, Nature 408:740-745, 2000)、および低メチル化CpG DNAモチーフを認識し、そして該モチーフによって活性化されるトール様受容体9(TLR9)(Hemmi, H.ら, Nature 410:1099-1103, 2001)が含まれる。

10

【0063】

異なる抗原性刺激が、免疫系全体に影響を及ぼす可能性がある、DC生物学に著しい影響を有する。一般的に言って、IL-12産生骨髄性DCは、Th1反応をプライミングし、一方、インターフェロン α および/または β を産生するリンパ系DCは、Th2反応をプライミングし、これは、活性化T細胞に産生されるIL-4によって駆動される(Kalinsky, P.ら, Immunol Today 20:561-67, 1999)。骨髄系DCは、細菌、ウイルスおよびマイコプラズマなどの病原体に反応してIL-12を産生するが、TNF- α 、IL-1、コレラ毒素またはFasLなどの他の成熟刺激に反応してIL-12を産生することはできない。IL-12産生は、活性化された記憶T細胞上に高レベルで発現されるCD40Lによって、強力に誘導されることが可能である(Cella, M., J. Exp. Med. 184:747-52, 1996)。しかし、LPSでの全身性刺激は、IL-12産生の停滞を導く(Reis Sousa, C.ら, Immunity 11:637-47, 1999)。さらに、DC成熟の誘導中に、末梢組織に存在する多様なサイトカインもまた、IL-12産生を調節する可能性がある。例えば、IFN- γ およびIL-4は、LPSまたはCD40Lに誘導されるIL-12産生を増進するが、一方、IL-10は抑制性の効果を有し、そしてTGF- β もまた、LPSに対する反応を阻害するが、CD40Lに対する反応を増大させることが示されてきている。

20

30

【0064】

DC生物学に対する、LPSなどの抗原性刺激の影響を決定すると、抗原結合および取り込み、抗原プロセッシングおよび提示、抗原提示細胞の活性化、分化、成熟、ホーミングおよび遊出とともに、T細胞およびB細胞などの、免疫系の多様な細胞との細胞間相互作用を理解する手がかりが提供される可能性がある。この目的に向けて、ネズミDC集団を、LPSおよびIFN- α などの多様な剤で処理して、これらの剤に反応した、DC関連遺伝子の示差的発現を決定した。この種の解析を通じて、とりわけC型レクチンドメインを有するポリペプチドをコードする、樹状細胞C型レクチン1~4(DCL1~4)と称される4つの新規ネズミ遺伝子とともに、そのスプライシング変異体を発見した。さらに、DCL1~4ポリペプチドの新規ヒト相同体を発見しており、そしてこれを、DCL5と称する(DCL1(配列番号2)、DCL2(配列番号6)、DCL3(配列番号12)およびDCL4(配列番号22)とともにスプライシング変異体svDCL2(配列番号10)、svDCL3(配列番号16)およびsvDCL4(配列番号22)、並びに本明細書においてDCL5(配列番号24)と称するヒト相同体)。

40

【0065】

骨髄(BM)細胞をC57BL/10マウスから単離し、そして本質的に実施例1に記載するような条件下で培養した。BM細胞をFlt3リガンド中で9日間培養した。以下の刺激/条件で、培養を4日間刺激した:(a)10ng/ml組換えネズミGM-CSF、1000U/mlヒト;(b)500U/ml IFN-アルファ/D(Genzyme、マサチューセッツ州ケンブリッジ);(c)1 μ g/ml大腸菌(0217:B8)

50

由来 L P S (D i f c o、ミシガン州デトロイト) および (d) 刺激なし。刺激への曝露 4 時間後、当該技術分野に周知の方法を用いて、細胞を溶解し、そして R N A を単離した。別個の組の実験において、D C 数を増加させるため、採取する前に、マウスを F l t - 3 リガンド、または P E G 化 G M - C S F で処理した。

【 0 0 6 6 】

標的 R N A の調製およびマイクロアレイチップへのハイブリダイゼーションは、本質的に、本明細書に援用される A f f y m e t r i x プロトコル (A f f y m e t r i x C o r p .、カリフォルニア州サンタクララ) に記載されるように行った。簡潔には、10 μ g の総 R N A をまず、S u p e r s c r i p t I I TM 逆転写酵素 (G i b c o B R L L i f e T e c h n o l o g i e s) およびバクテリオファージ T 7 R N A ポリメラーゼプロモーターをコードするプライマーを用いて、一本鎖 c D N A に変換して用いて、標的試料を調製した。その後、一本鎖 c D N A を二本鎖 c D N A に変換した。T 7 プロモーターを用いて、T 7 R N A ポリメラーゼおよびピオチン化ヌクレオチド三リン酸を含有する反応において、標識 c R N A 標的を生成した。精製後、平均の長さが 50 ~ 200 塩基であるように c R N A を化学的に断片化し、そして 45 ° で一晩、A f f y m e t r i x G e n e C h i p s TM にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後、A f f y m e t r i x 流体工学ステーション中でチップをプロセッシングし、該ステーションでチップを洗浄し、ストレプトアビジン・フィコエリトリン (S A P E) で染色し、ピオチン化ヤギ抗ストレプトアビジンで探査し (p r o b e d)、そして最後に、第二回の S A P E を行った。

10

20

【 0 0 6 7 】

D C L ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明は、ネズミ樹状細胞上に発現されるカルシウム依存性レクチンファミリーの新規ポリペプチド、本明細書に D C L 1、D C L 2、D C L 3 および D C L 4 と称するものとともにスプライシング変異体 s v D C L 2、s v D C L 3 および s v D C L 4、並びに本明細書において D C L 5 と称するヒト相同体を提供する。こうしたタンパク質は、混入する内因性材料を実質的に含まず、そして場合によって、会合する天然パターングリコシル化を持たない。本発明の範囲内の D C L ポリペプチドの誘導体にはまた、生物学的活性を保持する、一次タンパク質の多様な構造型が含まれる。イオン化可能なアミノ基およびカルボキシル基が存在するため、例えば、D C L タンパク質は、酸性塩または塩基性塩の形であることが可能であるし、あるいは中性型であることが可能である。個々のアミノ酸残基はまた、酸化または還元によっても修飾可能である。

30

【 0 0 6 8 】

遺伝子マイクロアレイ技術は、いくつかの異なる刺激条件下で得た、異なるマウス樹状細胞下位集団に渡る、示差的遺伝子発現を研究するツールを提供する。上述のように、L P S で刺激した D C 由来のハイブリダイゼーションシグナルを、I F N - α で刺激した D C 由来のシグナルとともに、G M - C S F で刺激した D C 由来のシグナルと比較した。L P S によって上方制御されるが、I F N - α または G M - C S F によっては改変されない、遺伝子発現を同定した。同定したシグナルに対応する遺伝子配列の解析を行った。同定した、こうした遺伝子の 1 つは、G e n B a n k 寄託番号 A A 3 8 9 9 7 7 および N C B I U n i g e n e エントリー M M 3 4 4 3 としての A f f y m e t r i x データに相当した。N C B I U n i g e n e サイトから、A A 3 8 9 9 7 7 を含む 9 つの G e n B a n k 寄託番号が、この同じ U n i g e n e エントリーに対応すると列挙された。これら 9 つのエントリー由来の配列を合わせ、そして B L A S T アルゴリズムを用いて、生じた「コンティグ」を公共のデータベースタンパク質配列に比較した。この比較から、コンティグは、「C 型レクチン」と特徴付けられる分子に相同性を持つ、推定上のタンパク質をコードすることが明らかになった。

40

【 0 0 6 9 】

組み立てた E S T コンティグをこれらの既知の C 型レクチンと比較すると、このアセンブリが不完全な (5 ' 端を欠く) 配列をコードすると予測されたため、この同じ E S T ア

50

センブリーを、C e l l e r aTM 所有データベース内に含有されるマウスゲノム配列との B L A S T 比較で用いて、ゲノム対応物を得た。C 型レクチンオープンリーディングフレームに対応する特定のコード領域に関して、候補マウスゲノム配列を検索すると、多数の遺伝子が、単一の巨大マウスゲノム断片 (4 0 0 , 0 0 0 b p を越える) 内に含有されることが明らかになった。さらなる解析によって、マウスには、9 以上の近縁の遺伝子があることが示され、これらには、以下の 4 つの新規配列が含まれた：D C L 1 (配列番号 1、および対応するアミノ酸配列は配列番号 2 に提供する)、D C L 2 (配列番号 5、および対応するアミノ酸配列は配列番号 6 に提供する)、D C L 3 (配列番号 1 1、および対応するアミノ酸配列は配列番号 1 2 に提供する) および D C L 4 (配列番号 1 7、および対応するアミノ酸配列は配列番号 1 8 に提供する)。互いに染色体上で近接し、そして高い 10 度合いの相同性を有することを考慮すると、これらの遺伝子は、遺伝子複製事象を通じて生じた可能性がある。

【 0 0 7 0 】

多数のファミリーメンバーの存在を予測するため、2 つの既知のファミリーメンバー、デクチン 2 (A r i i z u m i , K . ら、上記) および d c m p 1 とも称される D C I R (B a t e s , E . ら、上記) のアミノ酸配列を、G C G プログラム T F A S T A を用いて、ゲノムコンティグの 6 つのあり得る翻訳読み枠すべてで、比較することによって、D C L 1 および関連配列に対応する配列をコードすることが決定されたマウスゲノムコンティグを調べた。反復 T F A S T A 解析および出力の手動検査によって、多数の関連遺伝子が存在することが明らかになった。この時点で、9 つの異なる近縁マウス遺伝子があり、5 つには対応するヒト遺伝子があると考えられた。T F A S T A プログラム、マウスゲノム領域の配列マップおよび哺乳動物 D N A におけるエクソン / イントロン接合部の規範的 (c a n o n i c a l) 配列の理解を用いて、D C L 1 ~ 5 ポリペプチドに関して、オープンリーディングフレームおよびイントロン / エクソン境界を予測した。この配列情報を用いて、各遺伝子の 5 ' および 3 ' コード領域に特異的なユニークなオリゴヌクレオチド対を設計し、そして合成した。具体的には、配列番号 3 および 4 は、それぞれ、D C L 1 のセンスおよびアンチセンス方向の P C R プライマーであり (図 1 を参照されたい) ; 配列番号 7 および 8 は、それぞれ、D C L 2 のセンスおよびアンチセンス方向の P C R プライマーであり (図 2 を参照されたい) ; 配列番号 1 3 および 1 4 は、それぞれ、D C L 3 のセンスおよびアンチセンス方向の P C R プライマーであり (図 3 を参照されたい) ; 配列番号 1 9 および 2 0 は、それぞれ、D C L 4 のセンスおよびアンチセンス方向の P C R プライマーであり (図 4 を参照されたい) ; そして配列番号 2 5 および 2 6 は、それぞれ、D C L 5 のセンスおよびアンチセンス方向の P C R プライマーである (図 5 を参照されたい)。これらのプライマー対を、ヒトおよびマウス組織特異的 c D N A の巨大コレクション (C l o n t e c h、カリフォルニア州パロアルト) 由来のテンプレートを含有する P C R 混合物に添加し、そして P C R を行った。これらの反応から、予測される大きさのアンプリマー (a m p l i m e r) を得た。これらの断片をゲル精製し、そして D N A 配列解析に提出して、この解析によって、5 つの新規 D C L 分子すべてに関して、決定した c D N A 配列が、予測される配列と同一であることが立証された。さらに、より小さいアンプリマーを配列決定し、そしてこれらが選択的スプライシング型、すなわち s v D C 40 L 2、s v D C L 3 および s v D C L 4 をコードすることを見出した。

【 0 0 7 1 】

以下の論議全体を通じて、定義されるモチーフおよび / またはポリペプチド領域および / またはサイン配列のアミノ酸指定はこれを含んだものである。当業者は、対立遺伝子変異体などの天然存在変異体は、これらの領域の番号付けにおいて多様であることが可能であり、そしてしたがって、コンピュータ解析から予測されるものとは異なる可能性があることを認識するであろう。したがって、領域またはモチーフの最初のアミノ酸指定および最後のアミノ酸指定は、割り当てられた番号付けとは 1 ~ 5 アミノ酸異なる可能性がある。G C G プログラム M O T I F S (タンパク質部位およびパターンの P R O S I T E ディクショナリー) を用いて、C 型レクチンドメインおよび内部サインパターンを決定した。本 50

明細書において、N連結グリコシル化部位をA s n - X - S e r / T h r (式中、Xはプロリン以外のアミノ酸いずれかである)と定義する。http://www.cbs.dtu.dk/services/の膜貫通隠れマルコフモデル(TM HMM)予測ツールを用いて予測を行い、そしてタンパク質パターンのPROSITEディクショナリーを用いるGCGプログラムMOTIFSを用いて、C型レクチンおよびアスパルチルプロテアーゼドメインを予測した。例えば米国医学図書館ウェブサイトwww.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgiを介して使用のために入手可能なBLASTNプログラム、バージョン2.0.9、またはUW-BLAST2.0アルゴリズムなどの、配列比較の当業者に用いられる他のプログラムもまた、使用可能である。UW-BLAST2.0の標準的なデフォルトパラメーター設定は、以下のインターネットサイト:sapiens.wustl.edu/blast/blast/#Featuresに記載される。確立されたコンセンサス配列を用いて、免疫受容体チロシン依存性阻害性モチーフ(ITIM)を予測した。

10

【0072】

DCL1のcDNA配列を配列番号1に提供し、そして該配列は、738bpのポリヌクレオチドを含んでなり、図1に示すように、開始コドン、5つのエクソン/イントロン・スプライス接合部およびヌクレオチド736~738の停止コドンを有する。DCL1は、ネズミ染色体6にマッピングされている。全長DCL1ポリペプチド配列(配列番号2)は、245アミノ酸オープンリーディングフレーム(ORF)を含んでなり、本質的にアミノ酸1~53に渡るアミノ末端細胞内領域、本質的にアミノ酸54~76に渡る膜貫通領域、および本質的にアミノ酸77~245に渡る細胞外領域を有する。細胞外領域は、ほぼアミノ酸102~104および195~197に見られる、いくつかの推定されるN連結グリコシル化部位を有する。DCL1は、ほぼアミノ酸211~238に渡る代表的なサイン配列を有する、特徴的なC型レクチンドメイン、およびほぼアミノ酸5~10の免疫受容体チロシン依存性阻害性様モチーフ(ITIM)を有する。可溶性DCL1は、細胞外ドメイン(配列番号2の残基77~245)またはその断片を含んでなる。

20

【0073】

DCL2のcDNA配列を配列番号5に提供し、そして該配列は、714bpのポリヌクレオチドを含んでなり、図2に示すように、開始コドン、5つのエクソン/イントロン・スプライス接合部およびヌクレオチド712~714の停止コドンを有する。DCL2は、ネズミ染色体6にマッピングされている。全長DCL2ポリペプチド配列(配列番号6)は、237アミノ酸ORFを含んでなり、本質的にアミノ酸1~44に渡るアミノ末端細胞内領域、本質的にアミノ酸45~68に渡る膜貫通領域、および本質的にアミノ酸69~237に渡る細胞外領域を有する。細胞外領域は、ほぼアミノ酸86~88、130~132および188~190に見られる、いくつかの推定されるN連結グリコシル化部位を有する。DCL2はまた、ほぼアミノ酸157~168に渡る、予測されるアスパルチル(または酸)プロテアーゼドメインとともに、ほぼアミノ酸204~230に渡る代表的なサイン配列を有する、特徴的なC型レクチンドメインを有する。可溶性DCL2は、細胞外ドメイン(配列番号6の残基69~237)またはその断片を含んでなる。

30

【0074】

さらに、DCL2は、svDCL2と称する一部切除スプライシング変異体アイソフォームを有し、該アイソフォームでは、エクソン3が欠失されている(cDNA配列を配列番号9に提供し、そして対応するアミノ酸配列を配列番号10に提供する)。svDCL2 cDNA配列は、612bp断片を含んでなり、開始コドン、4つのエクソン/イントロン・スプライス接合部およびヌクレオチド610~612の停止コドンを有する。全長svDCL2ポリペプチド配列は、203アミノ酸ORFを含んでなり、本質的にアミノ酸1~44に渡るアミノ末端細胞内領域、本質的にアミノ酸45~67に渡る膜貫通領域、および本質的にアミノ酸68~203に渡る細胞外領域を有する。細胞外領域は、ほぼアミノ酸96~98および154~156に、いくつかの推定されるN連結グリコシル化部位を有する。svDCL2はまた、ほぼアミノ酸123~134に渡る、予測されるア

40

50

スパルチル（または酸）プロテアーゼドメインとともに、ほぼアミノ酸 170 ~ 196 に渡る代表的なサイン配列を有する、特徴的な C 型レクチンドメインを有する。可溶性 s v D C L 2 は、細胞外ドメイン（配列番号 10 の残基 68 ~ 203）またはその断片を含んでなる。

【0075】

D C L 3 の c D N A 配列を配列番号 11 に提供し、そして該配列は、711 b p のポリヌクレオチドを含んでなり、図 3 に示すように、開始コドン、5 つのエクソン / イントロン・スプライス接合部およびヌクレオチド 709 ~ 711 の停止コドンを含む。D C L 3 は、ネズミ染色体 6 にマッピングされている。全長 D C L 3 ポリペプチド配列（配列番号 12）は、236 アミノ酸 O R F を含んでなり、本質的にアミノ酸 1 ~ 44 に渡るアミノ末端細胞内領域、本質的にアミノ酸 45 ~ 69 に渡る膜貫通領域、および本質的にアミノ酸 70 ~ 236 に渡る細胞外領域を有する。細胞外領域は、ほぼアミノ酸 123 ~ 125、130 ~ 132、160 ~ 162 および 136 ~ 138 に、いくつかの推定される N 連結グリコシル化部位を有する。D C L 3 は、ほぼアミノ酸 24 ~ 229 に渡る代表的なサイン配列を有する、特徴的な C 型レクチンドメインを有する。可溶性 D C L 3 は、細胞外ドメイン（配列番号 12 の残基 70 ~ 236）またはその断片を含んでなる。

10

【0076】

D C L 3 は、s v D C L 3 と称する一部切除スプライシング変異体アイソフォームを有し、該アイソフォームでは、エクソン 4 およびエクソン 5 が欠失されている（c D N A 配列を配列番号 15 に提供し、そして対応する部分的アミノ酸配列を配列番号 16 に提供する）。s v D C L 3 c D N A 配列は、443 b p 断片を含んでなり、開始コドン、3 つのエクソン / イントロン・スプライス接合部およびヌクレオチド 349 ~ 351 などのいくつかの停止コドンを含む。予測される s v D C L 3 ポリペプチド配列の 1 つのアイソフォームは、116 アミノ酸 O R F を含んでなり、本質的にアミノ酸 1 ~ 45 に渡るアミノ末端細胞内領域、本質的にアミノ酸 46 ~ 69 に渡る膜貫通領域、および本質的にアミノ酸 70 ~ 116 に渡る細胞外領域を有する。細胞外領域は、アミノ酸 95 ~ 97 の N 連結グリコシル化部位、およびほぼアミノ酸 5 ~ 10 の免疫受容体チロシン依存性阻害性モチーフを有する。可溶性 s v D C L 3 は、細胞外ドメイン（配列番号 16 の残基 70 ~ 116）またはその断片を含んでなる。

20

【0077】

D C L 4 の c D N A 配列を配列番号 17 に提供し、そして該配列は、627 b p のポリヌクレオチドを含んでなり、図 4 に示すように、開始コドン、5 つのエクソン / イントロン・スプライス接合部およびヌクレオチド 625 ~ 627 の停止コドンを含む。D C L 4 は、ネズミ染色体 6 にマッピングされている。全長 D C L 4 ポリペプチド配列（配列番号 18）は、208 アミノ酸 O R F を含んでなり、本質的にアミノ酸 1 ~ 20 に渡るアミノ末端細胞内領域、本質的にアミノ酸 21 ~ 43 に渡る膜貫通領域、および本質的にアミノ酸 44 ~ 208 に渡る細胞外領域を有する。細胞外領域は、ほぼアミノ酸 102 ~ 104 に、推定される N 連結グリコシル化部位を有する。D C L 4 はまた、ほぼアミノ酸 176 ~ 201 に渡る代表的なサイン配列を有する、特徴的な C 型レクチンドメインも有する。可溶性 D C L 4 は、細胞外ドメイン（配列番号 18 の残基 44 ~ 208）またはその断片を含んでなる。

30

40

【0078】

D C L 4 は、s v D C L 4 と称する一部切除スプライシング変異体アイソフォームを有し、該アイソフォームでは、エクソン 4 が欠失されている（c D N A 配列を配列番号 21 に提供し、そして対応する部分的アミノ酸配列を配列番号 22 に提供する）。s v D C L 4 c D N A 配列は、472 b p 断片を含んでなり、開始コドン、4 つのエクソン / イントロン・スプライス接合部およびヌクレオチド 283 ~ 285 などのいくつかの停止コドンを含む。予測される s v D C L 4 ポリペプチド配列の 1 つのアイソフォームは、94 アミノ酸 O R F を含んでなり、本質的にアミノ酸 1 ~ 19 に渡るアミノ末端細胞内領域、本質的にアミノ酸 20 ~ 42 に渡る膜貫通領域、および本質的にアミノ酸 42 ~ 94 に渡る

50

細胞外領域を有する。可溶性 s v D C L 4 は、細胞外ドメイン（配列番号 1 6 の残基 4 2 ~ 9 4）またはその断片を含んでなる。

【 0 0 7 9 】

D C L ポリペプチドに対するヒト相同体もまた発見し、そして D C L 5 と称する。該 c D N A 配列を配列番号 2 3 に提供し、決定したアミノ酸配列を配列番号 2 4 に提供する。D C L 5 ポリヌクレオチド配列は、6 4 8 b p のポリヌクレオチドを含んでなり、図 5 に示すように、開始コドン、5 つのエクソン / イントロン・スプライス接合部およびヌクレオチド 6 4 6 ~ 6 4 8 の停止コドンを有する。D C L 5 は、ヒト染色体 1 2 にマッピングされている。全長 D C L 5 ポリペプチド配列（配列番号 2 4）は、2 1 5 アミノ酸 O R F を含んでなり、本質的にアミノ酸 1 ~ 1 9 に渡るアミノ末端細胞内領域、本質的にアミノ酸 2 0 ~ 4 1 に渡る膜貫通領域、および本質的にアミノ酸 4 2 ~ 2 1 5 に渡る細胞外領域を有する。細胞外領域は、ほぼアミノ酸 4 5 ~ 4 7、1 0 2 ~ 1 0 4 および 1 1 1 ~ 1 1 3 に、いくつかの推定される N 連結グリコシル化部位を有する。D C L 5 はまた、ほぼアミノ酸 1 8 2 ~ 2 0 7 に渡る代表的なサイン配列を有する、特徴的な C 型レクチンドメインも有する。可溶性 D C L 5 は、細胞外ドメイン（配列番号 2 4 の残基 4 2 ~ 2 1 5）またはその断片を含んでなる。

10

【 0 0 8 0 】

D C L 1 ~ 5 はカルシウム依存性レクチンファミリーのメンバーおよび I I 型膜タンパク質と特徴付けられる。D C L 1 ~ 5 は、マクロファージレクチンに相同性を持つ I I 型糖タンパク質である樹状細胞免疫受容体（D C I R）、並びに特異的免疫の開始のため、個体発生および / または D C の A g ハンドリング潜在能力を指示するのに特定の役割を果たすと考えられる、肝アシアロ糖タンパク質受容体（B a t e s , E . ら , J . I m m u n o l . 1 6 3 : 1 9 7 3 - 8 3 , 1 9 9 9）; T 細胞結合に、そして T 細胞同時刺激シグナルを搬送するのに関与すると考えられる D C 会合 C 型レクチン（デクチン 1 および 2）（それぞれ、A r i i z u m i , K . ら , J . B i o l . C h e m . , 2 7 5 : 2 0 1 5 7 - 1 6 7 , 2 0 0 0 および A r i i z u m i , K . ら , J . B i o l . C h e m . , 2 7 5 : 1 1 9 5 7 - 9 6 3 , 2 0 0 0）; およびバーベック顆粒の形成を誘導するエンドサイトーシス受容体であると考えられるランゲルハンス細胞特異的 C 型レクチン（ランゲリン）（V a l l a d e a u , J . , I m m u n i t y 1 2 : 7 1 - 8 1 , 2 0 0 0）などの他の C 型レクチンファミリーメンバーと相同性を共有する。

20

30

【 0 0 8 1 】

カルボキシ末端に単一の炭水化物認識ドメインを持つ C 型レクチンドメインを有する I I 型タンパク質のファミリーメンバーには、肝アシアロ糖タンパク質受容体 1 および 2、並びにオリゴ糖基に結合するマクロファージレクチンなどの細胞表面受容体が含まれ、そしてこれらは、リガンド・インターナリゼーションおよび抗原取り込みに関与する。したがって、D C L ポリペプチドは、オリゴ糖基に結合する可能性があり、そしてリガンド・インターナリゼーションおよび抗原取り込みに関与する。さらに、D C L ポリペプチドは、結合、および細胞内シグナル伝達経路の開始などの細胞間相互作用および細胞間コミュニケーションに関与する可能性がある。

40

【 0 0 8 2 】

新規ポリペプチドのいくつかは、プロテアーゼおよびレクチン機能の組み合わせを有するという知見はユニークである。アスパルチルプロテアーゼは、細胞内小胞中の活性と関与するとともに、細胞表面膜と関与する。

【 0 0 8 3 】

D C L 1 および D C L 3 はまた、少なくとも 1 つの免疫受容体チロシン依存性阻害性モチーフ（I T I M）も有する。陽性シグナル伝達を仲介する多くの受容体は、免疫受容体チロシン依存性活性化モチーフ（I T A M）として知られるチロシンホスファターゼリン酸化の部位を含有する細胞質テールを有する。陽性シグナル伝達の一般的な機械的経路は、受容体の細胞質ドメイン上および他のシグナル伝達分子上の部位をリン酸化するチロシン

50

キナーゼの活性化を伴う。受容体がリン酸化され、シグナル伝達分子の結合部位が生成されると、これがシグナル伝達経路を開始し、そして細胞を活性化する。阻害性経路は、ITAM同様、チロシンキナーゼによってリン酸化される、免疫受容体チロシン依存性阻害性モチーフ(ITIM)を有する受容体を伴う。ITIMモチーフを有する受容体は、活性化された受容体またはシグナル伝達分子からチロシンを除去することによって、シグナル伝達を遮断する、阻害性シグナル伝達に關与する(Renardら, Immun Rev 155:205-221, 1997)。ITIMは、コンセンサス配列I/VxYxxL/V(配列番号28)を有し、そして免疫系の多様なシグナル伝達タンパク質の細胞質部分に見られ、これらの多くがIgスーパーファミリーに属するか、またはII型二量体Cレクチンファミリーに属する(Renardら、1997、上記を参照されたい)。ITIMを含有するタンパク質には、「キラー細胞Ig様受容体」または「KIR」、および白血球Ig様受容体またはタンパク質の「LIR」ファミリーのいくつかのメンバーが含まれる(Renardら、1997、上記; Cosmanら, Immunity 7:273-82, 1997; Borgesら, J Immunol 159:5192-96, 1997)。ITIMによるシグナル伝達は、標的とされる細胞活性、例えば細胞表面タンパク質の発現を下方制御すると考えられる。Renardらは、複雑な細胞機能の制御は、ITIMが仲介する阻害性シグナル伝達、および16~18アミノ酸活性化モチーフ、または他のタンパク質に存在する「ITAM」配列による、同一機能の活性化の相互作用によって微調整されていると提唱する。CD22およびFcγRIIb1もまた、細胞質ドメインにITIMを、そして細胞機能を下方制御するかまたは阻害する阻害性シグナルを送る機能も有する。これらの受容体が、ITIMモチーフへの結合を介して、SHP-1ホスファターゼに会合することが示されてきている。受容体によるSHP-1ホスファターゼの補充が、受容体の阻害性機能を制御する、細胞内シグナル伝達経路には、必要であるようである。重要なことに、単一の細胞内ITIMモチーフを有するII型膜タンパク質である、C型レクチンもまた、報告されている。例えば、NK遺伝子複合体と称される領域中のヒト染色体12p12~p13上に位置する遺伝子には、NKG2複合体およびCD94の産物が含まれ、これらは、MHCクラスI分子の認識に、そしてNK細胞活性の制御に關与する。NKG2A/B-CD94ヘテロ二量体による細胞機能の阻害は、NKG2A/B細胞内ドメインにITIMが存在することと関連付けられる(Lazetic, S.C.ら, J. Immunol. 157:4741, 1996; Houchins, J.P.ら, J. Immunol. 158:3603, 1997)。

10

20

30

【0084】

したがって、ITIMモチーフを有する他のC型レクチンファミリーメンバーとの類似によって、ITIMモチーフを有する配列番号2、12および16に示すポリペプチドは、DCLポリペプチドが適切な受容体または天然リガンドと結合した際に、そのITIMと、チロシンホスファターゼ(SHP-1チロシンホスファターゼを含む)などの1以上のホスファターゼの相互作用を介して阻害性シグナルを搬送する。また、ITIMを所持する免疫制御受容体との類似によって、DCLファミリーメンバーは、体液性免疫および細胞仲介免疫、MHCクラスI分子の認識、および免疫細胞活性の制御とともに炎症反応およびアレルギー反応の調節に、制御上の影響を有する。明らかに、相対するキナーゼおよびホスファターゼによって仲介される、免疫系活性化シグナルおよび阻害性シグナルは、免疫系の平衡を維持するのに非常に重要である。活性化シグナルが優勢である系は、自己免疫および炎症につながるであろう。阻害性シグナルが優勢である免疫系は、感染した細胞または癌細胞を攻撃する能力がより低い。したがって、DCLファミリーメンバーは、免疫系における平衡を維持するのに役割を果たす。

40

【0085】

本発明内に含まれるのは、DCLポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。これらの核酸は、適切な供給源からのゲノムまたはcDNA分子の単離を含む、いくつかの方法で同定可能である。核酸単離用のプローブまたはプライマーとして、あるいはデータ

50

ベース検索用のクエリー配列として使用しようとする、本明細書に記載するアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列は、アミノ酸配列からの「逆翻訳 (back-translation)」によって、またはコードDNA配列が同定されているポリペプチドとアミノ酸同一性を有する領域を同定することによって、得ることが可能である。周知のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を使用して、1以上のDCLポリペプチドまたは望ましい組み合わせのDCLポリペプチド断片をコードするDNA配列を単離し、そして増幅することが可能である。DNA断片の組み合わせの所望の末端を定義するオリゴヌクレオチドを5'プライマーおよび3'プライマーとして使用する。該オリゴヌクレオチドはさらに、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含有して、増幅したDNA断片の組み合わせを発現ベクターに挿入するのを容易にすることが可能である。PCR技術は、Saikiら, Science 239: 487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wuら監修, Academic Press, Inc., サンディエゴ (1989), pp. 189-196; およびPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innisら監修, Academic Press, Inc. (1990) に記載される。

10

【0086】

本明細書において、ポリヌクレオチドまたは核酸分子には、一本鎖および二本鎖型両方のDNAおよびRNAと共に対応する相補配列が含まれる。DNAには、例えば、cDNA、ゲノムDNA、化学的に合成したDNA、PCRによって増幅したDNA、およびその組み合わせが含まれる。本発明の核酸分子には、全長遺伝子またはcDNA分子と共に、その断片の組み合わせが含まれる。本発明の核酸は、優先的にヒト供給源由来であるが、本発明は非ヒト種由来のものもまた含む。

20

【0087】

「単離ポリヌクレオチド」は、天然存在供給源から単離されているポリヌクレオチドの場合、ポリヌクレオチドが単離された生物のゲノムに存在する隣接遺伝子配列から分離されているポリヌクレオチドである。例えば、PCR産物、cDNA分子、またはオリゴヌクレオチドなど、テンプレートから酵素的に合成されたか、または化学的に合成されたポリヌクレオチドの場合、こうしたプロセスから生じるポリヌクレオチドは、単離ポリヌクレオチドと理解される。単離ポリヌクレオチド分子は、別個の断片の形の、またはより大きいポリヌクレオチド構築物の構成要素としての、ポリヌクレオチド分子もまた指すことが可能である。1つの好ましい態様において、ポリヌクレオチドは、実質的に、内因性成分の混入を含まない。ポリヌクレオチド分子は、好ましくは、標準的生化学法 (Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (1989) に概略されるものなど) によって、少なくとも1度は、実質的に純粋な形で、そしてその構成要素ヌクレオチド配列の同定、操作および回収を可能にする量または濃度で単離されているDNAまたはRNAに由来している。こうした配列は、好ましくは、真核遺伝子に典型的には存在する内部非翻訳配列またはイントロンに中断されない、オープンリーディングフレームの形で提供され、そして/または構築される。非翻訳DNAの配列は、オープンリーディングフレームの5'または3'に存在することが可能であり、ここでは該DNAは、コード領域の操作または発現に干渉しない。

30

40

【0088】

本発明にはまた、中程度にストリンジェントな条件下、そしてより好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、本明細書に記載するDCLポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、ポリヌクレオチドも含まれる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Sambrook, Fritsch, およびManiatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, C

50

old Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 第9章および第11章; および Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubelら監修, John Wiley & Sons, Inc, セクション2.10および6.3-6.4)によって示されており、そして例えばDNAの長さおよび/または塩基組成に基づいて、一般の当業者によって容易に決定可能である。中程度にストリンジェントな条件を達成する1つの方法は、5 x SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) を含有する前洗浄溶液、約50%ホルムアミド、6 x SSCのハイブリダイゼーション緩衝液、および約55のハイブリダイゼーション温度(または約42のハイブリダイゼーション温度を伴う、約50%ホルムアミドを含有するものなどの他の同様のハイブリダイゼーション溶液)、並びに約60、0.5 x SSC、0.1% SDS中の洗浄条件の使用を伴う。一般的に、高度にストリンジェントな条件は、上記のようなハイブリダイゼーション条件であるが、およそ68、0.2 x SSC、0.1% SDSでの洗浄を伴うと定義される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液において、SSPE (1 x SSPEは、0.15 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄、および1.25 mM EDTA, pH 7.4である)をSSC (1 x SSCは、0.15 M NaClおよび15 mM クエン酸ナトリウムである)の代わりに使用することが可能である; 洗浄はハイブリダイゼーション完了後、15分間行う。当業者に知られるように、そして以下にさらに記載するように、ハイブリダイゼーション反応および二重鎖安定性を支配する基本原理を適用することによって、必要に応じて、所望の度合いのストリンジェンシーを達成するよう、洗浄温度および洗浄塩濃度を調整可能であることが理解される(例えばSambrookら、1989を参照されたい)。核酸が、未知の配列の標的核酸にハイブリダイズする際、ハイブリッド長は、ハイブリダイズする核酸のものであると予測される。既知の配列の核酸がハイブリダイズする場合、ハイブリッド長は、核酸の配列を並列し、そして最適配列相補性の単数または複数の領域を同定することによって、決定可能である。長さ50塩基対未満であると予測されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、該ハイブリッドの融解温度(T_m)より5~10低く、T_mは、以下の等式にしたがって決定する。長さ18塩基対未満のハイブリッドに関しては、T_m() = 2 (A + T塩基数) + 4 (G + C塩基数)である。長さ18塩基対を超えるハイブリッドに関しては、T_m() = 81.5 + 16.6 (log₁₀ [Na⁺]) + 0.41 (% G + C) - (600 / N)であり、式中、Nはハイブリッド中の塩基数であり、そして[Na⁺]はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオン濃度である(1 x SSCの[Na⁺] = 0.165 M)。より詳細に上に記載するように、好ましくは、こうしたハイブリダイズする核酸分子は各々、少なくとも15ヌクレオチド(またはより好ましくは少なくとも18ヌクレオチド、または少なくとも20ヌクレオチド、または少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも30ヌクレオチド、または少なくとも40ヌクレオチド、または最も好ましくは少なくとも50ヌクレオチド)の長さを有するか、またはハイブリダイズする本発明の核酸の長さの少なくとも25%(より好ましくは少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、そして最も好ましくは少なくとも80%)の長さを有し、そして配列同一性が、配列ギャップを最小にしつつ、重複および同一性が最大になるように並列させた際のハイブリダイズする核酸配列の比較によって決定される場合、ハイブリダイズする本発明の核酸と、少なくとも60%(より好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、または少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%)の配列同一性を有する。

【0089】

本発明の範囲内のDCLタンパク質およびその相同体の他の誘導体には、N末端融合体またはC末端融合体として組換え体培養における合成によるなど、タンパク質またはその断片と他のタンパク質またはポリペプチドの共有結合コンジュゲートまたは凝集コンジュゲートが含まれる。例えば、コンジュゲート化されるペプチドは、翻訳と同時に、または翻

訳後に、タンパク質をその合成部位から、細胞膜または細胞壁の内部または外部の機能部位に輸送するのを指示する、シグナル（またはリーダー）ポリペプチド配列（例えば酵母 α 因子リーダー）であることが可能である。

【0090】

本発明は、DCLポリペプチドおよびそれらをコードする核酸の種相同体（species homologue）（オルソログとも呼ばれる）もまた、提供する。本明細書において、「種相同体」は、既定のポリペプチドまたは核酸のものと起源の異なる種であるが、当業者に決定されるように、既定のポリペプチドまたは核酸に有意な配列類似性を持つポリペプチドまたは核酸である。種相同体は、本明細書に提供するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドから、適切なプローブまたはプライマーを作成し、そして所望の種由来の適切な核酸供給源をスクリーニングすることによって、単離し、そして同定することが可能である。本発明はまた、DCLポリペプチドおよびそれをコードする核酸のアリル変異体；すなわち、アミノ酸またはヌクレオチド配列の相違が、遺伝子多型（集団内の個体間のアリル変動）に起因しうる、こうしたポリペプチドおよび核酸の天然存在代替型も含む。

10

【0091】

タンパク質融合体は、DCLタンパク質および相同体の精製または同定を容易にするために付加するペプチド（例えばポリHis）を含んでなることが可能である。本発明のタンパク質のアミノ酸配列もまた、Hoppら, Bio/Technology 6:1204 (1988)に記載されるものなどの同定ペプチドに連結することが可能である。こうした非常に抗原性のペプチドは、特異的モノクローナル抗体が可逆的に結合して、発現された組換えタンパク質の迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にするエピトープを提供する。Hoppらの配列はまた、ウシ粘膜エンテロキナーゼに特異的に切断されるため、精製されたタンパク質からこのペプチドを除去することが可能である。こうしたペプチドでキャッピングした融合タンパク質はまた、大腸菌における細胞内分解にも耐性である可能性がある。融合タンパク質は、免疫グロブリンFc領域に連結されたDCLタンパク質のアミノ酸配列をさらに含んでなる。典型的なFc領域はヒトIgG1およびその機能可能な断片とともに、Fc突然変異タンパク質であり、これらはすべて当該技術分野に周知である。用いるFc領域の部分に応じて、融合タンパク質は、鎖間ジスルフィド結合の形成を通じて、二量体として発現可能である。融合タンパク質を抗体の重鎖および軽鎖両方を用いて作製すると、4つものDCL領域を持つタンパク質オリゴマーを形成可能である。

20

30

【0092】

さらに、融合ポリペプチドは、精製および同定を容易にするため付加するペプチドを含んでなることが可能である。こうしたペプチドには、例えば、ポリ-Hisまたは米国特許第5,011,912号およびHoppら, Bio/Technology 6:1204, 1988に記載される抗原性同定ペプチドが含まれる。こうしたペプチドの1つはFLAG（登録商標）ペプチドであり、該ペプチドは抗原性が高く、そして特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現した組換えポリペプチドの迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。4E11と称されるネズミハイブリドーマは、米国特許第5,011,912号に記載されるように、特定の二価金属陽イオンの存在下でFLAG（登録商標）ペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号第HB9259号でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されている。FLAG（登録商標）ペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division、コネティカット州ニューヘブーンより入手可能である。

40

【0093】

別の態様において、DCLおよびその相同体は、さらに、オリゴマー化ジッパードメインを含んでなる。ジッパードメインは当該技術分野に周知であり、そして詳細に記載する必

50

要はない。ロイシン・ジッパードメインの例は、酵母転写因子GCN4に見られるものおよびラット肝臓に見られる熱安定性DNA結合タンパク質(C/EBP; Landschulzら, Science 243:1681, 1989)、優先的にヘテロ二量体を形成する核トランスフォーミングタンパク質、fosおよびjun(O'Sheaら, Science 245:646, 1989; TurnerおよびTjian, Science 243:1689, 1989)、並びにネズミプロトオンコジーンc-mycの遺伝子産物(Landschulzら, Science 240:1759, 1988)に見られるものである。パラミクソウイルス、コロナウイルス、麻疹ウイルスおよび多くのレトロウイルスを含む、いくつかの異なるウイルスの融合体形成性(fusogenic)タンパク質もまた、ロイシン・ジッパードメインを所有する(BucklandおよびWild, Nature 338:547, 1989; Britton, Nature 353:394, 1991; DelwartおよびMosialos, AIDS Research and Human Retroviruses 6:703, 1990)。

10

20

30

40

50

【0094】

本発明はまた、上に前述するように、これらのポリペプチドの特定の断片またはドメインを含んでなる、DCLポリペプチドの可溶性型もまた提供する。可溶性DCLポリペプチドは、発現される細胞から分泌されることが可能であり、そして好ましくは、DCLポリペプチド活性を保持する。可溶性DCLポリペプチドにはさらに、少なくとも1つのDCLポリペプチドを含んでなるオリゴマーまたは融合ポリペプチド、並びにDCLポリペプチド活性を有するこれらのポリペプチドいずれかの断片が含まれる。分泌された可溶性ポリペプチドは、培地から、例えば遠心分離によって、所望のポリペプチドを発現する、損なわれていない(intact)細胞を分離し、そして所望のポリペプチドの存在に関して培地(上清)をアッセイすることによって、同定可能(そしてその非可溶性膜結合対応物から区別可能)である。培地中の所望のポリペプチドの存在は、該ポリペプチドが細胞から分泌され、そしてしたがって、該ポリペプチドの可溶性型であることを示す。DCLポリペプチドの可溶性型の使用は、多くの適用に好適である。可溶性ポリペプチドは細胞から分泌されるため、組換え宿主細胞からのポリペプチドの精製が容易になる。さらに、可溶性ポリペプチドは、一般的に、非経口投与に関して、そして多くの酵素的方法に関して、膜結合型より適している。

【0095】

DCLポリペプチドの誘導体はまた、免疫原、in vitroアッセイ中の試薬、またはアフィニティー精製の結合剤としても使用可能である。こうした誘導体はまた、システインおよびリジン残基で、M-マレイミドベンゾイルスクシンイミドエステルおよびN-ヒドロキシスクシンイミドなどの架橋剤によって得ることも可能である。本発明のタンパク質はまた、臭化シアン活性化、ビスオキシラン活性化、カルボニルジイミダゾール活性化またはトシル活性化アガロース構造などの多様な不溶性支持体に反応性側鎖を通じて共有結合させるか、またはポリオレフィン表面に吸着させることによって(グルタルアルデヒド架橋を伴いまたは伴わず)、共有結合させることも可能である。支持体に結合したら、タンパク質を用いて、DCL、またはDCLタンパク質に構造および/または機能が類似である他のタンパク質に対して作製された抗体に(アッセイまたは精製の目的で)選択的に結合させることが可能である。

【0096】

本発明は、結合する天然パターングリコシル化を含むまたは含まないDCLポリペプチドもまた含む。酵母または哺乳動物発現系、例えばCOS-7細胞で発現させたタンパク質は、発現系に応じて、分子量およびグリコシル化パターンにおいて、天然分子と同様である可能性も、またはわずかに異なる可能性もある。大腸菌などの細菌における本発明のタンパク質をコードするDNAの発現は、非グリコシル化分子を提供する。不活性化されたN-グリコシル化部位を有するDCLタンパク質またはその相同体の機能する突然変異類似体(analog)は、オリゴヌクレオチド合成および連結によって、または部位特異

的突然変異誘発技術によって、産生可能である。これらの類似体タンパク質は、酵母発現系を用いて、優れた収率で、均質な炭水化物減少型で産生可能である。真核タンパク質中のN-グルコシル化部位は、アミノ酸トリプレットA_{s n}-A₁-Z(式中A₁はP r o以外のアミノ酸であり、そしてZはS e rまたはT h rである)によって特徴付けられる。この配列において、アスパラギンが炭水化物の共有結合のための側鎖アミノ基を提供する。こうした部位は、A_{s n}または残基Zを別のアミノ酸で置換するか、A_{s n}またはZを欠失させるか、あるいはA₁およびZ間に非Zアミノ酸を挿入するか、またはA_{s n}およびA₁間にA_{s n}以外のアミノ酸を挿入することによって、除去可能である。

【0097】

DC Lタンパク質誘導体はまた、天然DC Lポリペプチドまたはそのサブユニットの突然変異によっても得ることが可能である。本明細書において、DC L突然変異タンパク質は、DC Lタンパク質に相同であるが、少なくとも1つまたは複数の欠失、挿入または置換のため、天然DC Lと異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。DC LペプチドをコードするDNAにおいて作成した突然変異いずれの影響も、突然変異DC Lペプチドが、DC Lに特異的に結合するタンパク質(例えば抗体または天然リガンド)に結合する能力を解析することによって、容易に決定可能である。さらに、DC L類似体、突然変異タンパク質または誘導体の活性は、本明細書に記載するアッセイ法のいずれによっても決定可能である。同様の突然変異をDC Lの相同体において作製することが可能であり、そして同様の方式で試験することが可能である。

10

【0098】

本発明のタンパク質の生物学的に同等な類似体は、例えば残基または配列の多様な置換体を作製するか、あるいは生物学的活性に不要な末端または内部残基または配列を欠失させることによって、構築可能である。例えばシステイン残基を欠失させるか、または他のアミノ酸と交換して、再生に際して、誤った分子内ジスルフィド架橋の形成を防止することが可能である。突然変異誘発の他のアプローチは、隣接する二塩基性アミノ酸残基の修飾を伴い、K E X 2プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を増進する。

20

【0099】

例えば「保存的アミノ酸置換」は、その位で、アミノ酸残基の極性または荷電にほとんどまたはまったく影響がないように、非天然残基で天然アミノ酸残基を置換することを伴うことが可能である。さらに、ポリペプチド中のいかなる天然残基もまた、「アラニン・スキニング突然変異誘発」に関して先に記載されているように(例えばアラニン・スキニング突然変異誘発を論じる、Mac Lennanら, 1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643: 55-67; Sasakiら, 1998, Adv. Biophys. 35: 1-24を参照されたい)、アラニンで置換することも可能である。

30

【0100】

所望のアミノ酸置換は(保存的であってもまたは非保存的であっても)、こうした置換が所望であるときに、当業者によって決定可能である。例えばアミノ酸置換を用いて、ペプチド配列の重要な残基を同定可能であるし、あるいはペプチドまたはビヒクル-ペプチド分子の親和性(前述の式を参照されたい)を増加させるかまたは減少させることが可能である。典型的なアミノ酸置換を表1に示す。

40

【0101】

【表1-1】

表1 - アミノ酸置換

元来の残基	典型的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile

10

20

30

【 0 1 0 2 】

【 表 1 - 2 】

Lys (K)	Arg, 1,4 ジアミノ- 酪酸 Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

【0103】

特定の態様において、保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりも、化学的ペプチド合成によって、典型的に取り込まれる、非天然存在アミノ酸残基もまた含む。

30

【0104】

上述のように、天然存在残基は、配列の修飾に有用である可能性がある、共通の側鎖特性に基づいて、クラスに分類可能である。例えば、非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを、別のクラス由来のメンバーと交換することを伴う可能性がある。こうした置換残基を、非ヒトオルソログと相同であるペプチドの領域に、または分子の非相同領域に導入することが可能である。さらに、鎖配向に影響を及ぼすため、PまたはGを用いた修飾も行うことが可能である。

【0105】

こうした修飾を作製する際、アミノ酸のヒドロパシー指数を考慮することが可能である。各アミノ酸には、疎水性および荷電特性に基づいて、ヒドロパシー指数が割り当てられてきており、これらは：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン/シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；スレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタメート（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパルテート（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）である。

40

【0106】

相互作用的な生物学的機能をタンパク質に与える際に、ヒドロパシーアミノ酸指数が重要

50

であることが、当該技術分野において理解されている (K y t e ら , J . M o l . B i o l . , 157:105-131 (1982))。類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸を、特定のアミノ酸で置換して、そしてなお類似の生物学的活性を保持しうることが知られる。ヒドロパシー指数に基づいて変化を作製する際、ヒドロパシー指数が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものがさらにより特に好ましい。

【0107】

当該技術分野において、同様のアミノ酸の置換は、親水性に基づいて有効に行うことが可能であることもまた、理解されている。隣接するアミノ酸の親水性によって決定される、タンパク質の最大局所平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわちタンパク質の生物学的特性と相関する。 10

【0108】

以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパルテート (+3.0 $\pm$ 1)；グルタメート (+3.0 $\pm$ 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 $\pm$ 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；トリプトファン (-3.4)。類似の親水性値に基づいて変化を作製する際、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものがさらにより特に好ましい。また、親水性に基づいて、一次アミノ酸配列からエピトープを同定することも可能である。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」とも称される。 20

【0109】

当業者は、周知の技術を用いて、前述の配列に示すようなポリペプチドの適切な変異体を決定することが可能であろう。活性を破壊することなく変化させることが可能な分子の適切な領域を同定するため、当業者は、活性に重要でないと考えられる領域を標的とすることが可能である。例えば、同一種由来のまたは他の種由来の類似の活性を持つ類似のポリペプチドが知られている場合、当業者は、ペプチドのアミノ酸配列を類似のペプチドに比較することが可能である。こうした比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存されている分子の残基および部分を同定することが可能である。こうした類似のペプチドに比較して保存されていないペプチド領域における変化は、ペプチドの生物学的活性および/または構造に不都合な影響を与える可能性がより低いと認識されるであろう。当業者はまた、比較的保存されている領域であっても、活性を保持しながら、天然に存在する残基を、化学的に類似のアミノ酸で置換することが可能であることも知っているであろう (保存的アミノ酸残基置換)。したがって、生物学的活性または構造に重要である可能性がある領域であっても、生物学的活性を破壊することなく、またはペプチド構造に不都合に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供することが可能である。 30

【0110】

さらに、当業者は、活性または構造に重要な、類似のペプチドにおける残基を同定する、構造-機能研究を再検討することが可能である。こうした比較を考慮して、類似のペプチドにおける、活性または構造に重要なアミノ酸残基に対応する、ペプチド中のアミノ酸残基の重要性を予測可能である。当業者は、ペプチドのこうした予測される重要なアミノ酸残基に対する、化学的に類似のアミノ酸置換を選ぶことが可能である。 40

【0111】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける構造に関連して、三次元構造およびアミノ酸配列を解析することも可能である。この情報を考慮して、当業者は、三次元構造に関して、ペプチドのアミノ酸残基の並列を予測することが可能である。タンパク質表面上にあると予測されるアミノ酸残基は、他の分子との重要な相互作用に関与する可能性があるため、当業者は、こうした残基に根本的な変化を与えないように、選択することが可能である 50

。さらに、当業者は、所望のアミノ酸残基各々の位で、単一のアミノ酸置換を含有する試験変異体を生成することが可能である。その後、当業者に知られる活性アッセイを用いて、変異体をスクリーニングすることが可能である。こうしたデータを用いて、適切な変異体に関する情報を集めることが可能である。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、破壊された活性、望ましくなく減少した活性、または不適切な活性を生じることが発見された場合、こうした変化を持つ変異体は回避されるであろう。言い換えると、こうした日常的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、単独の、または他の突然変異と組み合わせた、さらなる置換を回避すべきである位のアミノ酸を容易に決定することが可能である。

【0112】

いくつかの科学的刊行物が二次構造の予測に充てられている。Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427(1996); Chouら, Biochemistry, 13(2):222-245(1974); Chouら, Biochemistry, 113(2):211-222(1974); Chouら, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978); Chouら, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276およびChouら, Biophys. J., 26:367-384(1979)を参照されたい。さらに、二次構造を予測するのを補助するコンピュータプログラムが現在利用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%を越える配列同一性、または40%を越える類似性を有する、2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造的トポロジーを有する。近年、タンパク質構造データベース(PDB)が大きくなり、二次構造の予測可能性が増進してきており、これには、ポリペプチド構造またはタンパク質構造内でのフォールディングの潜在的な数が含まれる。Holmら, Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999)を参照されたい。既定のポリペプチドまたはタンパク質には、限定される数のフォールディングしかなく、そして決定的な数の構造が解明されたなら、構造予測は劇的に正確性を得るであろうことが示唆されている(Brennerら, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997))。

【0113】

二次構造を予測するさらなる方法には、「スレッディング(threading)」(Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87(1997); Sipplら, Structure, 4(1):15-9(1996))、「プロフィール解析」(Bowieら, Science, 253:164-170(1991); Gribskovら, Meth. Enzym., 183:146-159(1990); Gribskovら, Proc. Natl. Acad. Sci., 84(13):4355-8(1987))、および「進化連関(evolutionary linkage)」(Holm、上記およびBrenner、上記を参照されたい)が含まれる。

【0114】

類似体DCLポリペプチドの発現のために構築されるヌクレオチド配列中の突然変異は、もちろん、コード配列の読み枠相を保存しなければならず、そして好ましくは、受容体mRNAの翻訳に不都合な影響を与えるであろうループまたはヘアピンなどの二次mRNA構造を産生するようハイブリダイズ可能な相補領域を生成しないであろう。突然変異部位はあらかじめ決定されていることが可能であるが、突然変異自体の性質があらかじめ決定されている必要はない。例えば、既定の部位での突然変異体の最適な特性を選択するため、標的コドンでランダム突然変異誘発を行って、そして発現された突然変異ウイルスタンパク質を、所望の活性に関してスクリーニングすることが可能である。

【0115】

DCLタンパク質またはその相同体をコードするヌクレオチド配列中のすべての突然変異

10

20

30

40

50

が、最終産物中で発現されるわけではなく、例えば、ヌクレオチド置換を作製して、発現を増進するか、主に、転写される mRNA 中の二次構造ループを回避する（本明細書に援用される EPA 75, 444 A を参照されたい）か、または選択される宿主により容易に翻訳されるコドン、例えば大腸菌発現のための周知の大腸菌優先コドンを提供することが可能である。

【0116】

天然配列の断片への連結を可能にする制限部位が隣接した、突然変異配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することによって、特定の遺伝子座に突然変異を導入することが可能である。連結後、生じた再構築配列は、所望のアミノ酸挿入、置換、または欠失を有する類似体をコードする。

10

【0117】

あるいは、オリゴヌクレオチドが指示する部位特異的突然変異誘発法を使用して、必要な置換、欠失、または挿入に応じて改変された特定のコドンを有する、改変された遺伝子を提供することが可能である。上述の改変を作製する典型的な方法が Walder ら (Gene 42:133, 1986); Bauer ら (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith ら (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981) に開示されており;そして米国特許第 4,518,584 号および第 4,737,462 号は、適切な技術を開示し、そして本明細書に援用される。

20

【0118】

本明細書に記載する DCL ポリペプチドおよび類似体は、薬剤組成物調製を含む、多くの用途を有するであろう。本発明のタンパク質はまた、例えば組織標本において、DCL ポリペプチドを検出するのに用いられるキットを調製するのに有用であろう。こうしたキットは、DCL ポリペプチドとその天然リガンドの相互作用のアンタゴニストまたは擬似体 (mimetic) (例えば、それぞれ該相互作用を阻害するかまたは模倣する、ペプチドまたは小分子) に関してスクリーニングする際に必要であるように、こうした相互作用を検出するのに使用を見出すであろう。こうしたキットには多様なアッセイ形式が有用であり、これらには (限定されるわけではないが)、ELISA、ドットプロット、固相結合アッセイ (バイオセンサーを用いるものなど)、迅速形式アッセイおよびバイオアッセイが含まれる。

30

【0119】

組換え DCL ポリペプチドの発現

本発明のポリペプチドは、好ましくは、組換え DNA 法により、DCL ポリペプチドまたはその相同体をコードする DNA 配列を、組換え発現ベクターに挿入して、そして発現を促進する条件下で、組換え微生物発現系において DNA 配列を発現させることによって、産生される。本発明に提供されるタンパク質をコードする DNA 配列を cDNA 断片および短いオリゴヌクレオチドリンカーから組み立てるか、または一連のオリゴヌクレオチドから組み立てて、組換え発現ベクターに挿入し、組換え転写単位で発現することが可能な合成遺伝子を提供することが可能である。

40

【0120】

組換え発現ベクターには、哺乳動物遺伝子、微生物遺伝子、ウイルス遺伝子または昆虫遺伝子由来の適切な転写制御要素または翻訳制御要素に機能可能であるように連結された、DCL ポリペプチド、相同体、または生物学的に同等な類似体をコードする合成または cDNA 由来 DNA 断片が含まれる。こうした制御要素には、以下に詳細に記載するような、転写プロモーター、転写を調節する所望によるオペレーター配列、適切な mRNA リボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写および翻訳の終結を調節する配列が含まれる。通常、複製起点によって与えられる、宿主において複製する能力、および形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子をさらに取り込むことが可能である。

【0121】

50

DNA領域は、互いに機能的に関連する場合、機能可能であるように連結されている。例えば、シグナルペプチド（分泌リーダー）のDNAは、ポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現される場合、該ポリペプチドのDNAに機能可能であるように連結されており；プロモーターは、コード配列の転写を調節する場合、該配列に機能可能であるように連結されており；またはリボソーム結合部位は、翻訳を可能にするように配置されている場合、コード配列に機能可能であるように連結されている。一般的に、機能可能であるように連結された、は、連続しており、そして分泌リーダーの場合、連続していて、そして同じ読み枠にあることを意味する。微生物において発現しようとするDCLポリペプチドまたは相同体をコードするDNA配列は、好ましくは、DNAのmRNAへの転写を未成熟に終結させる可能性があるイントロンをまったく含有しないであろう。

10

【0122】

細菌使用のための有用な発現ベクターは、周知のクローニングベクターpBR322（ATCC37017）の遺伝子要素を含んでなる商業的に入手可能なプラスミド由来の選択可能マーカーおよび細菌複製起点を含んでなることが可能である。こうした商業的なベクターには、例えば、pKK223-3（Pharmacia Fine Chemicals、スウェーデン・ウプサラ）およびpGEM1（Promega Biotech、米国ウィスコンシン州マディソン）が含まれる。これらのpBR322「主鎖」部分を適切なプロモーターおよび発現しようとする構造配列と組み合わせる。大腸菌は、典型的には、大腸菌種由来のプラスミドであるpBR322の誘導体を用いて形質転換される（Bollivarら、Gene 2:95, 1977）。pBR322は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性の遺伝子を含み、そしてしたがって形質転換細胞を同定する単純な手段を提供する。

20

【0123】

組換え微生物発現ベクターに通常用いられるプロモーターには、 β -ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）およびラクトースプロモーター系（Changら、Nature 275:615, 1978；およびGoeddelら、Nature 281:544, 1979）、トリプトファン（trp）プロモーター系（Goeddelら、Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980；およびEPA 36,776）およびtacプロモーター（Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p.412, 1982）が含まれる。特に有用な細菌発現系は、ファージ λ PLプロモーターおよびcI857ts熱不安定性リプレッサーを使用する。アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手可能な、 λ PLプロモーターの誘導体を組み込んだプラスミドベクターには、大腸菌株JMB9（ATCC 37092）に常住するプラスミドpHUB2および大腸菌RR1（ATCC 53082）に常住するpPLc28が含まれる。

30

【0124】

酵母ベクターの適切なプロモーター配列には、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（Hitzenmanら、J. Biol. Chem. 255:2073, 1980）または、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼなどの他の解糖酵素（Hessら、J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968；およびHollandら、Biochem. 17:4900, 1978）のプロモーターが含まれる。酵母発現に用いるのに適したベクターおよびプロモーターがR. Hitzenmanら、EPA-73,657にさらに記載される。

40

【0125】

大腸菌における選択および複製のため、pBR322由来のDNA配列（Amp^r遺伝子および複製起点）を、そしてグルコース抑制可能ADH2プロモーターおよび α -因子分

50

泌リーダーを含む酵母DNA配列を用いて、好ましい酵母ベクターを組み立てることが可能である。ADH2プロモーターは、Russellら(J. Biol. Chem. 258:2674, 1982)およびBeierら(Nature 300:724, 1982)に記載されている。異種タンパク質の分泌を指示する酵母 α -因子リーダーを、プロモーターおよび発現しようとする構造遺伝子の間に挿入することが可能である。例えば、Kurjanら, Cell 30:933, 1982; およびBitterら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330, 1984を参照されたい。リーダー配列を修飾して、その3'端近傍に、1以上の有用な制限部位を含有して、外来遺伝子へのリーダー配列の融合を容易にすることも可能である。

10

【0126】

脊椎動物細胞の形質転換に使用しようとする発現ベクター中の転写および翻訳調節配列は、ウイルス供給源より提供可能である。例えば、通常用いられるプロモーターおよびエンハンサーは、ポリオマウイルス、アデノウイルス2、シミアンウイルス40(SV40)、およびヒト・サイトメガロウイルス由来である。SV40ウイルスゲノム由来のDNA配列、例えばSV40起点、初期および後期プロモーター部位、エンハンサー部位、スプライシング部位、およびポリアデニル化部位を用いて、異種DNA配列の発現に必要な他の遺伝要素を提供可能である。初期および後期プロモーターは、どちらもSV40ウイルス複製起点をも含有する断片として容易にウイルスから得られるため、特に有用である(Fiersら, Nature 273:113, 1978)。SV40ウイルス複製起点部位に位置するHind III部位からBgl I部位に渡るおよそ250bpの配列が含まれていれば、より小さいまたはより大きいSV40断片もまた使用可能である。さらに、ウイルスゲノムプロモーター、調節配列および/またはシグナル配列も、こうした調節配列が選択した宿主細胞に適合するならば、利用可能である。典型的なベクターは、OkayamaおよびBerg(Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983)に開示するように構築可能である。

20

【0127】

C127ネズミ乳腺上皮細胞における哺乳動物受容体cDNAの安定した高レベル発現に有用な系は、実質的にCosmanら(Mol. Immunol. 23:935, 1986)に記載されるように構築可能である。DCLポリヌクレオチドの発現に好ましい真核ベクターは、pDC406(McMahanら, EMBO J. 10:2821, 1991)と称され、そして該ベクターには、SV40、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびエプスタイン-バーウイルス(EBV)由来の制御配列が含まれる。他の好ましいベクターには、pDC406由来のpDC409およびpDC410が含まれる。pDC410は、SV40ラージT抗原をコードする配列を用いて、EBV複製起点を置換することによって、pDC406から得た。pDC409は、マルチクロニング部位の外のBgl II制限部位が欠失され、マルチクロニング部位内のBgl II部位が唯一のものとなっている点で、pDC406と異なる。

30

【0128】

pDC406およびpDC409などの、EBV複製起点を含有する発現ベクターのエピソーム複製を可能にする、有用な細胞株は、CV-1/EBNA(ATCC CRL 10478)である。CV-1/EBNA細胞株は、エプスタイン-バーウイルス核抗原1(EBNA-1)をコードする遺伝子でCV-1細胞株をトランスフェクションすることによって得られたものであり、そしてヒトCMV極初期エンハンサー/プロモーターから駆動されてEBNA-1を恒常的に発現する。

40

【0129】

宿主細胞

形質転換宿主細胞は、組換えDNA技術を用いて構築され、そして本発明のタンパク質をコードする配列を含有する発現ベクターで形質転換されているかまたはトランスフェクションされている細胞である。形質転換宿主細胞は、所望のタンパク質(1以上のDCLポ

50

リペプチドまたはその相同体)を発現することが可能であるが、本発明のDNAをクローニングするかまたは増幅する目的のために形質転換されている宿主細胞は、タンパク質を発現する必要はない。発現されるタンパク質は、好ましくは、選択したDNAに応じて、培養上清中に分泌されるであろうが、細胞膜に沈着していることも可能である。

【0130】

ウイルスタンパク質を発現するのに適した宿主細胞には、適切なプロモーターの調節下の、原核生物、真核生物、細菌、酵母、昆虫、哺乳動物(ヒト、サル、類人猿、げっ歯類など)または他のより高次の真核細胞が含まれる。原核生物には、グラム陰性生物またはグラム陽性生物、例えば大腸菌またはバチルス属(*Bacillus*)種が含まれる。より高次の真核細胞には、以下に記載するような、哺乳動物起源の樹立細胞株が含まれる。細胞不含翻訳系もまた、本明細書に開示するDNA構築物由来のRNAを用いて、ウイルスタンパク質を産生するのに使用可能である。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主とともに使用するのに適したクローニングおよび発現ベクターは、Pouwelsら(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, エルゼビア, ニューヨーク州, 1985)に記載されており、該文献の関連する開示が本明細書に援用される。

10

【0131】

徹底的なタンパク質分解プロセッシングおよびジスルフィドプロセッシングを必要としないDCIまたは相同体の発現には、原核発現宿主が使用可能である。原核発現ベクターは、一般的に、1以上の表現型的に選択可能なマーカー、例えば抗生物質耐性を与えるタンパク質または独立栄養必要条件を供給するタンパク質をコードする遺伝子、および宿主に認識されて、宿主内での増幅を確実にする複製起点を含んでなる。形質転換に適した原核宿主には、大腸菌、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、並びにシュードモナス属(*Pseudomonas*)、ストレプトミセス属(*Streptomyces*)、およびブドウ球菌属(*Staphylococcus*)内の多様な他の種が含まれるが、好みの問題として、他のものもまた、使用可能である。

20

【0132】

組換えDCIポリペプチドはまた、酵母宿主、好ましくはサッカロミセス属(*Saccharomyces*)種由来、例えば、*S. cerevisiae*由来などの酵母宿主において発現可能である。ピキア属(*Pichia*)、クロイベロミセス属(*Kluyveromyces*)などの他の属の酵母もまた使用可能である。酵母ベクターは、一般的に、2 μ 酵母プラスミド由来の複製起点または自律複製配列(ARS)、プロモーター、ウイルスタンパク質をコードするDNA、ポリアデニル化および転写終結のための配列、並びに選択遺伝子を含むであろう。好ましくは、酵母ベクターには、酵母および大腸菌両方の形質転換を可能にする、複製起点および選択可能マーカー、例えば大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子および*S. cerevisiae* *trp1* 遺伝子が含まれ、該遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異株の選択マーカー、および下流の構造配列の転写を誘導する、高発現される酵母遺伝子由来のプロモーターを提供する。酵母宿主細胞ゲノムにおいて*trp1*破壊が存在すると、トリプトファンの非存在下、増殖によって、形質転換を検出するのに有効な環境が提供される。

30

40

【0133】

適切な酵母形質転換プロトコルが当業者に知られ；典型的な技術は、Hinnenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978に記載され、0.67%酵母窒素基剤、0.5%カザミノ酸, 2%グルコース, 10 μ g/ml アデニンおよび20 μ g/ml ウラシルからなる選択培地中で*Trp*⁺形質転換体に関して選択する。ADH2プロモーターを含んでなるベクターによって形質転換された宿主株は、80 μ g/ml アデニンおよび80 μ g/ml ウラシルを補った、1%酵母エキス、2%ペプトン、および1%グルコースからなるリッチ培地中で、発現のため、増殖させることが可能である。ADH2プロモーターの抑制解除(*derepression*

50

）は、培地からグルコースが枯渇したとき起こる。未精製酵母上清を、ろ過によって採取し、そしてさらなる精製前に4 で保持する。

【0134】

また、本発明の単離核酸を、1以上の昆虫発現ベクター中の適切な調節配列に機能可能であるように連結し、そして昆虫発現系を使用することによって、本発明のポリペプチドを産生することも可能である。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系の材料および方法は、例えばInvitrogen、米国カリフォルニア州サンディエゴ(Max Bac (登録商標)キット)のキット中で商業的に入手可能であるし、そしてこうした方法は、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin 第1555号(1987)、並びにLuckowおよびSummers, Bio/Technology 6:47(1988)に記載されるように、当該技術分野に周知である。細胞不含翻訳系もまた、本明細書に開示する核酸構築物由来のRNAを用いて、ポリペプチドを産生するのに使用可能である。

【0135】

多様な哺乳動物または昆虫細胞培養系を使用して、組換えタンパク質を発現することが可能である。昆虫細胞において、異種タンパク質を産生するためのバキュロウイルス系は、LuckowおよびSummers, Bio/Technology 6:47(1988)に概説される。適切な哺乳動物宿主細胞株の例には、サル腎臓細胞のCOS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzmanら, Cell 23:175, 1981)、L細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞または血清不含培地で増殖するVeggie CHOなどのその派生物および関連細胞株(Rasmussenら, 1998, Cytotechnology 28:31)、HeLa細胞、BHK(ATCC CRL 10)細胞株、アフリカミドリザル(African green monkey)腎臓細胞株CV1(ATCC CCL 70)由来であるCV1/EBNA細胞株(McMahanら, 1991, EMBO J. 10:2821, 1991)、293、293EBNAまたはMSR293などのヒト胎児腎臓細胞、ヒト上皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換霊長類細胞株、正常二倍体細胞、初代組織のin vitro培養由来の細胞株、初代外植片、HL-60、U937、HaKまたはJurkat細胞が含まれる。場合によって、多様なシグナル伝達またはレポーターアッセイにおいて、ポリペプチドを使用するのが望ましい場合、HepG2/3B、KB、NIH 3T3またはS49などの哺乳動物細胞株を、ポリペプチドの発現に使用することが可能である。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、発現しようとする遺伝子に連結された適切なプロモーターおよびエンハンサー、および他の5'または3'フランキング非転写配列などの非転写要素、並びに必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス・ドナー部位およびスプライス・アクセプター部位、および転写終結配列などの5'または3'非翻訳配列を含んでなることが可能である。

【0136】

DCLポリペプチドの精製

組換え合成の慣用法にしたがって、ポリペプチドを単離し、そして精製することもまた可能である。例えば、発現宿主の溶解物を調製することが可能であり、そしてHPLC、排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、または他の精製技術を用いて、溶解物を精製することが可能である。ほとんどの場合、用いる組成物は、産物の調製法およびその精製法に関連する混入物質に対して、所望の産物を、重量にして少なくとも20%、より一般的には、重量にして少なくとも約75%、好ましくは、重量にして少なくとも約95%、そして療法目的には、通常、重量にして少なくとも約99.5%含んでなるであろう。通常、割合は、総タンパク質に基づくであろう。

【0137】

精製DCLポリペプチド、変異体、相同体、または類似体は、適切な宿主/ベクター系を培養して、本発明のDNAの組換え翻訳産物を発現させ、これをその後、培地または細胞

抽出物から精製することによって調製される。例えば、組換えタンパク質を培地に分泌する系由来の上清は、まず、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば Amicon または Millipore Pellicon 限外ろ過装置を用いて濃縮可能である。

【0138】

濃縮工程に続いて、濃縮物を適切な精製マトリックスに適用することが可能である。例えば、適切なアフィニティマトリックスは、適切な支持体に結合した対構造 (counter structure) タンパク質または抗体分子を含んでなることが可能である。あるいは、陰イオン交換樹脂、例えばペンダントジエチルアミノエチル (DEAE) 基を有するマトリックスまたは支持体が可能である。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製に一般的に使用される他の種類であることが可能である。あるいは、陽イオン交換工程が可能である。適切な陽イオン交換体には、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含んでなる多様な不溶性マトリックスが含まれる。スルホプロピル基が好ましい。ゲルろ過クロマトグラフィーもまた、本発明のタンパク質を精製する手段を提供する。

10

【0139】

アフィニティークロマトグラフィーが、DCLポリペプチドおよびその変異体、相同体、または類似体の特に好ましい精製法である。例えば、免疫グロブリンFc領域を含んでなる融合タンパク質として発現されるDCLポリペプチドは、プロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製可能である。さらに、オリゴマー化ジッパードメインを含んでなるDCLタンパク質は、オリゴマー化ジッパードメインに特異的な抗体を含んでなる樹脂上で精製可能である。DCLタンパク質に対するモノクローナル抗体もまた、当該技術分野に周知の方法を利用することによって、アフィニティークロマトグラフィー精製において有用である可能性がある。炭水化物または糖タンパク質部分などのリガンドもまた、DCLのアフィニティ精製用のアフィニティマトリックスを調製するのに使用可能である。

20

【0140】

最後に、疎水性逆相高性能液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 媒体、例えばペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用する、1以上のRP-HPLC工程を使用して、DCL組成物をさらに精製することが可能である。多様な組み合わせの前述の精製工程のいくつかまたはすべてを使用して、均質な組換えタンパク質を提供することもまた可能である。

30

【0141】

細菌培養中で産生された組換えタンパク質を、通常、細胞ペレットからまず抽出して、その後、1以上の濃縮、塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィー工程を続けることによって、単離する。最後に、最終精製工程のため、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用することが可能である。組換えウイルスタンパク質の発現で使用する微生物細胞は、凍結融解サイクリング、超音波、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む、いかなる好適な方法によって、破壊することも可能である。

【0142】

分泌タンパク質として本発明のタンパク質を発現する酵母の発酵は、精製を非常に単純化する。大規模発酵から生じる、分泌される組換えタンパク質は、Urda lら (J. Chromatog. 296:171, 1984) に開示されるものと類似の方法によって精製可能である。この参考文献は、分取用HPLCカラム上での組換えヒトGM-CSF精製のための、2つの連続する逆相HPLC工程を記載する。

40

【0143】

組換え体培養において合成されるタンパク質は、本発明のタンパク質を培養から回収するのに採用される精製工程に応じる量および性質の、タンパク質を含む細胞構成要素の存在によって特徴付けられる。これらの構成要素は、通常、酵母、原核生物または非ヒトのより高次の真核起源のものであろうし、そして好ましくは、重量にして約1パーセント未満

50

の析の、無害な混入物質量で存在する。さらに、組換え細胞培養は、元来の種において、自然に見られるように、本発明のタンパク質と通常関連している可能性がある他のタンパク質を含まない、本発明のタンパク質の産生を可能にする。

【0144】

スクリーニングアッセイおよび方法

本発明は、DCLポリペプチドおよびDCL関連基質および/または結合パートナーの活性をアンタゴナイズするかまたはアゴナイズする分子(しばしば「試験化合物」と称される)に関するスクリーニング法を提供する。DCLポリペプチド活性には、限定されるわけではないが、抗原結合、インターナリゼーション、プロセッシングおよび提示; APC活性化、分化、成熟、ホーミングおよび遊出; 結合、および興奮性の方式または阻害性の方式いずれかでの細胞内シグナル伝達経路の調節を含む、細胞間相互作用、それらとともに自己分泌、傍分泌および/または内分泌様式で作用する因子の分泌を導く経路を通じた細胞外コミュニケーションが含まれる。DCLポリペプチドを発現するAPCに結合可能な細胞の例には免疫系の細胞が含まれ、DC、T細胞、B細胞、NK細胞とともにこれらの前駆細胞が含まれる。

10

【0145】

結合パートナーは、本明細書において、オリゴ糖、多糖、炭水化物、糖タンパク質、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ糖脂質等であることが可能な天然リガンドを含んでなることが可能であり; 好ましくは、天然リガンドは、細菌、ウイルス、真菌または原生動物ポリペプチドとともに、細胞膜会合ポリペプチドからなる群より選択される。結合パートナーはまた、DCL活性に対してアゴニスト性またはアンタゴニスト性いずれかである抗体を含んでなることも可能である。また、結合パートナーは、DCL天然リガンドの断片、誘導体、融合タンパク質またはペプチド擬似体を含んでなることが可能である。

20

【0146】

最も基本的な意味で、典型的なアッセイは、アゴニストまたはアンタゴニストの形であることが可能な、DCLポリペプチド活性を調節する試験化合物を同定する方法であって、試験化合物を1以上のDCLポリペプチドと混合し、そして試験化合物が、前記ポリペプチドのDCLポリペプチド活性を改変するかどうかを決定することを含んでなる前記方法を含んでなる。他の態様は、DCLポリペプチドの結合活性を阻害する化合物を同定する方法であって、試験化合物を1以上のDCLポリペプチドおよび前記ポリペプチドの結合パートナーと混合し、そして試験化合物が、前記ポリペプチドの結合活性を阻害するかどうかを決定することを含んでなる前記方法を含んでなる。

30

【0147】

さらなる態様には、特筆される生物学的読み取り値、例えばC型レクチン活性の調節などを用いて、活性化合物に関してスクリーニングする方法が含まれる。本出願全体で用いられるように、調節する、は、活性を増加させるかまたは減少させるかいずれかを意味する。さらなる態様は、生物学的読み取り値として、アスパルチルプロテアーゼ活性の調節を用いることが可能である。そして、さらなる態様において、生物学的読み取り値には、ITIM活性(それとともに、ITAMドメイン、およびSHP-1チロシンホスファターゼを含むチロシンホスファターゼなどの1以上のホスファターゼとの相互作用などの関連する経路)の調節が含まれる。

40

【0148】

本発明の方法を用いて、細胞、細胞不含調製物、化学薬品ライブラリー、cDNAライブラリー、組換え抗体ライブラリー(または抗体サブユニットを含んでなるライブラリー)および天然産物混合物から、DCLシグナル伝達活性のアンタゴニストおよびアゴニストを同定することが可能である。アンタゴニストおよびアゴニストは、本発明のポリペプチドの天然のまたは修飾された基質、リガンド、酵素、受容体などであることが可能であるし、あるいはDCLポリペプチドおよびその断片の1つの構造的模倣体または機能的模倣体であることが可能である。本発明の潜在的なアンタゴニストには、本発明のポリペプチドまたはその結合パートナーの結合部位に結合し、そして該部位を占め、その天然結合パ

50

ートナーに結合するのに利用不能にして、そしてこうして正常な生物学的活性を防止する、小分子、ペプチドおよび抗体を含むことが可能である。潜在的なアゴニストには、本発明のポリペプチドまたはその結合パートナーに結合して、そして本発明のポリペプチドの結合によって引き起こされるのと同じかまたはそれより増進された生物学的効果を引き出す、小分子、ペプチドおよび抗体が含まれる。

【0149】

1つの側面において、本発明の方法は、蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光分極、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動、シンチレーション近接アッセイ、レポーター遺伝子アッセイ、蛍光消光酵素基質、色素生産酵素基質および電気化学発光などの均質アッセイ形式を利用する。別の側面において、本発明の方法は、酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) またはラジオイムノアッセイなどの不均質アッセイ形式を利用する。本発明のさらに別の側面は、細胞に基づくアッセイ、例えばレポーター遺伝子を利用するものとともに、生物学的機能 (単数または複数) に対するアンタゴニストまたはアゴニストの影響を解析する機能アッセイである。

10

【0150】

小分子アゴニストおよびアンタゴニストは、通常、10 K分子量未満であり、そして細胞浸透を増進し、分解に抵抗し、そしてその生理学的半減期を延長する、いくつかの物理化学的特性および薬理学的特性を所持することが可能である (Gibbs, J., *Pharmaceutical Research in Molecular Oncology*, Cell, Vol. 79 (1994))。損なわれていない分子とともに、FabおよびF(ab')₂断片などの断片、それとともにそれに由来する組換え分子 (ファージ上で発現される抗体、細胞内発現抗体 (intrabody)、scFvなどの一本鎖抗体および当該技術分野で知られる免疫グロブリン由来の他の分子を含む) を含む抗体を用いて、シグナル伝達カスケードの伝播を遮断することによって、本発明のポリペプチドに結合し、そして該ポリペプチドを阻害することが可能である。抗体がヒト化されていることが好ましく、そしてより好ましくは、抗体はヒトである。本発明の抗体は、多様な周知の方法のいずれかによって調製可能である。

20

【0151】

本明細書において、DCLアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性に関して試験しようとする、「試験化合物」とも称される、候補分子のさらなる例には、限定されるわけではないが、炭水化物、小分子 (通常、有機分子またはペプチド)、タンパク質、および核酸分子 (典型的には8~30核酸残基からなるオリゴヌクレオチド断片を含む) が含まれる。試験しようとするペプチドは、典型的には、5~25アミノ酸残基からなる。また、候補核酸分子は、アンチセンス核酸配列であることが可能であり、そして/またはリボザイム活性を所持することが可能である。DCLアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性に関してアッセイ可能な候補分子にはまた、限定されるわけではないが、Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス)、Arqule (マサチューセッツ州ウォバーン)、EnzyMed (アイオワ州アイオワシティ)、Maybridge Chemical Co. (英国コーンウォール州トレビレット)、MDS Panlabs (ワシントン州ボセル)、Pharmacopeia (ニュージャージー州プリンストン)、およびTrega (カリフォルニア州サンディエゴ) などの会社から、しばしば大きいコンビナトリアルケミストリー化合物「ライブラリー」の一部として、商業的に入手可能なものなどの小有機分子が含まれることが可能である。天然産物、無機化学薬品、並びにタンパク質および毒素などの生物学的活性物質を含む化合物もまた、これらの方法を用いて、DCL関連細胞事象を調節する能力に関して、アッセイすることが可能である。

30

40

【0152】

特異的スクリーニング法が当該技術分野に知られ、そして統合されたロボット系および化学的化合物/天然産物のコレクションを高処理スクリーニングに大規模に取り込んで、短時間で、アンタゴニスト活性またはアゴニスト活性に関して、多数の試験化合物を試験することが可能である。これらの方法には、蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光分極、時間分解

50

蛍光共鳴エネルギー移動、シンチレーション近接アッセイ、レポーター遺伝子アッセイ、蛍光消光酵素基質、色素生産酵素基質および電気化学発光などの均質アッセイ形式とともに、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）またはラジオイムノアッセイなどの、より伝統的な不均質アッセイ形式が含まれる。均質アッセイが好ましい。本明細書にやはり含まれるのは、細胞に基づくアッセイ、例えばレポーター遺伝子を利用するアッセイとともに、生物学的機能（単数または複数）（例えば基質のリン酸化、サイトカインまたは増殖因子の分泌、細胞または組織の増殖および/または分化等）に対するアンタゴニストまたはアゴニストの影響を解析する機能アッセイである。

【0153】

さらに、スクリーニングアッセイの組み合わせを用いて、DCLの生物学的活性を制御する分子を発見することが可能である。ポリペプチドの生物学的活性を制御する分子は、該ペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして有用である可能性がある。多様なアッセイの組み合わせを用いる際、通常、高処理スクリーニングに受け入れられるアッセイを用いることによって、候補分子がポリペプチドに結合するかどうかをまず決定する。この方式で同定される結合候補分子をその後、生物学的アッセイに添加して、生物学的影響を決定する。結合し、そして生物学的活性にアゴニスト性またはアンタゴニスト性の影響を有する分子は、ポリペプチド（単数または複数）が関連付けられる疾患または状態を治療するかまたは防止するのに有用であろう。

10

【0154】

一般的に、アンタゴニストは、活性を少なくとも30%阻害するであろうし；より好ましくは、アンタゴニストは、活性を少なくとも50%阻害するであろうし、最も好ましくは、活性を少なくとも90%阻害するであろう。同様に、アゴニストは、活性を少なくとも20%増進するであろうし；より好ましくは、アゴニストは、活性を少なくとも30%増進するであろうし、最も好ましくは、活性を少なくとも50%増進するであろう。当業者は、それぞれ、異なるレベルのアゴニズムおよびアンタゴニズムを持つアゴニストおよび/またはアンタゴニストが異なる適用（すなわち異なる疾患状態の治療）に有用である可能性があることを認識するであろう。

20

【0155】

均質アッセイは、ロボット適用に非常に受け入れやすい、混合および読み取り形式のアッセイであり、一方、不均質アッセイは、ろ過、遠心分離または洗浄などの、より複雑な単位操作によって、結合した分析物から未結合のものを分離することが必要である。これらのアッセイを利用して、非常に多様な特異的生体分子相互作用（タンパク質-タンパク質、受容体-リガンド、酵素-基質などを含む）、および小有機分子によるその阻害を検出する。これらのアッセイ法および技術は当該技術分野に周知である（例えばHigh Throughput Screening: The Discovery of Bioactive Substances, John P. Devlin（監修）, Marcel Dekker, ニューヨーク, 1997 ISBN: 0-8247-0067-8を参照されたい）。本発明のスクリーニングアッセイは、化学薬品ライブラリーの高処理スクリーニングに受け入れやすく、そして天然または合成の小分子薬剤候補、抗体、ペプチド、および他のアンタゴニストおよび/またはアゴニストの同定に適している。

30

40

【0156】

こうしたアッセイの1つは、2つの蛍光標識、エネルギーを供与する長命キレート標識および短命有機アクセプター間の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET；例えばHTRF（登録商標）、Packard Bioscience Company、コネティカット州メリデン；LANCETTM、PerkinElmer Life Sciences、Wallac Oy、フィンランド・トゥルク）である。エネルギー移動は、DCLおよび基質および/または結合パートナー間の分子相互作用を介して、2つの標識がごく近接した際に起こる。DCLおよび基質および/または結合パートナーの阻害を検出するFRETアッセイにおいて、ユーロピウムキレートまたはクリプタート標識DCLまたは基質およ

50

び／または結合パートナーがエネルギードナーとして働き、そして適切な結合パートナー（すなわちDCLが標識されている場合は基質および／または結合パートナー、あるいは基質または結合パートナーが標識されている場合はDCL）に結合したストレプトアビジン標識アロフィコシアニン（APC）がエネルギーアクセプターとして働く。DCLが基質および／または結合パートナーに会合すると、ドナー分子およびアクセプター分子が近接して、そしてエネルギー移動が起こり、665nmの蛍光シグナルが生じる。したがって、DCLおよび基質および／または結合パートナーの相互作用のアンタゴニストは、蛍光シグナルを阻害するであろうし、一方、この相互作用のアゴニストは、蛍光シグナルを増進するであろう。

【0157】

別の有用なアッセイは、生物発光共鳴エネルギー移動アッセイ、またはBRETアッセイであり、実質的にXuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:151 (1999)に記載されるとおりのアッセイである。FRETアッセイ同様、BRETは、生物発光ドナーから蛍光アクセプタータンパク質へのエネルギー移動に基づく。しかし、緑色蛍光タンパク質（GFP）をアクセプター分子として用いて、励起光供給源の必要性を排除する。典型的なBRETアッセイには、Packard Bioscience、コネティカット州メリデンのBRETおよびBRET²が含まれる。

【0158】

DELFLIA（登録商標）（解離化増進ランタニド蛍光免疫アッセイ；PerkinElmer Life Sciences、Wallac Oy、フィンランド・トゥルク）は、ランタニドキレートの時間分解蛍光光度解析に基づく固相アッセイである（例えば米国特許第4,565,790号、1986年1月21日発行を参照されたい）。この種のアッセイには、マイクロウェルプレート（第一のタンパク質（NEMOまたはCYLD）でコーティングする。結合パートナー（それぞれ、DCLまたはDCLの基質および／または結合パートナー）をユーロピウムキレートまたはクリプタートにコンジュゲート化し、そしてプレートに添加する。適切なインキュベーション後、プレートを洗浄し、そして固相結合タンパク質からユーロピウムイオンを解離させる溶液を添加して、溶液に存在する、リガンドを伴う高い蛍光のキレートを形成し、その後、VICTOR²™（PerkinElmer Life Sciences、Wallac Oy、フィンランド・トゥルク）プレート読み取り装置などの読み取り装置を用いてプレートを読み取り、615nmの発光を検出する。

【0159】

本発明で有用である可能性がある別のアッセイは、FlashPlate（登録商標）（Packard Instrument Company、イリノイ州）に基づくアッセイである。このアッセイは、化合物が、タンパク質-タンパク質相互作用を阻害する能力を測定する。FlashPlate（登録商標）を、第一のタンパク質（DCLまたはDCLの基質および／または結合パートナーいずれか）でコーティングし、その後、洗浄して過剰なタンパク質を除去する。該アッセイには、試験しようとする化合物を、第二のタンパク質（プレートがDCLでコーティングされている場合はDCLの基質および／または結合パートナー、あるいはプレートがDCLの基質または結合パートナーでコーティングされている場合はDCL）、およびI¹²⁵標識した、第二のタンパク質に対する抗体とインキュベーションし、そしてプレートに添加する。適切なインキュベーションおよび洗浄後、シンチレーションカウンター（MicroBeta（登録商標）カウンター；PerkinElmer Life Sciences、Wallac Oy、フィンランド・トゥルク）を用いて、放射能結合の量を測定する。

【0160】

AlphaScreenTMアッセイ（Packard Instrument Company、コネティカット州メリデン）。AlphaScreenTM技術は「増幅発光近接均質アッセイ」法であり、光増感剤（ドナービーズ）、または化学発光基および蛍光アクセプター分子（アクセプタービーズ）を含有する、ラテックス微小ビーズ（直径250nm

10

20

30

40

50

m) を利用する。680 nm のレーザー光で照射した際、ドナービーズ中の光増感剤は、周囲酸素を一重項状態酸素に変換する。励起した一重項状態酸素分子は、迅速に崩壊する前に、およそ 250 nm (1 ビーズ直径) に散乱する。アクセプタービーズがドナービーズにごく近接している場合 (すなわち DCL および DCL の基質および / または結合パートナーの相互作用による)、一重項状態酸素分子がアクセプタービーズ中の化学発光基と反応し、これが直ちに同じビーズの蛍光アクセプターにエネルギーを移動させる。これらの蛍光アクセプターは、発光波長を 520 ~ 620 nm にシフトさせ、検出可能なシグナルが生じる。こうして、DCL および DCL の基質および / または結合パートナーの相互作用のアゴニストは、発光波長のシフトを阻害するであろうし、一方、この相互作用のアゴニストは、このシフトを増進するであろう。

10

【0161】

DCL ファミリーのポリペプチドおよびその断片を用いて、結合パートナーを同定することが可能である。例えば、適切なアッセイいづれか、例えば慣用的な結合アッセイとともに酵母ツーハイブリッドシステムで、候補結合パートナーに結合する能力に関して、これらを試験することが可能である。例えば、DCL ポリペプチドを検出可能試薬 (例えば放射性核種、発色団、比色反応または蛍光定量反応を触媒する酵素等) で標識することが可能である。候補結合パートナーを発現している細胞と、標識したポリペプチドを接触させる。その後、細胞を洗浄して、未結合の標識したポリペプチドを除去し、そして標識の性質にしたがって選択した、適切な技術によって、細胞結合標識の存在を決定する。

20

【0162】

結合アッセイ法の 1 つの例は以下のとおりである。候補結合パートナー cDNA を含有する組換え発現ベクターを構築する。10 cm² プレート中の CV1 - EBNA - 1 細胞をこの組換え発現ベクターでトランスフェクションする。CV - 1 / EBNA - 1 細胞 (ATCC CRL 10478) は、CMV 極初期エンハンサー / プロモーターから駆動される EBV 核抗原 1 を恒常的に発現する。CV1 - EBNA - 1 は、Mc Mahan ら (EMBO J. 10: 2821, 1991) に記載されるように、アフリカミドリザル腎臓細胞株 CV - 1 (ATCC CCL 70) 由来であった。トランスフェクション細胞を 24 時間培養し、そして各プレート中の細胞をその後、24 ウェルプレートに分ける。さらに 48 時間培養した後、トランスフェクション細胞 (約 4 × 10⁴ 細胞 / ウェル) を BM - NFD M で洗浄する。BM - NFD M は 50 mg / ml 脱脂粉乳が添加されている結合培地 (25 mg / ml ウシ血清アルブミン、2 mg / ml アジ化ナトリウム、20 mM Hepes pH 7.2 を含有する RPMI 1640) である。該細胞をその後、多様な濃度の、例えば上述のように作成した可溶性ポリペプチド / Fc 融合ポリペプチドと、37 °C で 1 時間インキュベーションする。細胞をその後、洗浄し、そして結合培地中で、¹²⁵I マウス抗ヒト IgG の一定の飽和濃度で、穏やかに攪拌しながら 37 °C で 1 時間インキュベーションする。徹底した洗浄の後、トリプシン処理を介して細胞を遊離させる。上に使用するマウス抗ヒト IgG は、ヒト IgG の Fc 領域に対して向けられ、そして Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.、ペンシルバニア州ウェストグローブから得ることが可能である。抗体は標準的クロアミン - T 法を用いて放射ヨウ素標識される。該抗体は、細胞に結合しているいかなるポリペプチド / Fc ポリペプチドの Fc 部分にも結合するであろう。すべてのアッセイにおいて、¹²⁵I 抗体の非特異的結合を Fc 融合ポリペプチド / Fc の非存在下でアッセイするとともに、Fc 融合ポリペプチドおよび 200 倍のモル過剰の非標識マウス抗ヒト IgG 抗体の存在下でもアッセイする。細胞結合 ¹²⁵I - 抗体は、Packard Auto gamma カウンターで定量化する。親和性計算 (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660, 1949) は Microvax コンピューター上で実行される RS / 1 (BBN Software、マサチューセッツ州ボストン) 上で生み出される。結合はまた、高処理スクリーニング法に適した方法を用いても検出可能であり、これらの方法は例えばシンチレーション近接アッセイ (Udenfriend ら, 1985, Proc Natl Acad Sci USA 82: 50

30

40

50

8672 - 8676)、均質時間分解蛍光法(Parkら, 1999, Anal Biochem 269:94-104)、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法(Clegg RM, 1995, Curr Opin Biotechnol 6:103-110)、または、例えばBiacore AB(スウェーデン・ウプサラ)に供給されるものなどのバイオセンサーを用いて、結合されたポリペプチドを潜在的な結合パートナーに曝露した際の表面プラズモン共鳴のいかなる変化も測定する方法である。

【0163】

試験化合物に関するスクリーニングに、酵母ツーハイブリッドまたは「相互作用捕捉」アッセイを用いることが可能である。DCLポリペプチドが別のポリペプチドに結合するか、または結合する可能性がある場合、DCLポリペプチドをコードする核酸もまた、相互作用捕捉アッセイ(例えばGyurisら, Cell 75:791-803(1993))に記載するものなどに使用して、結合が生じる他のポリペプチドをコードする核酸を同定するか、または結合相互作用の阻害剤を同定するのに使用可能である。これらの結合相互作用に關与するポリペプチドもまた、結合相互作用のペプチドまたは小分子阻害剤またはアゴニストに関してスクリーニングするのに使用可能である。

10

【0164】

適切な結合アッセイの別の種類は、競合的結合アッセイである。例えば、変異体の候補結合パートナーへの結合に関して、天然ポリペプチドと競合する能力をアッセイすることによって、変異体の生物学的活性を決定可能である。競合的結合アッセイは慣用的方法論によって実行可能である。競合的結合アッセイに使用可能な試薬には、放射標識DCL、および細胞表面にDCL(内因性または組換え体)を発現している、損なわれていない細胞が含まれる。例えば、放射標識可溶性DCL断片を用いて、細胞表面受容体への結合に関して、可溶性DCL変異体と競合させることが可能である。損なわれていない細胞の代わりに、Fc部分とポリペプチドAまたはポリペプチドG(固相上)の相互作用を通じて固相に結合させた、可溶性結合パートナー/Fc融合ポリペプチドを使用可能である。ポリペプチドAおよびポリペプチドGを含有するクロマトグラフィーカラムには、Pharmacia Biotech, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイから入手可能なものが含まれる。

20

【0165】

試験化合物に関してスクリーニングするのに、細胞増殖、細胞死、細胞分化および細胞接着アッセイもまた使用可能である。本発明のDCLポリペプチド、その断片および/または誘導体は、サイトカイン、細胞増殖(誘導または阻害いずれか)、または細胞分化(誘導または阻害いずれか)活性を示す可能性があり、あるいは特定の細胞集団において、他のサイトカイン、ケモカインまたは他の可溶性因子の産生を誘導することが可能である。現在までに発見されている多くのポリペプチド因子は、1以上の因子に依存する細胞増殖アッセイにおいて、こうした活性を示しており、そしてしたがって、これらのアッセイは、細胞刺激活性の好適な確認として働く。本発明のDCLのアゴニストおよび/またはアンタゴニストの活性は、限定なしに、32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+(プレB M+)、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTL2、TF-1、Mo7eおよびCMKを含む細胞株に關する、日常的な因子に依存するいくつかの細胞増殖アッセイのいずれか1つによって立証される。本発明のDCLポリペプチドの活性は、他の手段の中で、以下の方法によって測定可能である：

30

40

脾臓細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および/または増殖に関するアッセイには、限定なしに：KruisbeekおよびShevach, 1994, Polyclonal T cell stimulation, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, トロント; およびSchreiber, 1994, Measurement of mouse and human interferon gamma. Curr

50

ent Protocols in Immunology 中, Coliganら監修, Vol 1 pp. 6.8.1 - 6.8.8, John Wiley and Sons, トロントに記載されるものが含まれる。

【0166】

細胞移動および接着に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第6.12章, Measurement of alpha and beta chemokines. 6.12.1 - 6.12.28); Taubら J. Clin. Invest. 95:1370 - 1376, 1995; Lindら APM 103:140 - 146, 1995; Mullerら Eur. J. Immunol. 25:1744 - 1748; Gruberら J Immunol. 152:5860 - 5867, 1994; Johnstonら J Immunol. 153:1762 - 1768, 1994に記載されるものが含まれる。

【0167】

受容体 - リガンド活性に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第7.28章, Measurement of cellular adhesion under static conditions 7.28.1 - 7.28.22)、Takaiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6864 - 6868, 1987; Biererら, J. Exp. Med. 168:1145 - 1156, 1988; Rosensteinら, J. Exp. Med. 169:149 - 160, 1989; Stolttenborgら, J. Immunol. Methods 175:59 - 68, 1994; Stittら, Cell 80:661 - 670, 1995に記載されるものが含まれる。

【0168】

本発明の方法を用いて、DCL依存性細胞反応を仲介する1以上のタンパク質をコードする1以上のmRNA分子の機能的発現を阻害するアンチセンス分子に関して、スクリーニングすることが可能である。アンチセンス核酸分子は、転写に関して通常の方法と比較して反転しており、そしてしたがって宿主細胞内で発現される標的mRNA分子に相補的であるRNA転写物を発現する(すなわちアンチセンス核酸分子のRNA転写物は、ワトソン・クリック塩基対形成を通じて、標的mRNA分子にハイブリダイズ可能である)。標的タンパク質の発現に干渉することが可能であるならば、いくつかの異なる方法で、アンチセンス核酸分子を構築可能である。スクリーニングしようとする典型的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、長さ30～40ヌクレオチドである。アンチセンス核酸分子は、一般的に、標的遺伝子と実質的に同一(しかしアンチセンス方向である)であろう。最少同一性は、典型的には約65%より大きいであろうが、同一性がより高いと、内因性配列発現の抑制がより有効である可能性がある。約80%より高い、実質的により高い同一性が好ましいが、約95%から絶対的な同一性が最も好ましいであろう。

【0169】

候補核酸分子は、リボザイム活性を所持することが可能である。したがって、本発明の方法を用いて、CD40依存性細胞反応を仲介する1以上のタンパク質をコードする1以上のmRNA分子の機能的発現を阻害するリボザイム分子に関して、スクリーニングすることが可能である。リボザイムは触媒性RNA分子であり、リボザイムの配列に完全にまたは部分的に相同である配列を有する核酸分子を切断することが可能である。標的RNAと特異的に対形成し、そして特定の位置でホスホジエステル主鎖を切断して、それによって標的RNAを機能的に不活性化するRNAリボザイムをコードする、リボザイム導入遺伝子进行を設計することが可能である。この切断を行う際、リボザイム自体は改変されず、そしてしたがって再利用され、そして他の分子を切断することが可能である。アンチセンスR

N A 内にリボザイム配列を含むと、RNA 切断活性が与えられ、それによって、アンチセンス構築物の活性が増加する。標的 RNA 特異的リボザイムの設計および使用が Haseloff ら (Nature, 334:585, 1988; 米国特許第 5,646,023 号もまた参照されたい) に記載され、これらの刊行物はどちらも本明細書に援用される。Tabler ら (Gene 108:175, 1991) は、アンチセンス RNA およびリボザイム技術の利点を単一の構築物中で組み合わせることによって、触媒性 RNA の構築を非常に単純化した。リボザイム触媒作用には、相同性のより小さい領域しか必要とされず、したがって、切断部位が保存されているならば、大きな遺伝子ファミリーの異なるメンバーの抑制を促進することが可能である。

【0170】

10

合理的薬剤設計

合理的薬剤設計の目的は、生物学的に活性である目的のポリペプチドまたはそれらが相互作用する小分子、例えば阻害剤、アゴニスト、アンタゴニスト等の構造的類似体を產生することである。これらの例いづれかを用いて、活性化化合物の、より活性であるかまたは安定な型である薬剤、あるいは *in vivo* で DCL 活性化化合物の機能を増進するかまたは該機能に干渉する薬剤を形作ることが可能である (Hodgson J (1991) Biotechnology 9:19-21)。1つのアプローチにおいて、X 線結晶学によって、核磁気共鳴によって、またはコンピューター相同性モデリングによって、あるいは最も典型的には、これらのアプローチの組み合わせによって、目的の活性化化合物の三次元構造を決定する。分子の構造を解明し、そして分子の活性部位 (単数または複数) を決定するため、活性化化合物の形状および荷電両方を確定しなければならない。より頻繁でないが、相同ポリペプチドの構造に基づいてモデリングすることによって、ポリペプチドの構造に関する有用な情報が得られる可能性がある。どちらの場合も、適切な構造情報を用いて、類似の DCL 様分子を設計するか、有効な阻害剤を同定するか、あるいは DCL ポリペプチドまたは DCL 会合基質および / または結合パートナーに結合する小分子を同定する。合理的薬剤設計の有用な例には、Braxton S および Wells JA (1992 Biochemistry 31:7796-7801) に示すように、改善された活性または安定性を有する分子、あるいは Athauda SB ら (1993 J Biochem 113:742-746) に示すように、天然ペプチドの阻害剤、アゴニスト、またはアンタゴニストとして作用する分子が含まれる。アゴニストおよび / またはアンタゴニスト設計、並びにアゴニスト / アンタゴニスト - DCL ポリペプチド相互作用研究を補助するための、分子モデリングソフトウェア系における、DCL ポリペプチド構造情報の使用もまた、本発明に含まれる。本発明の特定の方法は、基質のありうる結合部位に関して、DCL ポリペプチドの三次元構造を解析し、予測される反応部位を取り込んだ新規分子を合成し、そして本明細書にさらに記載するように、新規分子をアッセイすることを含んでなる。

20

30

【0171】

本明細書にさらに記載するような、機能アッセイによって選択される、標的特異的抗体を単離し、そしてその後、結晶構造を解析することもまた可能である。このアプローチによって、原則として、続く薬剤設計の基礎とすることが可能なファーマコア (pharmacore) を得る。機能する薬理学的活性抗体に対する抗イディオタイプ抗体 (anti-id) を生成することによって、ポリペプチド結晶学を完全に回避することが可能である。鏡像の鏡像として、anti-id の結合部位は、元来の抗原の類似体であると予測されるであろう。次いで、anti-id を用いて、化学的または生物学的に産生したペプチドのバンクからペプチドを同定し、そして単離することが可能である。その後、単離ペプチドは、ファーマコアとして働くであろう。

40

【0172】

本発明の精製 DCL ポリペプチド (ポリペプチドおよびその断片、突然変異タンパク質、変異体、オリゴマー、融合タンパク質、および他の型を含む) は、多様なアッセイで有用である。例えば、本発明の DCL 分子を用いて、DCL ポリペプチドの結合パートナーが

50

同定可能であり、この結合パートナーをまた用いて、細胞間コミュニケーション、細胞刺激、または免疫細胞活性を調節可能である。あるいは、これらを用いて、細胞間コミュニケーション、細胞刺激経路、または免疫細胞活性を調節する、非結合パートナー分子または物質を同定可能である。

【0173】

療法適用

本明細書に提供する方法は、患者にDCLポリペプチドおよび/またはそのアゴニストおよび/またはアンタゴニストを投与し、それによって、次に特定の条件において役割を果たす、抗原提示細胞上のDCLタンパク質に仲介される生物学的反応を調節することを含んでなる。特定の条件において役割を果たす可能性があるDCLポリペプチド活性には、限定されるわけではないが、抗原結合、インターナリゼーション、プロセッシングおよび提示；APC活性化、分化、成熟、ホーミングおよび遊出；結合、および興奮性の方式または阻害性の方式いずれかでの細胞内シグナル伝達経路の調節を含む、細胞間相互作用、それらとともに、自己分泌、傍分泌および/または内分泌様式で作用する因子の分泌を導く経路を通じた細胞外コミュニケーションが含まれる。DCLポリペプチドを発現しているAPCに結合可能な細胞の例には免疫系の細胞が含まれ、DC、T細胞、B細胞、NK細胞とともにその前駆細胞が含まれる。

10

【0174】

治療には、障害の少なくとも1つの症状の軽減、または疾患重症度の減少などを含む。アンタゴニストは、発展しうる療法剤の構成要素となるために、完全な「治癒」を達成する必要はなく、あるいは疾患のすべての症状または徴候を根絶する必要はない。適切な分野で認識されるように、療法剤として使用される薬剤は、既定の疾患状態の重症度を減少させることが可能であるが、有用な療法剤であるとみなされるために、疾患のすべての徴候を根絶する必要はない。

20

【0175】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを用いて、感染性病原体と関連する疾患状態を治療するか、または予防するとともに、感染性病原体に対する免疫反応を増大させることが可能である。1つの態様において、DCLポリペプチドを発現するAPC、好ましくはDCに、細菌抗原および/またはウイルス抗原をターゲティングする。本発明は、APCに細菌抗原および/またはウイルス抗原をターゲティングする組成物を提供する。例えば、1以上のDCLポリペプチドアゴニストを、1以上の細菌抗原またはウイルス抗原に結合させるか、あるいは化学的に連結するか、またはカップリングして、そして*in vivo*で、または確立された*ex vivo*法によって、DCLポリペプチドを発現しているAPCにおいて、抗原取り込みおよび抗原提示を促進するために、こうした治療が必要な患者に投与する。DCLアゴニストの例には、例えば、抗DCL抗体、またはその誘導体、DCL天然リガンド、またはその誘導体およびペプチド擬似体とともに、抗天然リガンド抗体に対して向けられる抗イディオタイプ抗体が含まれる。

30

【0176】

本発明はまた、感染性病原体と関連する疾患状態を治療するかまたは予防するとともに、感染性病原体に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の細菌抗原またはウイルス抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなる前記方法も提供する。

40

【0177】

別の態様において、本発明は、感染性病原体に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の細菌抗原またはウイルス抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなり、ここでDCLポリペプチドがまた、末梢リンパ節に位置するT細胞およびB細胞への抗原提示のため、末梢リンパ節までの輸送も容易にする、前記方法を提供する。さらなる態様において、DCLアゴニストを用いて、APC輸送パターンを、

50

排出リンパ節、脾臓等への優先的な輸送など、選択した特定の臓器への輸送に改変することが可能である。

【0178】

さらに別の態様において、本発明は、感染性病原体に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の細菌抗原またはウイルス抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなり、ここでDCLポリペプチドがまた、T細胞への抗原提示のため、末梢リンパ節までの輸送も容易にし、そしてDCLポリペプチドがまた、T細胞に結合し、そして該細胞を同時刺激するのも容易にする、前記方法を提供する。

【0179】

感染性ウイルスの例には：レトロウイルス科（例えばヒト免疫不全ウイルス、例えばHIV-1（HTLV-II、LAVまたはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIとも称される；および他の単離体、例えばHIV-LP））；ピコルナウイルス科（例えばポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒト・コクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（Calci viridae）（例えば胃腸炎を引き起こす株）；トガウイルス科（例えばウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（例えばデング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス）；コロナウイルス科（例えばコロナウイルス）；ラブドウイルス科（例えば水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（例えばエボラウイルス）；パラミクソウイルス科（例えばパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；オルトミクソウイルス科（例えばインフルエンザウイルス）；ブニヤウイルス科（例えばハンタンウイルス、ブンガウイルス（bunga virus）、フレボウイルスおよびナイロウイルス（Nairo virus））；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（例えばレオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス）；ビルナウイルス科；ヘパドナウイルス科（B型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（大部分のアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（単純ヘルペスウイルス（HSV）1および2、水痘・帯状ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス）；ポックスウイルス科（天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；およびイリドウイルス科（例えばアフリカ・ブタ熱ウイルス）；並びに未分類のウイルス（例えば海綿状脳症の病因学的作用因子、デルタ肝炎の病原体（B型肝炎ウイルスの不全付随体と考えられる）、非A非B肝炎の病原体（クラス1＝体内感染；クラス2＝非経口感染（すなわちC型肝炎））；ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、並びにアストロウイルス（astrovirus））が含まれる。

【0180】

感染性細菌の例には：ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）、ライム病ボレリア（*Borrelia burgdorferi*）、レジオネラ・ニューモフィラ菌（*Legionella pneumophila*）、マイコバクテリア属種（*Mycobacteria* spp）（ヒト型結核菌（*M. tuberculosis*）、鳥型結核菌（*M. avium*）、*M. イントラセルラレ*（*M. intracellulare*）、*M. カンサシ*（*M. kansaii*）、*M. ゴルドネ*（*M. gordonae*）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、淋菌（*Neisseria gonorrhoeae*）、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）、単球症リステリア（*Listeria monocytogenes*）、化膿連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）（A群連鎖球菌）、ストレプトコッカス・アガラクティエ（*Streptococcus agalactiae*）（B群連鎖球菌）、連鎖球菌属（*Streptococcus*）（ピリダンス群）、糞便連鎖球菌（*Streptococcus faecalis*）、ウシ連鎖球菌（*Streptococcus bovis*）、連鎖球菌属（嫌気性種

10

20

30

40

50

)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター属 (*Campylobacter*) 種、腸球菌属 (*Enterococcus*) 種、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム属種、ブタ丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringers*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、パスツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*) 種、フソバクテリウム・ヌクレアツム (*Fusobacterium nucleatum*)、ストレプトバチルス・モニリフォルミス (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、フランベジア・トレポネーマ (*Treponema pertenuae*)、レプトスピラ属 (*Leptospira*)、およびイスラエル放線菌 (*Actinomyces israelii*) が含まれる。

10

【0181】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを用いて、真菌感染または寄生虫侵襲に関連する疾患状態を治療し、それとともに、これらの障害に対する免疫反応を増大させることが可能である。1つの態様において、DCLポリペプチドを発現しているAPC、好ましくはDCに、真菌抗原または寄生虫抗原をターゲティングする。したがって、本発明は、APCに真菌抗原または寄生虫抗原をターゲティングする組成物を提供する。1以上のDCLポリペプチドアゴニストを、1以上の真菌抗原または寄生虫抗原に結合させるか、あるいは化学的に連結するか、またはカップリングして、そしてin vivoで、または確立されたex vivo法によって、DCLポリペプチドを発現しているAPCにおいて、抗原取り込みおよび抗原提示を促進するために、こうした治療が必要な患者に投与する。DCLアゴニストの例には、例えば、抗DCL抗体、またはその誘導体、DCL天然リガンド、またはその誘導体およびペプチド擬似体、並びに抗天然リガンド抗体に対して向けられる抗イディオタイプ抗体が含まれる。

20

【0182】

本発明はまた、真菌感染または寄生虫侵襲に関連する疾患状態を治療するとともに、真菌感染または寄生虫侵襲に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の真菌抗原または寄生虫抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなる前記方法も提供する。

30

【0183】

別の態様において、本発明は、真菌感染または寄生虫侵襲に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の真菌抗原または寄生虫抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなり、ここでDCLポリペプチドがまた、末梢リンパ節に位置するT細胞およびB細胞への抗原提示のため、末梢リンパ節までの輸送も容易にする、前記方法を提供する。

40

【0184】

さらに別の態様において、本発明は、真菌感染または寄生虫侵襲に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の真菌抗原または寄生虫抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなり、ここでDCLポリペプチドがまた、T細胞への抗原提示のため、末梢リンパ節までの輸送も容易にし、そしてDCLポリペプチドがまた、T細胞に結合し、そして該細胞を同時刺激するのも容易にする、前記方法を提供する。

【0185】

50

感染性生物の例には、限定されるわけではないが、クリプトコッカス・ネオフォルマンス (Cryptococcus neoformans)、ヒストプラズマ・カプスラツム (Histoplasma capsulatum)、コクシジオイデス・イミチス (Coccidioides immitis)、皮膚プラストミセス (Blastomyces dermatitidis)、トラコーマ・クラミジア (Chlamydia trachomatis)、鵝口瘡カンジダ (Candida albicans) 等が含まれることが可能である。感染性生物の例には、熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) およびトキソプラズマ (Toxoplasma gondii) が含まれる。

【0186】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを用いて、多様な血液学的障害および腫瘍学的障害に関連する疾患状態を治療するとともに、これらの障害に対する免疫反応を増大させることが可能である。1つの態様において、DCLポリペプチドを発現しているAPC、好ましくはDCに、腫瘍抗原をターゲティングする。したがって、本発明は、APCに腫瘍抗原をターゲティングする組成物を提供する。1以上のDCLポリペプチドアゴニストを、1以上の腫瘍抗原に結合させるか、あるいは化学的に連結するか、またはカップリングして、そしてin vivoで、または確立されたex vivo法によって、DCLポリペプチドを発現しているAPCにおいて、抗原取り込みおよび抗原提示を促進するために、こうした治療が必要な患者に投与する。DCLアゴニストの例には、例えば、抗DCL抗体、またはその誘導体、DCL天然リガンド、またはその誘導体およびペプチド擬似体、並びに抗天然リガンド抗体に対して向けられる抗イディオタイプ抗体が含まれる。

10

20

【0187】

本発明はまた、癌、血液学的障害および腫瘍学的障害に関連する疾患状態を治療するとともに、血液学的障害および腫瘍学的障害に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の腫瘍抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなる前記方法も提供する。

【0188】

別の態様において、本発明は、血液学的障害および腫瘍学的障害に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の細菌抗原またはウイルス抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなり、ここでDCLポリペプチドがまた、末梢リンパ節に位置するT細胞およびB細胞への抗原提示のため、末梢リンパ節までの輸送も容易にする、前記方法を提供する。

30

【0189】

さらに別の態様において、本発明は、血液学的障害および腫瘍学的障害に対する免疫反応を増大させる方法であって、1以上の細菌抗原またはウイルス抗原に結合させるか、あるいは化学的にカップリングするかまたは連結した、1以上のDCLアゴニストを、こうした治療が必要な患者に投与することを含んでなり、ここでDCLポリペプチドがまた、T細胞への抗原提示のため、末梢リンパ節までの輸送も容易にし、そしてDCLポリペプチドがまた、T細胞に結合し、そして該細胞を同時刺激するのも容易にする、前記方法を提供する。

40

【0190】

腫瘍抗原は、当該技術分野に周知であり、例えばMinev, B.ら, Pharmacol. Ther., Vol. 81, No. 2, pp. 121-139, 1999に記載されるものがあり、そしてまた、以下の例に関連する腫瘍抗原を含むことも可能である。腫瘍抗原は、単離された、すなわち部分的に精製された細胞会合型または融合タンパク質のある型であることが可能である。

【0191】

50

血液学的障害および腫瘍学的障害の例には、急性骨髄性白血病、エプスタイン - バーウイルス陽性上咽頭癌、神経膠腫、結腸癌、胃癌、前立腺癌、腎細胞癌、子宮頸癌および卵巣癌、肺癌（ＳＣＬＣおよびＮＳＣＬＣ）が含まれ、癌関連悪液質、疲労、無力症、悪液質の傍腫瘍性症候群および高カルシウム血症が含まれる。さらに、肉腫、骨肉種、並びに腺癌（例えば乳癌）などの癌腫を含む固形腫瘍；メラノサイト母斑、放射状および垂直増殖相黒色腫を含む、黒色新生物；脂漏性角化症、光線角化症、基底細胞癌および扁平上皮癌を含む扁平細胞新生物が含まれる。さらに、急性骨髄性白血病、慢性または急性リンパ芽球性白血病および毛様細胞白血病を含む白血病を治療可能である。多発性骨髄腫を含む、浸潤性転移能力を持つ他の悪性腫瘍を、本発明の化合物、組成物および併用療法で治療することが可能である。さらに、本発明を用いて、慢性疾患の貧血、ファンコニーの再生不良性貧血を含む再生不良性貧血；特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）；脊髄異形成症候群（不応性貧血、環状鉄芽球を伴う不応性貧血、過剰な芽球を伴う不応性貧血、急性転化を来した過剰な芽球を伴う不応性貧血を含む）；骨髄線維症／骨髄化生；および鎌状赤血球血管閉塞発症を含む、貧血および血液学的障害を治療することが可能である。

10

【 0 1 9 2 】

多様なリンパ増殖性障害もまた、治療可能であり、これらの障害には、自己免疫リンパ増殖症候群（ＡＬＰＳ）、慢性リンパ芽球白血病、毛様細胞白血病、慢性リンパ性白血病、末梢Ｔ細胞リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、外套細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、エプスタイン - バーウイルス陽性Ｔ細胞リンパ腫、細網肉腫、ホジキン病、びまん性攻撃的リンパ腫、急性リンパ性白血病、Ｔガンマリンパ増殖性疾患、皮膚Ｂ細胞リンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫（すなわち菌状息肉症）およびセザリー症候群が含まれる。

20

【 0 1 9 3 】

移植に関連する障害、例えば移植片対宿主病、並びに心臓、肝臓、肺、皮膚、腎臓または他の臓器移植を含む、固形臓器移植から生じる合併症を、開示するＤＣＬポリペプチドで治療可能である。ＤＣＬポリペプチドを投与して、例えば皮膚移植を促進し、そして／または人工的な皮膚移植片の分化を抑制するとともに、肺移植後の閉塞性細気管支炎発症を予防するかまたは阻害することが可能である。

【 0 1 9 4 】

本発明はまた、自己免疫および炎症に関連する障害および症状を治療する組成物および方法も提供する。この例には、関節炎、糖尿病、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス、溶血性貧血とともに、当該技術分野に周知の疾患および状態が含まれる。１つの態様において、ＤＣＬポリペプチド、そのアゴニストおよび／またはアンタゴニストを、自己免疫または炎症に関連する１以上の抗原と組み合わせて用いて、それによって、抗原特異的Ｔ細胞寛容を誘導する。

30

【 0 1 9 5 】

ＤＣＬ薬剤組成物の投与

本発明は、有効量のタンパク質（ＤＣＬポリペプチド、その類似体、断片、誘導体、融合タンパク質、アゴニストおよびアンタゴニスト）並びに適切な希釈剤およびキャリアーを含んでなる薬剤組成物とともに、これらの薬剤組成物を用いて、上述の多様な疾患を治療するかまたは予防する方法、あるいはこれらの疾患に対する免疫反応を増大させる方法を提供する。可溶性サイトカイン受容体またはサイトカイン、あるいは他の免疫制御分子と組み合わせた、ＤＣＬまたは相同体の使用もまた、意図される。さらに、可溶性ＤＣＬまたは相同体をコードするＤＮＡもまた有用であろう；当該技術分野に知られる方法いずれかによって、移植しようとする組織または臓器を、該ＤＮＡでトランスフェクションすることが可能である。

40

【 0 1 9 6 】

療法的使用のため、徴候に適した方法で治療するため、精製タンパク質を患者、好ましくはヒトに投与する。したがって、例えば免疫機能を制御するために投与されるＤＣＬタンパク質組成物は、多量（ｂｏｌｕｓ）注射、連続注入、移植体からの徐放、または他の適

50

切な技術によって投与可能である。典型的には、療法剤は、生理学的に許容しうるキャリアー、賦形剤または希釈剤と組み合わせて、精製DCIを含んでなる組成物の形で投与されるであろう。こうしたキャリアーは、使用する投薬量および濃度で、レシピエントに毒性でない。

【0197】

通常、こうしたタンパク質組成物の調製は、本発明のタンパク質を、緩衝剤、アスコルビン酸などの酸化防止剤、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、グルコース、スクロースまたはデキストリンを含む炭水化物、EDTAなどのキレート剤、グルタチオンおよび他の安定化剤、並びに賦形剤と合わせることを含む。中性緩衝生理食塩水または同種血清アルブミンと混合した生理食塩水は、適切な希釈剤の典型である。好ましくは、産物は、希釈剤として適切な賦形剤溶液（例えばスクロース）を用いた凍結乾燥物として配合される。適切な投薬量を試験で決定可能である。投与量および投与頻度は、もちろん、治療する徴候の性質および重症度、望ましい反応、患者の状態などの要因に応じるであろう。

10

【0198】

適切なアゴニストには、上述のものおよびその変異体に加えて、ペプチド、小有機分子、ペプチド擬似体、抗体等が含まれる。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体；損なわれていない抗体または一部切除抗体、例えばF(ab')₂、Fab、Fv；異種抗体；同種抗体；同系抗体；またはその修飾型、例えばヒト化抗体、キメラ抗体などであることが可能である。

20

【0199】

多くの場合、アゴニストはポリペプチド、抗体またはその断片などであろうが、比較的高い特異性および親和性を提供する他の分子もまた、使用可能である。コンビナトリアルライブラリーは、必要な結合特性を有するオリゴペプチド以外の化合物を提供する。

【0200】

候補剤は、多くの化学的種類を含むが、典型的には、これらは有機分子、好ましくは50ダルトンより多く、そして2,500ダルトン未満である分子量を有する小有機化合物である。候補剤は、タンパク質との構造的相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含んでなり、そして典型的には、少なくとも1つの、アミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、スルフヒドリル基またはカルボキシル基、好ましくは少なくとも2つの官能化学基を含む。候補剤はしばしば、上述の官能基の1以上の代わりに環状炭素または複素環構造および/または芳香族または多環芳香族構造を含んでなる。候補剤はまた、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、その誘導体、構造的類似体または組み合わせを含む生体分子間にも見られる。

30

【0201】

候補剤は、合成化合物または天然化合物のライブラリーを含む、非常に多様な供給源から得られる。例えば、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現を含む、非常に多様な有機化合物および生体分子のランダム合成および指定合成には、多くの手段が利用可能である。あるいは、細菌抽出物、真菌抽出物、植物抽出物および動物抽出物の形の天然化合物ライブラリーが入手可能であるか、または容易に産生される。さらに、天然または合成的に産生したライブラリーおよび化合物が、慣用的な化学的手段、物理的手段および生化学的手段を通じて、容易に修飾される。既知の薬理学的剤を、指定またはランダム化学的修飾、例えばアシル化、アルキル化、エステル化、アミド化(amidification)に供して、構造的類似体を産生することが可能である。

40

【0202】

DCIポリペプチドおよび核酸の診断使用および他の使用

本発明が提供するDCIポリペプチドをコードする核酸は、多くの診断または他の有用な目的に使用可能である。本発明の核酸は、解析、性質決定または療法使用のために組換えポリペプチドを発現するため；対応するポリペプチドを（恒常的に、あるいは組織分化もしくはは発生の特定の時期に、または疾患状態において）優先的に発現する組織のマーカー

50

として；染色体を同定するかまたは関連する遺伝子位をマッピングするための染色体マーカーまたはタグとして（標識した場合）；潜在的な遺伝子障害を同定するために患者における内因性DNA配列と比較するために；ハイブリダイズしそしてしたがって新規関連DNA配列を発見するためのプローブとして；遺伝子フィンガープリンティングのためのPCRプライマーを導くための情報供給源として；他の新規核酸を発見する過程において、既知の配列を「取り去る（subtract-out）」ためのプローブとして；発現パターンの検査を含む、「遺伝子チップ」または他の支持体に付着するオリゴマーを選択し、そして作成するため；DNA免疫技術を用いて、抗ポリペプチド抗体を作成するため；抗DNA抗体を作成するかまたは別の免疫反応を誘発するための抗原として、そして遺伝子治療のために使用可能である。DCLポリペプチドおよび断片化ポリペプチドの使用には、限定されるわけではないが、以下が含まれる：ポリペプチドの精製およびその活性の測定；搬送剤；療法および研究試薬；分子量マーカーおよび等電点電気泳動マーカー；ペプチド断片化の対照；未知のポリペプチドの同定；および抗体の調製。これらの使用に適したいずれかのまたはすべての核酸は、製品として商品化するため、試薬等級またはキット形式に発展させることが可能である。上に列挙する使用を実行する方法は、当該技術分野に周知である。こうした方法を開示する参考文献には、限定なしに、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Sambrook，J．，E．F．FritschおよびT．Maniatis監修，1989、および“Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques”，Academic Press，Berger，S．L．およびA．R．Kimmel監修，1987が含まれる。

10

20

30

【0203】

プローブおよびプライマー。開示するDCL核酸、およびその断片の組み合わせの使用の中に、プローブまたはプライマーとしての断片の使用がある。こうした断片は、一般的に、DNA配列の少なくとも約17の隣接するヌクレオチドを含んでなる。他の態様において、DNA断片は、DNA配列の少なくとも30、または少なくとも60の隣接するヌクレオチドを含んでなる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Sambrookら、1989に示され、そして本明細書に詳細に上述している。遺伝暗号の知識を、上に示すアミノ酸配列と組み合わせ用い、縮重オリゴヌクレオチドの組を調製することが可能である。こうしたオリゴヌクレオチドは、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）において、プライマーとして有用であり、それによってDNA断片を単離して、そして増幅する。特定の態様において、ヒト遺伝子または非ヒト遺伝子ライブラリー用のプローブとして、縮重プライマーを使用することが可能である。こうしたライブラリーには、限定されるわけではないが、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、およびエレクトロニックEST（発現配列タグ）またはDNAライブラリーさえ含まれるであろう。

【0204】

診断法および遺伝子治療。当業者は、DCLポリペプチドをコードする核酸、および開示する断片、並びにこれらの核酸の組み合わせを用い、周知の技術を用いて、これらのポリペプチドに対応する遺伝子と関連する異常を解析することが可能である。これによって、このマーカーが再編成されているかまたは欠失している状態を識別することが可能になる。さらに、本発明の核酸またはその断片を位置マーカーとして用いて、未知の位置の他の遺伝子をマッピングすることが可能である。本発明の核酸に相当する遺伝子の不全または不十分な量によって（直接または間接的に）仲介されるいかなる障害に対する治療を開発するのに、該DNAが使用可能である。天然ヌクレオチド配列の本明細書の開示により、不全遺伝子の検出、および正常遺伝子でのその置換が可能になる。不全遺伝子は、in vitro診断アッセイにおいて、そして本明細書に開示する天然ヌクレオチド配列と、この遺伝子に不全を宿すると推測されるヒト由来の遺伝子のものとを比較することによ

40

50

って、検出可能である。

【0205】

結合パートナーに関してスクリーニングする方法。本発明のポリペプチドを、各々、結合パートナーに関してスクリーニングするかまたは結合パートナーを同定する方法における試薬として用いることが可能である。例えば、DCLポリペプチドを固体支持物質に付着させることが可能であり、そしてアフィニティークロマトグラフィーに類似の方式で、その結合パートナーに結合することが可能である。特定の態様において、慣用法によってポリペプチドを固体支持体に付着させる。一例として、ポリペプチドのアミノ酸側鎖上の官能基と反応するであろう官能基を含有するクロマトグラフィーカラムが入手可能である (Pharmacia Biotech, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ)。代替法において、ポリペプチド/Fcポリペプチド(上に論じるようなもの)を、Fc部分との相互作用を通じて、プロテインAまたはプロテインG含有クロマトグラフィーカラムに付着させる。DCLポリペプチドはまた、DCL結合パートナーを発現する細胞を同定するのに使用を見出す。精製DCLポリペプチドを、カラムクロマトグラフィーマトリックスなどの固相または類似の適切な支持体に結合させる。例えば、磁気微小球体を該ポリペプチドでコーティングし、そして磁場を通じてインキュベーション容器中に保持してもよい。潜在的な結合パートナーを発現細胞を含有する細胞混合物の懸濁物または単離細胞の細胞溶解物を、ポリペプチドをその上に有する固相と接触させる。細胞表面上に結合パートナーを発現している細胞を固定ポリペプチドに結合させ、そして、未結合細胞を洗い流す。別の形式において、細胞溶解物由来の細胞内結合パートナーまたはDCL基質をDCLポリペプチドに結合させ、そして未結合タンパク質を除去する。あるいは、検出可能部分にDCLポリペプチドをコンジュゲート化し、その後、結合パートナー発現に関して試験しようとする細胞とインキュベーションしてもよい。インキュベーション後、未結合標識物質を除去し、そして細胞上の検出可能部分の存在または非存在を測定する。さらなる代替法において、結合パートナーを発現していると推測される細胞混合物または細胞溶解物を、ビオチン化ポリペプチドとインキュベーションする。インキュベーション時間は、十分な結合を確実にするため、典型的には少なくとも連続1時間である。その後、アビジンでコーティングしたビーズを充填したカラムに、生じた混合物を通過させ、それによってアビジンに対するビオチンの高い親和性が、ビーズへの所望の細胞または結合パートナーの結合を提供する。アビジンでコーティングしたビーズの使用法は知られている (Berensonら, J. Cell. Biochem., 10D:239, 1986を参照されたい)。非結合成分を除去する洗浄、および結合細胞または結合パートナーの遊離は、慣用法を用いて行う。ある場合では、結合パートナーに関してスクリーニングするかまたは結合パートナーを同定する上述の方法を用いるかまたは修飾して、こうした結合パートナー分子または該分子を発現している細胞を単離するかまたは精製することもまた、可能である。

【0206】

キャリアーおよび搬送剤。該ポリペプチドはまた、付着する剤を、同定された結合パートナーを所持している細胞に搬送するためのキャリアーとしての使用も見出す。したがって、該ポリペプチドは、*in vitro*法または*in vivo*法において、診断用剤または療法剤をこうした細胞(あるいは、細胞表面上に結合パートナーを発現することが見出された、他の細胞種)に搬送するのに使用可能である。ポリペプチドに付着可能な検出可能(診断用)剤および療法剤には、限定されるわけではないが、毒素、他の細胞傷害性剤、薬剤、放射性核種、発色団、比色反応または蛍光定量反応を触媒する酵素等が、意図する適用にしたがって選択される特定の剤と共に含まれる。毒素の中には、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)外毒素A、リボソーム不活性化ポリペプチド、トリコセセンなどのマイコトキシン、並びにそれらの誘導体および断片(例えば一本鎖)がある。診断使用に適した放射性核種には、限定されるわけではないが、 ^{123}I 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、および ^{76}Br が含まれる。療法使用に適した放射性核種の例は、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{77}Br 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{212}Po

10

20

30

40

50

Pb、²¹²Bi、¹⁰⁹Pd、⁶⁴Cu、および⁶⁷Cuである。こうした剤は、いかなる適切な慣用法によって、ポリペプチドに付着させることも可能である。ポリペプチドは、例えば、所望の剤上の官能基と反応し、共有結合を形成することが可能である、アミノ酸側鎖上の官能基を含んでなる。あるいは、ポリペプチドまたは剤を誘導体化して、所望の反応性官能基を生成するか、または付着させることが可能である。誘導体化には、多様な分子をポリペプチドに付着させるのに利用可能である、二官能性カップリング試薬(Pierce Chemical Company、イリノイ州ロックフォード)の1つの付着を伴うことが可能である。ポリペプチドを放射標識するいくつかの技術が知られる。例えば、適切な二官能キレート剤を用いることによって、放射性核種金属をポリペプチドに付着させることが可能である。ポリペプチドおよび適切な診断用剤または療法剤を含んでなるコンジュゲート(好ましくは共有結合したもの)をこうして調製する。該コンジュゲートを、特定の適用に適した量で投与するか、または別の方式で使用する。

10

20

30

40

50

【0207】

DCLポリペプチドに対する抗体

本発明のポリペプチドと免疫反応性である抗体を本明細書に提供する。こうした抗体は、抗体の抗原結合部位を介して(非特異的結合と対照的に)、ポリペプチドに特異的に結合する。本発明において、特異的に結合する抗体は、DCLポリペプチド、相同体、および変異体を特異的に認識して、そしてこれらの分子と結合するが、他の分子とは結合しないであろうものである。1つの好ましい態様において、抗体は、本発明のポリペプチドに特異的であり、そして他のポリペプチドとは交差反応しない。この方式で、上述のようなDCLポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチド等を、それと免疫反応性である抗体を産生する際の「免疫原」として使用することが可能である。

【0208】

より具体的には、ポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチド等は、抗体の形成を誘発する抗原決定基またはエピトープを含有する。これらの抗原決定基またはエピトープは、直鎖でもまたは高次構造的(conformational)(断続的)でもどちらであることも可能である。エピトープは、当該技術分野に知られるいかなる方法によっても同定可能である。したがって、本発明の1つの側面は、本発明のポリペプチドの抗原性エピトープに関する。こうしたエピトープは、以下により詳細に記載するように、抗体、特にモノクローナル抗体を作成するのに有用である。さらに、本発明のポリペプチド由来のエピトープは、アッセイにおいて研究試薬として、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマの上清などの物質から、特異的に結合する抗体を精製するために、使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、ポリペプチドの化学的または酵素的切断、あるいは組換えDNA技術の使用など、当該技術分野に周知の技術を用いて、産生することが可能である。

【0209】

本発明のポリペプチドのエピトープによって誘発可能な抗体に関しては、エピトープが単離されていてもまたはポリペプチドの一部のままであっても、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のどちらをも慣用的技術によって調製可能である。例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennetら(監修), Plenum Press, ニューヨーク(1980); および Antibodies: A Laboratory Manual, HarlowおよびLand(監修), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1988); KohlerおよびMilstein(米国特許第4,376,110号); ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら, 1984, J. Immunol. 133:3001-3005; Coleら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030); および EBVハイブリドーマ技術(Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Thera

py, Alan R. Liss. Inc., pp. 77-96)を参照されたい。本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図される。こうしたハイブリドーマは、慣用的技術によって産生し、そして同定することが可能である。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitroまたはin vivoで培養可能である。in vivoでは高力価でmAbが産生されるため、これが現在好ましい産生法である。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための1つの方法は、動物をポリペプチドで免疫し；免疫した動物から脾臓細胞を採取し；前記脾臓細胞を骨髓腫細胞株に融合させ、それによってハイブリドーマ細胞を生成し；そして該ポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含んでなる。抗体産生のため、1以上の以下：DC Lポリペプチド、DC Lポリペプチドの断片、DC Lポリペプチドの機能的同等物、またはDC Lポリペプチドの突然変異体型を注射することによって、多様な宿主動物を免疫することが可能である。こうした宿主動物には、限定されるわけではないが、ウサギ、モルモット、マウス、およびラットが含まれる。宿主種に応じて、多様なアジュバントを用いて、免疫学的反応を増加させることが可能であり、こうしたアジュバントには、限定されるわけではないが、フロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペット（key hole limpet）ヘモシアニン、ジニトロフェノール、並びにBCG（カルメット・گران桿菌（bacille Calmette - Guérin））および坐瘡プロピオンバクテリウム（Corynebacterium parvum）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。こうしたモノクローナル抗体は、Ig G、Ig M、Ig E、Ig A、Ig D、およびそのいかなるサブクラスも含む、いかなる免疫グロブリンクラスのものであることも可能である。

10

20

30

40

50

【0210】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を共にスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（Takedaら，1985，Nature，314：452-454；Morrisonら，1984，Proc Natl Acad Sci USA 81：6851-6855；Boulianneら，1984，Nature 312：643-646；Neubergerら，1985，Nature 314：268-270）を用いることが可能である。キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、ブタmAbに由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなどである。本発明のモノクローナル抗体にはまた、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型も含まれる。こうしたヒト化抗体は、既知の技術によって調製可能であり、そして抗体をヒトに投与した際、減少した免疫原性という利点を提供する。1つの態様において、ヒト化モノクローナル抗体は、ネズミ抗体の可変領域（またはその抗原結合部位のみ）およびヒト抗体由来の定常領域を含んでなる。あるいは、ヒト化抗体断片は、ネズミモノクローナル抗体の抗原結合部位およびヒト抗体由来の可変領域断片（抗原結合部位を欠く）を含んでなることが可能である。キメラおよびさらなる操作モノクローナル抗体の産生法には、Riechmannら（Nature 332：323，1988）、Liuら（PNAS 84：3439，1987）、Larrickら（Bio/Technology 7：934，1989）、並びにWinterおよびHarris（TIPS 14：139，Can，1993）に記載されるものが含まれる。抗体をヒト化するのに有用な技術はまた、米国特許第6，054，297号に論じられる。トランスジェニック的に抗体を生成する方法は、GB 2，272，440、米国特許第5，569，825号および第5，545，806号、並びに関連特許に見出すことが可能である。好ましくは、ヒトで使用するため、抗体はヒトのものであるかまたはヒト化されており；こうしたヒト抗体またはヒト化抗体を生成する技術もまた周知であり、そして例えばMedarex Inc（ニュージャージー州プリンストン）およびA

b g e n i x I n c . (カリフォルニア州ファーマント) から商業的に入手可能である。別の好ましい態様において、ヒト抗体可変ドメインのファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって、ヒトで使用するための完全なヒト抗体を産生する (V a u g h a n ら , 1998 , N a t B i o t e c h n o l . 16 (6) : 535 - 539 ; および米国特許第 5 , 969 , 108 号)。

【 0 2 1 1 】

特異的エピトープを認識する抗原結合抗体断片は、既知の技術によって生成可能である。例えば、こうした断片には、限定されるわけではないが：抗体分子のペプシン消化によって産生可能な $F(a b')_2$ 断片および $(a b')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成可能な $F a b$ 断片が含まれる。あるいは、 $F a b$ 発現ライブラリーを構築し (H u s e ら , 1989 , S c i e n c e , 246 : 1275 - 1281)、所望の特異性を持つモノクローナル $F a b$ 断片の迅速でそして容易な同定を可能に示す。一本鎖抗体の産生に関して記載される技術 (米国特許第 4 , 946 , 778 号 ; B i r d , 1988 , S c i e n c e 242 : 423 - 426 ; H u s t o n ら , 1988 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 85 : 5879 - 5883 ; および W a r d ら , 1989 , N a t u r e 334 : 544 - 546) を適応させ、D C L 遺伝子産物に対する一本鎖抗体を産生することもまた可能である。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介して F v 領域の重鎖および軽鎖断片を連結して一本鎖ポリペプチドを生じることによって形成する。こうした一本鎖抗体はまた、細胞内でも有用である (すなわち細胞内発現抗体として) 可能性があり、例えば、M a r a s c o ら (J . I m m u n o l . M e t h o d s 231 : 223 - 238 , 1999) に記載されるように、H I V 感染の遺伝子治療に有用である可能性がある。さらに、その後、当業者に周知の技術を用いて、D C L ポリペプチドに対する抗体を利用して、D C L ポリペプチドを「模倣」し、そして D C L ポリペプチドの結合パートナーに結合することが可能な抗イディオタイプ抗体を生成することが可能である (例えば G r e e n s p a n & B o n a , 1993 , F A S E B J 7 (5) : 437 - 444 ; および N i s s i n o f f , 1991 , J . I m m u n o l . 147 (8) : 2429 - 2438 を参照されたい)。

【 0 2 1 2 】

本発明のポリペプチドと免疫反応性である抗体には、二重特異性抗体 (すなわち第一の抗原結合ドメインを介して本発明のポリペプチドと免疫反応性であり、そしてまた、第二の抗原結合ドメインを介して異なるポリペプチドとも免疫反応性である抗体) が含まれる。多様な二重特異性抗体が調製されており、そして *i n v i t r o* および *i n v i v o* 両方で有用であることが見出されている (例えば米国特許第 5 , 807 , 706 号 ; 並びに C a o および S u r e s h , 1998 , B i o c o n j u g a t e C h e m 9 : 635 - 644 を参照されたい)。二重特異性抗体を調製する多くの方法が当該技術分野に知られ、2つの異なるハイブリドーマを融合させることによって形成する、クワドローマ (q u a d r o m a)、およびハイブリドーマをリンパ球と融合させることによって形成する、トリオーマ (t r i o m a) などのハイブリッド - ハイブリドーマの使用が含まれる (M i l s t e i n および C u e l l o , 1983 , N a t u r e 305 : 537 - 540 ; 米国特許第 4 , 474 , 893 号 ; および米国特許第 6 , 106 , 833 号)。米国特許第 6 , 060 , 285 号は、二重特異性抗体を産生する方法を開示し、該方法においては少なくとも、第一の特異性を有する抗体の軽鎖および重鎖可変部の遺伝子を、第二の特異性を有する抗体を分泌するハイブリドーマ細胞にトランスフェクションする。抗体断片の化学的カップリングもまた、2つの異なる抗原に対する特異性を有する抗原結合分子を調製するのに用いられてきている (B r e n n a n ら , 1985 , S c i e n c e 229 : 81 - 83 ; G l e n n i e ら , J . I m m u n o l . , 1987 , 139 : 2367 - 2375 ; および米国特許第 6 , 010 , 902 号)。二重特異性抗体はまた、例えば K o s t e l n y ら (J . I m m u n o l . 148 : 1547 - 4553 ; 1992) に記載されるように、F o s および J u n タンパク質 (

優先的にヘテロ二量体を形成する)由来のロイシンジッパー部分を用いることによって、組換え手段を介して産生可能である。米国特許第5,582,996号は、二重特異性抗体の産生において、ヘテロ二量体形成を促進する、相補的相互作用ドメイン(例えばロイシンジッパー部分または他の錠および鍵相互作用ドメイン構造)の使用を開示する。米国特許第5,959,083号に記載されるように、抗体のF(ab')₂断片の重鎖をコードするDNAと、第二のF(ab')₂分子の重鎖(CH1ドメインがCH3ドメインで交換されているもの)をコードするDNA、または抗体の一本鎖FV断片をコードするDNAいずれかを融合させることによって、四価二重特異性分子が調製可能である。哺乳動物細胞において、対応する軽鎖の遺伝子とともに、生じた融合遺伝子を発現させると、選択した抗原に対する特異性を有する四価二重特異性分子が生じる。二重特異性抗体はまた、米国特許第5,807,706号に記載されるように産生可能である。一般的に、該方法は、第一のポリペプチドの接触面に隆起を導入し(小さいアミノ酸側鎖を、より大きい側鎖と交換することによって構築する)、そして第二のポリペプチドの接触面に、対応する空洞を導入する(大きいアミノ酸側鎖を、より小さいものと交換することによって調製する)ことを伴う。さらに、2つの可変ドメインを共有結合することによって一本鎖可変断片(sFv)が調製されてきており;生じた抗体断片は、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーの長さに応じて、二量体または三量体を形成することが可能である(Kortt, 1997, Protein Engineering 10:423-433)。

10

【0213】

こうした抗体を同定可能なスクリーニング法が周知であり、そして例えば免疫アフィニティークロマトグラフィーを伴う可能性がある。抗体は、アゴニスト(すなわちリガンド模倣)特性に関してスクリーニング可能である。こうした抗体は、細胞表面DCLへの結合に際して、DCL結合パートナーが細胞表面DCLに結合した際に誘導される生物学的影響と類似の生物学的影響(例えば生物学的シグナルの伝達)を誘導する。アゴニスト抗体を用いて、DCLが仲介する細胞刺激経路または細胞間コミュニケーションを誘導可能である。2つの別個のアッセイを用いたスクリーニングによって、または二重特異性抗体が、第一の抗原および第二の抗原(後者は検出可能部分にカップリングされている)間の架橋として働くアッセイを用いたスクリーニングによって、二重特異性抗体を同定可能である。

20

30

【0214】

DCLの結合パートナーへの本発明のDCLポリペプチドの結合を遮断可能な抗体を用いて、こうした結合から生じるDCLが仲介する細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激を阻害可能である。こうした遮断抗体は、DCLの、DCL結合パートナーを発現している特定の細胞への結合を阻害する能力に関して、抗体を試験することによるなど、いかなる適切なアッセイ法を用いて同定することも可能である。あるいは、遮断抗体は、標的細胞への可溶性DCLの結合から生じる生物学的影響を阻害する能力に関するアッセイにおいて、同定可能である。例えば、抗体は、DCL結合パートナーが仲介する細胞刺激経路を阻害する能力に関して、アッセイ可能である。こうした抗体は、in vitro法で使用可能であるし、またはin vivoで投与して、抗体を生成した実体によって仲介される生物学的活性を阻害することが可能である。このように、細胞表面結合パートナー受容体とDCLの相互作用によって(直接または間接的に)引き起こされるかまたは悪化される障害を治療することが可能である。療法は、DCL結合パートナーが仲介する生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を、哺乳動物にin vivo投与することを伴う。一般的に、こうした療法の使用には、モノクローナル抗体が好ましい。1つの態様において、抗原結合抗体断片を使用する。DCLに対して向けられる抗体、および生理学的に許容しうる希釈剤、賦形剤、またはキャリアーを含んでなる組成物を、本明細書に提供する。DCLポリペプチドを含有する組成物に関して、こうした組成物の適切な構成要素を以下に記載する。

40

【0215】

50

本明細書にやはり提供するの、抗体に付着した検出可能（例えば診断用）または療法剤を含んでなるコンジュゲートである。こうした剤の例を上記する。該コンジュゲートは、*in vitro*法または*in vivo*法に使用を見出す。本発明の抗体はまた、*in vitro*または*in vivo*いずれかの、本発明のポリペプチドまたは断片の存在を検出するアッセイにおいても使用可能である。抗体はまた、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、本発明のポリペプチドまたは断片を精製する際にも使用可能である。

【0216】

実施例

本発明をどのように行い、そして用いるかの完全な開示および説明を一般の当業者に提供するため、以下の実施例を提案し、そして該実施例は、本発明とみなされる範囲を限定することを意図しない。用いる数値（例えば量、温度、濃度など）が正確であることを確実にする努力を行ったが、いくつかの実験の誤差および偏差は、許容されなければならない。別に示さない限り、部分は重量部分であり、分子量は平均分子量であり、温度はセ氏であり、そして圧は大気圧であるかまたは大気圧に近い。

【0217】

（実施例1）

骨髄由来ネズミDCの生成およびAffymetrix Gene ChipTMマイクロアレイ実験用の標識標的の調製

マウス：

メスC57BL/10マウス（8～12週齢）をTaconic（ニューヨーク州ジャーマンタウン）から得た。すべてのマウスは特定病原体未感染条件下で飼育された。

【0218】

細胞調製物：

2%熱不活性化ウシ胎児血清（FBS）（Gibco BRL Life Technologies、メリーランド州ゲイザースバーグ）を補ったリン酸緩衝生理食塩水（PBS）2mlで、大腿骨を勢いよく洗浄する（flushing）ことによって、骨髄（BM）細胞を単離した。BM細胞を一度遠心分離し、そしてその後、Tris-塩化アンモニウム中に37℃で2分間再懸濁して、赤血球を溶解した。細胞を再び遠心分離して、そしてその後、必須アミノ酸および非必須アミノ酸、1mmol/lピルビン酸ナトリウム、2.5mmol/l HEPES緩衝液 pH7.4、ビタミン類、 5.5×10^{-5} mol/l 2-メルカプトエタノール（2-ME）、100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、0.3mg/ml L-グルタミン（PSG）、および10%FBSを補ったマッコイの培地からなる培地（CM）中に再懸濁した（すべての培地試薬はGibcoから得た）。

【0219】

DC培養物：

1×10^6 /ml、6ウェルプレート（Costar/Corning Incorp.、マサチューセッツ州アクトン）中、200ng/ml（180単位/ml）ヒトFlt-3L（Amgen Corp.）を含有するCM中で、BM細胞を9日間培養した。空気中に5%CO₂を含有する加湿雰囲気中、37℃で培養をインキュベーションした。勢いよくピペティングし、そして非接着細胞を除去し、その後、各ウェルを室温で、Ca⁺⁺またはMg⁺⁺を含まないPBSで2回洗浄して、ゆるく接着した細胞を取り除き、これを非接着分画とともにプールすることによって、培養からDCを採取した。

【0220】

宿主において、適切な増殖因子をあらかじめ投与することを通じて、機能的に成熟した樹状細胞の総数を増加させることが当該技術分野において周知であり、該増殖因子は、1以上のFlt3-L；GM-CSF；G-CSF；GM-CSF+IL-4；GM-CSF+IL-3などであることが可能である。例えばFlt3-L（Amgen Corp.、ワシントン州シアトル）が機能的に成熟した多数の樹状細胞の生成を、*in vivo*

10

20

30

40

50

oおよび *in vitro* 両方で刺激することが見出されてきている（米国出願第 08 / 539, 142 号、1995 年 10 月 4 日提出）。F1t3-L は、どちらも本明細書に援用される EP 0627487 A2 および WO 94 / 28391 に記載されるポリペプチドの種類を指す。他の有用なサイトカインには、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF；各々本明細書に援用される、米国特許第 5, 108, 910 号、および第 5, 229, 496 号に記載される）が含まれる。さらに、GM-CSF / IL-3 融合タンパク質（すなわち GM-CSF および IL-3 の C 末端から N 末端融合体）が使用可能である。こうした融合タンパク質は当該技術分野に周知であり、そして各々本明細書に援用される米国特許第 5, 199, 942 号；第 5, 108, 910 号および第 5, 073, 627 号に記載される。当該技術分野に知られ、そして実行されるように、10 搬送の多様な経路および措置が使用可能である。例えば、剤が F1t3-L である場合、F1t3-L を毎日投与することが可能であり、この場合、用量は、約 1 ~ 100 mg / kg 体重、より一般的には、約 10 ~ 約 50 mg / kg 体重である。投与は局所部位である、例えば皮下投与であることが可能であり、または全身である、例えば腹腔内投与、静脈内投与などであることが可能である。

【0221】

F1t3-L 誘導 DC を 10 日間培養した。第 10 日に、培養を以下の刺激 / 条件で、4 時間刺激した：(a) 10 ng / ml 組換えネズミ GM-CSF、1000 U / ml ヒト；(b) 500 U / ml IFN- α / D (Genzyme、マサチューセッツ州ケンブリッジ)；(c) 1 μ g / ml 大腸菌 (0217:B8) 由来 LPS (Difco、ミシガン州デトロイト) および (d) 刺激なし。20

【0222】

RNA 単離：

4 時間の刺激後、細胞を直ちに TrizolTM (Gibco BRL Life Technologies) 中で溶解し、そして製造者の推奨にしたがって RNA を単離した。単離した RNA を Qiagen (Qiagen Inc.、カリフォルニア州バレンシア) の RNeasyTM キットを用いて、さらに単離した。

【0223】

AffymetrixTM アレイへのハイブリダイゼーション用の標識 RNA 標的の調製：本質的に、本明細書に援用される Affymetrix プロトコル (Affymetrix Corp.、カリフォルニア州サンタクララ) に記載されるように、標的 RNA の調製およびマイクロアレイチップへのハイブリダイゼーションを行った。簡潔には、10 μ g の総 RNA を用いて、これをまず、Superscript IITM 逆転写酵素 (Gibco BRL Life Technologies) およびバクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼプロモーターをコードするプライマーを用いて一本鎖 cDNA に変換して、標的試料を調製した。その後、一本鎖 cDNA を二本鎖 cDNA に変換した。T7 プロモーターを用いて、T7 RNA ポリメラーゼおよびビオチン化ヌクレオチド三リン酸を含有する反応において、標識 cRNA 標的を生成した。精製後、cRNA を化学的に断片化して平均 50 ~ 200 塩基の長さにし、そして Affymetrix 遺伝子チップに、45 で一晩ハイブリダイズさせた。この cRNA は、Affymetrix Gene ChipTM アレイ上に合成された短い DNA プローブに相補的である。ハイブリダイゼーション後、チップを Affymetrix 流体力学ステーション中でプロセッシングした。チップを洗浄し、ストレプトアビジン・フィコエリトリン (SAPE) で染色し、その後、ビオチン化ヤギ抗ストレプトアビジンで染色し、そして最後に、第二回の SAPE を行った。40

【0224】

(実施例 2)

抗体調製

以下の実施例は、DCL ポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を調製する方法を例示する。米国特許第 4, 411, 993 号に記載されるものなどの他の慣用技術が使用可50

能である。免疫原調製、アジュバントおよび免疫プロトコルの選択は、当該技術分野に周知の方法であり、そして例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, HarlowおよびLand (監修), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (1988) に見出すことが可能である。こうした抗体を生成するのに使用可能な適切な免疫原には、限定されるわけではないが、精製DCLポリペプチド、その免疫原性断片、および高レベルのDCLポリペプチドまたはその免疫原性断片を発現する細胞が含まれる。例えばPardollおよびBeckerlegによってImmunity 3: 165, 1995に概説されるように、1以上のDCLポリペプチドをコードするDNAもまた、免疫原として使用可能である。

10

【0225】

げっ歯類 (例えばBALB/cマウスまたはLewisラット) をアジュバント (完全または不完全フロイントアジュバント、ミョウバン、またはRibiアジュバントR700 (Ribi、モンタナ州ハミルトン) などの別のアジュバントなど) 中で乳化したDCLポリペプチド免疫原で免疫し、そして10~100マイクログラムの範囲の量を、皮下注射または腹腔内注射する。DNAを皮内投与 (Razら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9519) または筋内投与 (Wangら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4156) することが可能であり; DNAに基づく抗原には、生理食塩水が適切な希釈剤であることが見出されている。10日~3週間後、免疫した動物をさらなる免疫原で追加免疫し、そしてその後、毎週、隔週 (bi-weekly)、または3週ごとの免疫スケジュールで、定期的に追加免疫する。

20

【0226】

後眼窩出血または尾先端切除によって、血清試料を定期的に採取し、ドットブロットアッセイ、ELISA (酵素連結免疫吸着アッセイ)、免疫沈降、またはDCLポリペプチド結合パートナーへのDCLポリペプチドの結合の阻害のFACS解析などの他の適切なアッセイによって、DCLポリペプチド抗体に関して試験する。適切な抗体力価を検出した後、陽性動物に、生理食塩水中のDCLポリペプチドを最後に一度、静脈内注射する。3~4日後、動物を屠殺し、そして脾臓細胞を採取し、そして該脾臓細胞をネズミ骨髄腫細胞株、例えばNS1または好ましくはP3X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580) に融合させる。これらの細胞融合によってハイブリドーマ細胞が生成され、これを、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン) 選択培地中、マルチマイクロタイタープレートに蒔く。

30

【0227】

ハイブリドーマ細胞を、Engvallら (Immunochem. 8: 871, 1971) および米国特許第4,703,004号に開示される技術の適応によって、精製したDCLポリペプチドに対する反応性に関して、ELISAによってスクリーニングすることが可能である。好ましいスクリーニング技術は、Beckmannら (J. Immunol. 144: 4212, 1990) に記載される抗体捕捉技術である。陽性ハイブリドーマ細胞を、同系げっ歯類に腹腔内注射して、高濃度の (例えば1ミリリットルあたり、1ミリグラムより多い) 抗DCLポリペプチドモノクローナル抗体を含有する腹水を産生することが可能である。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、多様な技術によって、フラスコまたはローラーボトル中、in vitroで増殖させることが可能である。モノクローナル抗体を、硫酸アンモニウム沈殿によって、続いてゲル排除クロマトグラフィーによって、精製可能である。あるいは、プロテインAまたはプロテインGに対する抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーもまた使用可能であり、DCLポリペプチドへの結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーも使用可能である。

40

【0228】

(実施例3)

50

D C L 核酸発現のアンチセンス阻害

本発明にしたがって、オリゴヌクレオチド設計の基礎として、配列番号 1、5、9、11、15、17、21 および 23 のヌクレオチド配列を用い、D C L m R N A 分子の異なる領域を標的とする、一連のオリゴヌクレオチドを設計する。オリゴヌクレオチドの長さがおよそ 10、12、15、18、またはより好ましくは 20 ヌクレオチド残基であるように、そして少なくとも 37 の予測されるハイブリダイゼーション温度を有するように、オリゴヌクレオチドを選択する。好ましくは、いくつかは m R N A 分子の 5' 領域にハイブリダイズし、他のものがコード領域にハイブリダイズし、そしてなお他のものが m R N A 分子の 3' 領域にハイブリダイズするように、オリゴヌクレオチドを選択する。G r a y および C l a r k (米国特許第 5, 856, 103 号および第 6, 183, 966 号) に記載されるような方法を用いて、標的配列と最も安定なハイブリッド構造を形成するオリゴヌクレオチドを選択することが可能であり、これは、こうしたオリゴヌクレオチドがアンチセンス阻害剤として使用するのに望ましいためである。

10

【0229】

オリゴヌクレオチドは、全体でホスホロチオエート主鎖(ヌクレオシド間連結)を持つオリゴデオキシヌクレオチドであることが可能であるし、または多様な異なる種類のヌクレオシド間連結を有することが可能である。一般的に、多様な化学的修飾オリゴヌクレオチドの調製法、精製法、および使用法が、米国特許第 5, 948, 680 号に記載される。特別な例として、オリゴヌクレオチド合成に、以下の種類のヌクレオシド・ホスホロアミダイトが使用可能である：デオキシおよび 2' - アルコキシアミダイト；2' - フルオロデオキシアデノシンアミダイト、2' - フルオロデオキシグアノシン、2' - フルオロウリジン、および 2' - フルオロデオキシシチジンなどの 2' - フルオロアミダイト；2, 2' - アンヒドロ [1 - (ベータ - D - アラビノ - フラノシル) - 5 - メチルウリジン]、2' - O - メトキシエチル - 5 - メチルウリジン、2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルウリジン、3' - O - アセチル - 2' - O - メトキシ - エチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルウリジン、3' - O - アセチル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチル - 4 - トリアゾールウリジン、2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン、N4 - ベンゾイル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン、および N4 - ベンゾイル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジ - メトキシトリチル - 5 - メチルシチジン - 3' - アミダイトなどの 2' - O - (2 - メトキシエチル) 修飾アミダイト；2' - (ジメチルアミノオキシエトキシ)ヌクレオシドアミダイト、5' - O - t e r t - ブチルジフェニルシリル - O² - 2' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン、5' - O - t e r t - ブチル - ジフェニルシリル - 2' - O - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 - メチルウリジン、2' - O - ([2 - フタルイミドオキシ]エチル) - 5' - t - ブチルジフェニル - シリル - 5 - メチルウリジン、5' - O - t e r t - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - [(2 - ホルマドクスイミノオキシ)エチル] - 5 - メチルウリジン、5' - O - t e r t - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - [N, N - ジメチルアミノオキシエチル] - 5 - メチルウリジン、2' - O - (ジメチルアミノオキシ - エチル) - 5 - メチルウリジン、5' - O - D M T - 2' - O - (ジメチルアミノオキシエチル) - 5 - メチルウリジン、および 5' - O - D M T - 2' - O - (2 - N, N - ジメチルアミノオキシエチル) - 5 - メチルウリジン - 3' - [(2 - シアノエチル) - N, N - ジイソプロピルホスホロ - アミダイト]などの 2' - O - (アミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイトおよび 2' - O - (ジメチルアミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイト；並びに N2 - イソブチリル - 6 - O - ジフェニル - カルバモイル - 2' - O - (2 - エチルアセチル) - 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル)グアノシン - 3' - [(2 - シアノエチル) - N, N - ジイソ - プロピルホスホロアミダイト]などの 2' - (アミノオキシエトキシ)ヌクレオシドアミダイト。

20

30

40

【0230】

修飾オリゴヌクレオシドもまた、オリゴヌクレオチド合成に使用可能であり、これらは例

50

例えば、MMI 連結オリゴヌクレオシドとも呼ばれるメチレンメチルイミノ連結オリゴヌクレオシド；MDH 連結オリゴヌクレオシドとも呼ばれるメチレン - ジメチルヒドラゾ連結オリゴヌクレオシド；アミド - 3 連結オリゴヌクレオシドとも呼ばれるメチレン - カルボニルアミノ連結オリゴヌクレオシド；およびアミド - 4 連結オリゴヌクレオシドとも呼ばれるメチレン - アミノカルボニル連結オリゴヌクレオチドとともに、米国特許第 5, 378, 825 号、第 5, 386, 023 号、第 5, 489, 677 号、第 5, 602, 240 号、および第 5, 610, 289 号に記載されるように調製される、例えば交互の MMI および P = O または P = S 連結を有する、混合主鎖化合物である。ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール連結オリゴヌクレオシドもまた使用可能であり、そしてこれらは米国特許第 5, 264, 562 号および第 5, 264, 564 号に記載されるように調製され；そしてエチレンオキシド連結オリゴヌクレオシドもまた使用可能であり、そしてこれらは米国特許第 5, 223, 618 号に記載されるように調製される。ペプチド核酸 (PNA) を上述のオリゴヌクレオチドと同じ方式で使用可能であり、そしてこれらは、Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23；並びに米国特許第 5, 539, 082 号、第 5, 700, 922 号、および第 5, 719, 262 号において言及される多様な方法のいずれかにしたがって調製される。

10

20

30

40

50

【0231】

本発明のキメラオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、または混合オリゴヌクレオチド / オリゴヌクレオシドは、いくつかの異なる種類であることが可能である。これらには、連結されるヌクレオシドの「ギャップ」セグメントが、連結されるヌクレオシドの 5' および 3' 「ウィング」セグメントの間に位置する第一の型、並びに「ギャップ」セグメントが、オリゴマー化合物の 3' 末端または 5' 末端のいずれかに位置する第二の「オープン端」型が含まれる。第一の型のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において「ギャップマー」またはギャップ化オリゴヌクレオチドとしても知られる。第二の型のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ヘミマー」または「ウィングマー」としても知られる。キメラオリゴヌクレオチドの異なる種類のいくつかの例は：すべて米国特許第 5, 948, 680 号にしたがって調製可能な、[2' - O - Me] - - [2' - デオキシ] - - [2' - O - Me] キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、[2' - O - (2 - メトキシエチル)] - - [2' - デオキシ] - - [2' - O - (メトキシエチル)] キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、および [2' - O - (2 - メトキシ - エチル) ホスホジエステル] - - [2' - デオキシホスホロ - チオエート] - - [2' - O - (2 - メトキシエチル) ホスホジエステル] キメラオリゴヌクレオチドである。1 つの好ましい態様において、4 ヌクレオチドの「ウィング」が両端 (5' および 3' 方向) に隣接する、10 の 2' - デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成される、長さ 18 ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド (「ギャップマー」) を利用する。ウィングは、2' - メトキシエチル (2' - MOE) ヌクレオチドで構成される。ヌクレオシド間 (主鎖) 連結は、オリゴヌクレオチド全体で、ホスホロチオエート (P = S) である。2' - MOE ウィング中のシチジン残基は 5 - メチルシチジンである。他のキメラオリゴヌクレオチド、キメラオリゴヌクレオシド、および混合キメラオリゴヌクレオチド / オリゴヌクレオシドは、米国特許第 5, 623, 065 号にしたがって合成される。

【0232】

オリゴヌクレオチドは、好ましくは、自動化合成装置上、固相 P (III) ホスホロアミダイト化学を介して合成される。試料の希釈および UV 吸収分光によって、各ウェル中のオリゴヌクレオチド濃度を評価する。キャピラリー電気泳動によって、個々の産物が全長で完全であることを評価し、そしてエレクトロスプレー質量分析を利用した、化合物の質量分析によって、塩基および主鎖組成を確認する。

【0233】

標的核酸発現に対するアンチセンス化合物の影響は、標的核酸が測定可能なレベルで存在する限り、多様な細胞種のいずれで試験することも可能である。これは、例えば、PCRまたはノーザンブロット解析を用いて、日常的に決定可能である。供給者に推奨されるように、細胞を10継代まで日常的に維持する。細胞が80%~90%集密 (confluency) に到達したら、細胞をオリゴヌクレオチドで処理する。96ウェルプレートで増殖させた細胞に関しては、ウェルを200マイクロリットルのOPTI-MEM-1血清減少培地 (Gibco BRL) で1回洗浄し、そしてその後、3.75 g/ml LIPOFECTIN (Gibco BRL) および最終濃度150 nMの所望のオリゴヌクレオチドを含有する130マイクロリットルのOPTI-MEM-1で処理する。処理4時間後、培地を新鮮な培地に交換する。オリゴヌクレオチド処理16時間後、細胞を採取する。好ましくは、いくつかの異なるオリゴヌクレオチドの効果を同時に試験すべきであり、この場合、最大の度合いの標的核酸発現阻害を生じるオリゴヌクレオチドを同定するため、オリゴヌクレオチドは標的核酸分子の異なる部分にハイブリダイズする。

10

【0234】

当該技術分野に知られる多様な方法で、DCL核酸発現のアンチセンス調節をアッセイすることが可能である。例えば、ノーザンブロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、またはリアルタイムPCRによって、DCL mRNAレベルを定量化することが可能である。現在、リアルタイム定量的PCRが好ましい。総細胞RNAまたはポリ(A)+mRNAに対して、RNA解析を行うことが可能である。RNA単離法およびノーザンブロット解析法は、例えば、Ausubel, F.M.ら, Current Protocols in Molecular Biology, Volume 1, pp. 4.1.1-4.2.9および4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1996に解説される。リアルタイム定量的 (PCR) は、PE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティーから入手可能であり、そして製造者の指示にしたがって用いる、商業的に入手可能なABI PRISM 7700配列検出システムを用いて好適に達成可能である。この蛍光検出システムは、PCR産物の高処理定量化を可能にする。PCRが完了した後に増幅産物を定量化する標準的PCRと対照的に、リアルタイム定量的PCRでは、集積すると同時に産物を定量化する。順方向および逆方向PCRプライマーの間に特異的にアニーリングし、そして2つの蛍光色素を含有するオリゴヌクレオチドプローブをPCR反応に含むことによって、これを達成する。レポーター色素 (例えばJOEまたはFAM、Operon Technologies Inc.、カリフォルニア州アラメダ、またはPE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティーから得る) をプローブの5'端に付着させ、そして消光剤色素 (例えばTAMRA、Operon Technologies Inc.、カリフォルニア州アラメダ、またはPE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティーから得る) をプローブの3'端に付着させる。プローブおよび色素が損なわれていなければ、レポーター色素の発光は、3'消光剤色素が近接することによって消光される。増幅中、標的配列にプローブがアニーリングして基質が生成され、該基質はTaqポリメラーゼの5'-エキソヌクレアーゼ活性によって切断可能である。PCR増幅周期の伸長期中、Taqポリメラーゼによるプローブの切断によって、プローブの残りから (そしてしたがって消光剤部分から) レポーター色素が放出され、そして配列特異的蛍光シグナルが生成される。各周期で、さらなるレポーター色素分子が各々のプローブから切断され、そしてABI PRISM 7700配列検出系に内蔵されたレーザー・オプティクスによって、定期的な間隔 (6秒間隔) で蛍光強度を監視する。各アッセイにおいて、未処理対照試料由来のmRNAの一連の希釈を含有する一連の平行反応によって標準曲線を生成し、これを用いて、試験試料のアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後の阻害パーセントを定量化する。定量的PCR解析の他の方法もまた、当該技術分野に知られる。免疫沈降、ウェスタンブロット解析 (イムノブロットティング)、ELISA、または蛍光活性化細胞分取 (FA

20

30

40

50

C S)などの当該技術分野に周知の多様な方法で、D C Lタンパク質レベルを定量化可能である。D C Lポリペプチドに対して向けられる抗体は、本明細書に記載するような慣用的な抗体生成法を介して調製可能である。免疫沈降法、ウェスタンブロット(イムノブロット)解析、および酵素連結免疫吸着アッセイ(E L I S A)が当該技術分野で標準的である(例えばAusubel, F. M.ら, Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.16.1 - 10.16.11, 10.8.1 - 10.8.21, および11.2.1 - 11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991を参照されたい)。

【0235】

10

本明細書に引用するすべての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が具体的にそして個別に本明細書に援用されると示されるかのように、本明細書に援用される。

【0236】

前述の発明は、理解を明確にする目的で、例示によってある程度詳細に記載されているが、本発明の解説に照らして、付随する請求項の精神または範囲から逸脱することなく、特定の変化および修飾を行うことが可能であることが、一般の当業者には容易に理解可能であろう。

【0237】

配列識別名

20

配列番号1はD C L 1の全長c D N A配列である。

配列番号2はD C L 1の全長O R Fアミノ酸配列である。

【0238】

配列番号3はD C L 1をクローニングするためのセンス方向P C Rプライマーである。

配列番号4はD C L 1をクローニングするためのアンチセンス方向P C Rプライマーである。

【0239】

配列番号5はD C L 2の全長c D N A配列である。

配列番号6はD C L 2の全長O R Fアミノ酸配列である。

配列番号7はD C L 2をクローニングするためのセンス方向P C Rプライマーである。

30

【0240】

配列番号8はD C L 2をクローニングするためのアンチセンス方向P C Rプライマーである。

配列番号9は、D C L 2の選択的スプライシング変異体のc D N A配列である(エクソン3が欠失)。

【0241】

配列番号10は、D C L 2の選択的スプライシング変異体のアミノ酸配列である(エクソン3が欠失)。

配列番号11はD C L 3の全長c D N A配列である。

【0242】

40

配列番号12はD C L 3の全長O R Fアミノ酸配列である。

配列番号13はD C L 3をクローニングするためのセンス方向P C Rプライマーである。

【0243】

配列番号14はD C L 3をクローニングするためのアンチセンス方向P C Rプライマーである。

配列番号15は、D C L 3の選択的スプライシング変異体のc D N A配列である(エクソン4および5が欠失)。

【0244】

配列番号16は、D C L 3の選択的スプライシング変異体のアミノ酸配列である(エクソン4および5が欠失)。

50

配列番号 17 は D C L 4 の全長 c D N A 配列である。

【 0 2 4 5 】

配列番号 18 は D C L 4 の全長 O R F アミノ酸配列である。

配列番号 19 は D C L 4 をクローニングするためのセンス方向 P C R プライマーである。

【 0 2 4 6 】

配列番号 20 は D C L 4 をクローニングするためのアンチセンス方向 P C R プライマーである。

配列番号 21 は、D C L 4 の選択的スプライシング変異体の c D N A 配列である（エクソン 4 が欠失）。

【 0 2 4 7 】

配列番号 22 は、D C L 4 の選択的スプライシング変異体のアミノ酸配列である（エクソン 4 が欠失）。

配列番号 23 は D C L 5 の全長 c D N A 配列である。

【 0 2 4 8 】

配列番号 24 は D C L 5 の全長 O R F アミノ酸配列である。

配列番号 25 は D C L 5 をクローニングするためのセンス方向 P C R プライマーである。

【 0 2 4 9 】

配列番号 26 は D C L 5 をクローニングするためのアンチセンス方向 P C R プライマーである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 5 0 】

【 図 1 】 図 1 は、D C L 1 のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列を示す。ポリヌクレオチド配列中の記号は、エクソン/イントロン接合部を示し（イントロンは示していない）、そして下線領域は、P C R 反応で用いるオリゴヌクレオチドプライマーの位置を示す。ポリペプチド配列において、イタリックタイプは、予測される膜貫通ドメインを示し；囲んだ配列は、予測されるアスパルチル（または酸）プロテアーゼドメインを示し；太字のイタリックタイプは、I T I M モチーフを示し；下線領域は C 型レクチンドメインを示し、そして太字タイプは、推定上の N 連結グリコシル化部位を示す。

【 図 2 】 図 2 は、D C L 2 のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列を示す。図 1 に関して記載したのと同じ注釈を図 2 でもまた使用する。

【 図 3 】 図 3 は、D C L 3 のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列を示す。図 1 に関して記載した注釈を図 3 でもまた使用する。

【 図 4 】 図 4 は、D C L 4 のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列を示す。図 1 に関して記載した注釈を図 4 でもまた使用する。

【 図 5 】 図 5 は、D C L 5 のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列を示す。図 1 に関して記載した注釈を図 5 でもまた使用する。

10

20

30

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



PCT

WO 03/031578 A2

[US/US]; 1222 NE 105th Place, Seattle, WA 98125 (US).
ANDERSON, Dirk, M. [US/US]; 3616 NW 64th Street,
 Seattle, WA 98107 (US).

(2D) International Application Number: PCT/US02/31996

(22) International Filing Date: 4 October 2002 (04.10.2002)

(74) **Agent:** **KLANIECKI, James, E.**; Law Department, 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).

(25) **Filing Language:** English

(26) **Publication Language:** English

(30) Priority Data:
60/328,026 9 October 2001 (09.10.2001) US

GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): **IMMUNEX CORPORATION** [US/US]; Law Department, 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

(75) Inventors/Applicants (for US only): BUTZ, Eric, A.

[Continued on next page]

(54) Title: MAMMALIAN C-TYPE LECTINS

DOI: 10.1002/for

[illegible]

MALPHIYTDVFNPNQPVSSQ:TSDSSECTVSDSSSALPKK¹TIHKSNTGPFRLLLALW²
 PLLGALPSVAA³ILINYSOLLLEK⁴YTLERLNGARLHC⁵VKNK⁶SVSDRVWGCC⁷PQNRK⁸
 FDSHCY⁹TSRDTASNS¹⁰SEEEK¹¹SLRGAA¹²LVIQSQQEQ¹³LI¹⁴NTLNPRAA¹⁵YVGL¹⁶SP¹⁷KG¹⁸
 HGQKWV¹⁹QCTPYD²⁰QAT²¹SWNS²²DEP²³SGRT²⁴SC²⁵PLSV²⁶IRN²⁷KG²⁸W²⁹SV³⁰AP³¹CD³²GHE³³LIC³⁴EN³⁵
 RGLV³⁶

(57) Abstract: The present invention provides novel mammalian C-type lectin polypeptides associated with antigen presenting cells. Designated as Dendritic Cell C-type Lectins (DCL), the following four novel genes have been discovered: DCL 1, DCL 2, DCL 3 and DCL 4, as well as splice variants svDCL 2, svDCL 3 and svDCL 4, and a human homologue herein designated DCL 5. The present invention provides polynucleotides encoding DCL polypeptides, recombinant expression vectors, host cells transfected with the recombinant expression vectors, methods of producing and isolating the polypeptides, and methods of screening assays. Therapeutic compositions and methods of treating various diseases are also provided.

WO 03/031578 A2

WO 03/031578 A2 

US, IL, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). *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.*

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 03/031578

PCT/US02/31996

MAMMALIAN C-TYPE LECTINS**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

- 5 This application claims the benefit under 35 U.S.C. §119(e) to U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/328,026, filed October 9, 2001, the disclosure of which is incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

- 10 The present invention provides novel C-type lectin family members expressed in antigen presenting cells, and in one particular embodiment, C-type lectins upregulated on dendritic cells in response to stimulation with bacterial lipopolysaccharide (LPS).

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 15 Host defense systems rely on innate and adaptive immunity to protect the host from infectious agents and injury. The innate immune system includes several immunoregulatory components such as complement, natural killer cells and phagocytic cells and is characterized by the capacity to rapidly recognize pathogenic and/or tissue injury as well as the ability to send a variety of signals to cells of the adaptive immune system. Cells of the innate system use a variety of receptors to recognize patterns shared
20 between pathogens, for example, bacterial lipopolysaccharide (LPS), carbohydrates, and double-stranded viral RNA. The adaptive immune system, or humoral and cell mediated immunity, is characterized by the ability to rearrange genes of the immunoglobulin family, permitting a large diversity of antigen-specific clones and immunological memory. Antigen presenting cells (APCs) serve to instruct and regulate the cells of the
25 adaptive immune system.

- Dendritic cells (DCs) are unique APCs in that they are the only cells known to induce primary T-cell responses, thereby allowing antigen-specific immune responses and establishing immunological memory. DCs are professional APCs that are especially
30 efficient stimulators of B and T lymphocytes. DCs have the capacity to prime naïve T cells to mismatched MHC, superantigens (Bhardwaj, N., et al., *J. Exp. Med.* 178, 633-642 (1993)), proteins from infectious agents (Inaba, K., et al., *J. Exp. Med.*, 178, 479-488 (1993)) and tumors (Mayordomo, J.L., et al., *Nature Med.*, 1, 1297-1302, (1995); Hsu, F. J., et al., *Nature Med.*, 2, 52-58, (1996)). DCs are extremely efficient in activating T-cells, and in mixed lymphocyte reactions, one DC may activate from 100 to 3,000 T-cells.
35 Researchers have yet to pinpoint the basis for the T-cell binding and activation efficiency of DCs, but it appears that the unique stimulatory properties of DCs may be attributable in part to the fact that MHC products and MHC-peptide complexes are 10 to 100 times

WO 03/031578

PCT/US02/31996

higher on DCs than on other APCs, such as B-cells and monocytes (Inaba, K., et al., *J. Exp. Med.*, 186, 665-672 (1997)). In addition, subsets of mature DCs resist the suppressive effects of IL-10 and synthesize high levels of IL-12, which in turn enhances innate immunity in the form of natural killer cells and acquired immunity by T and B cells (Koch, F., et al., *J. Exp. Med.*, 184, 741-747 (1996)). Furthermore, DCs upregulate and express many accessory molecules that interact with receptors on T cells to enhance adhesion and costimulation, such as LFA-3/CD58, ICAM-1/CD54 and B7-2/CD86 (Banchereau, et al., *Nature*, 392, 245-252, (1998)).

DCs are located in most tissues where they serve a sentinel role by capturing and processing antigens. In one form, DC precursors migrate from bone marrow and circulate in the blood to specific sites in the body, where they mature. This trafficking is partially directed by expression of chemokine receptors and adhesion molecules. This link between DC traffic pattern and function has led to the investigation of the chemokine responsiveness of DC during their development and maturation. For a review of the effect of chemokines on dendritic cell subsets, see Dieu-Nosjean, *J. Leuk. Biol.* 66(2):252-62, 1999. In general, upon exposure to antigen and activation signals the DCs are activated and upregulate costimulatory and adhesion molecules, and leave tissues to migrate via the afferent lymphatics to the T-cell rich paracortex of the draining lymph nodes. The activated DCs then secrete chemokines and cytokines involved in T-cell homing and activation, and present processed antigen to T-cells. For example, DC-SIGN, a DC-specific C-type lectin, has been shown to support tethering and rolling of DC-SIGN-positive cells on the vascular ligand ICAM-2. This process may be a prerequisite for emigration from the blood, and it has been shown that the DC-SIGN:ICAM-2 interaction regulates chemokine-induced transmigration of DCs across both resting and activated endothelium (Teunis, B.H., et al., *Nature* 1:353-357, 2000). Furthermore, DC-SIGN has been demonstrated to mediate transient adhesion with ICAM-3 expressed on resting T-cells and that binding to ICAM-3 plays an important role in establishing the first contact between DC and T cells and facilitates subsequent low-avidity interactions with other adhesion molecules that enable productive T cell receptor engagement followed by adhesion strengthening (Teunis, B.H., et al., *Cell* 100:575-585, 2000).

Immature DCs are very efficient in antigen capture and use several pathways, such as macropinocytosis; receptor-mediated endocytosis via C-type lectin receptors or Fcγ receptor types I (CD64) and II (CD32) for internalization of immune complexes and phagocytosis of particulates. Phagocytosis of particulates include apoptotic and necrotic cell fragments involving CD36 and αVβ3 or αVβ5 integrins (Albert, M.L., et al., *J. Exp. Med.* 188:1359-68, 1998; Rubartelli, A., et al., *Eur. J. Immunol.* 27:1893-900, 1997), viruses and bacteria, as well as intracellular parasites (Moll, H., et al., *Immunol Today*, 14:383-87, 1993). DCs also have the capacity to internalize peptide-loaded heat shock

WO 03/031578

PCT/US02/31996

proteins gp96 and Hsp70 (Arnold-Schild, D., et al., *J. Immunol.* 162:3757-60, 1999). CD91, the widely expressed $\alpha 2$ -macroglobulin receptor, has been shown to be a receptor for gp96 (Binder, J.R., et al., *J. Immunol.* 1:151-55, 2000). In certain DC subtypes, the uptake of antigen induces the immature DC to undergo phenotypic and functional changes that culminate in the complete transition from an antigen capturing cell to an antigen presenting cell.

The role of receptor-mediated endocytosis via C-type (Ca^{2+} -dependent) lectin receptors, such as the mannose receptor (Hart, D.N., et al., *Blood* 90:3245:87, 1997) and DEC-205 (Jiang, W., et al., *Nature* 375:151-55, 1995), is a subject of great interest in DC biology. The mannose-binding-lectin pathway (MBL), which includes the complement activation pathway, is mediated by the binding of the MBL to carbohydrates via a carbohydrate recognition domain (CRD). The CRD binding is sugar-selective and calcium dependent. The MBL binds to an array of carbohydrate structures on the surfaces of microorganisms, which in turn, mediates an antimicrobial response by direct killing via complement through the lytic membrane attack complex or by promoting phagocytosis of the organism. The capacity to discriminate between self and non-self structures resides in the specificity of the CRD and in the spatial arrangement of the CRDs. For a review of the MBL pathway, see Gadjeva, M., et al., *Curr. Opin. Immunol.* 13:74-78, 2001.

A number of groups have identified several new C-type lectins unique to macrophages and DC, such as the murine macrophage-restricted C-type lectin (mMCL) (Balch, S., et al., *J. Biol. Chem.* 273:18656-64, 1998); Langerin, the Langerhans cell-specific C-type lectin (Valladeau, J., *Immunity* 12:71-81, 2000); Mincle, a macrophage-inducible C-type lectin that is a transcriptional target of NF- κ B in murine peritoneal macrophages (Matsumoto, M., et al., *J. Immunol.* 163:5039-48, 1999); DCIR, the human dendritic cell immunoreceptor, a type II glycoprotein with homology to the macrophage lectin and hepatic asialoglycoprotein receptors (Bates, E., et al., *J. Immunol.* 163:1973-83, 1999 and USPN 6,277,959); and, murine Dectin-1 and Dectin-2 (DC-associated C-type lectins; Ariizumi, K., et al., *J. Biol. Chem.*, 275:20157-167, 2000 and Ariizumi, K., et al., *J. Biol. Chem.*, 275:11957-963, 2000, respectively), which are thought to be involved in delivering T-cell costimulatory signals.

To date, the role of C-type lectins in APC and particularly DC biology is not fully understood. For example, C-type lectins may play a role in APC/DC activation, differentiation, maturation, migration, antigen capture, antigen processing and presentation, as well as interactions with T, B and other cells of the immune system. Manipulation of these aspects of APC/DC biology may be useful in the areas of inflammation, oncology, autoimmunity, infectious disease, transplantation, adjuvants and vaccines. The present invention addresses such issues.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is based upon the discovery of novel C-type lectin family members expressed in APCs, and in one particular embodiment, C-type lectins upregulated on DCs in response to stimulation with LPS.

In another aspect, the present invention provides novel mammalian C-type lectin polypeptides associated with murine dendritic cells herein designated Dendritic Cell C-type Lectins (DCL). Namely, DCL 1 (SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:12) and DCL 4 (SEQ ID NO:22), as well as splice variants svDCL 2 (SEQ ID NO:10), svDCL 3 (SEQ ID NO:16) and svDCL 4 (SEQ ID NO:22), and a human homologue, herein designated DCL 5 (SEQ ID NO:24). The present invention provides polynucleotides encoding DCL polypeptides and recombinant expression vectors that include polynucleotides encoding DCL polypeptides. The present invention additionally provides methods for isolating DCL polypeptides and methods for producing recombinant DCL polypeptides by cultivating host cells transfected with the recombinant expression vectors under conditions appropriate for expressing C-type lectin polypeptides and recovering the expressed lectin polypeptides.

The invention provides an isolated polypeptide consisting of, consisting essentially of, or more preferably, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, 6, 10, 12, 16, 18, 22 or 24;
- (b) an amino acid sequence selected from the group consisting of: amino acids 1 through 245 of SEQ ID NO:2 and amino acids 77 through 245 of SEQ ID NO:2;
- (c) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 comprising all or part of the extracellular domain having at least one DCL activity;
- (d) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids having at least one DCL activity;
- (e) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids having a C-type lectin domain;
- (f) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids having an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory-like motif (ITIM) amino acid sequences;
- (g) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids that are immunogenic;
- (h) amino acid sequences comprising at least 25 amino acids and sharing amino acid identity with the amino acid sequences of any of (a)-(g), wherein the percent amino acid identity is selected from the group consisting of: at least 80%, at least 85%, at least 90%,

WO 03/031578

PCT/US02/31996

at least 95%, at least 97.5%, at least 99%, and at least 99.5%, wherein the amino acid sequences have at least one DCL activity; and

- (i) amino acid sequences comprising at least 20 amino acids having at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the amino acid sequences have at least one DCL activity.

Other aspects of the invention are isolated nucleic acids encoding polypeptides of the invention, with a preferred embodiment being an isolated nucleic acid consisting of, or more preferably, comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) SEQ ID NO:1, 5, 9, 11, 15, 17, 21 and 23; and
(b) allelic variants of (a).

The invention also provides an isolated genomic nucleic acid corresponding to the nucleic acids of the invention.

Other aspects of the invention are isolated nucleic acids encoding polypeptides of the invention, and isolated nucleic acids, preferably having a length of at least 15 contiguous nucleotides, that hybridize under conditions of moderate stringency to the nucleic acids encoding polypeptides of the invention. In preferred embodiments of the invention, such nucleic acids encode a polypeptide having C-type lectin polypeptide activity, or comprise a nucleotide sequence that shares nucleotide sequence identity with the nucleotide sequences of the nucleic acids of the invention, wherein the percent nucleotide sequence identity is selected from the group consisting of: at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, at least 99%, and at least 99.5%.

Further provided by the invention are expression vectors and recombinant host cells comprising at least one nucleic acid of the invention, and preferred recombinant host cells wherein said nucleic acid is integrated into the host cell genome.

Also provided is a process for producing a polypeptide encoded by the nucleic acids of the invention, comprising culturing a recombinant host cell under conditions promoting expression of said polypeptide, wherein the recombinant host cell comprises at least one nucleic acid of the invention. In another aspect of the invention, the polypeptide produced by said process is provided.

Further within the scope of the present invention are processes for purifying or separating DCL polypeptides or cells that express DCL polypeptides. Such processes include binding at least one binding partner to a solid phase matrix and contacting a mixture containing a DCL polypeptide(s) to which the DCL polypeptide(s) binds, or a mixture of cells expressing the DCL polypeptide(s), and then separating the contacting surface and the solution.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Further aspects of the invention include isolated antibodies, monoclonal antibodies, human or humanized antibodies and the like, as described in more detail below, that bind to the polypeptides of the invention. Further embodiments include such antibodies that agonize the DCL activity of said polypeptides. Further embodiments
5 include such antibodies that inhibit (antagonize) the binding of DCL polypeptides to their natural ligand(s).

The invention additionally provides a method of designing an inhibitor of the DCL polypeptides, the method comprising the steps of determining the three-dimensional structure of any such polypeptide, analyzing the three-dimensional structure for the likely
10 binding sites of substrates, synthesizing a molecule that incorporates a predicted reactive site, and determining the polypeptide-inhibiting activity of the molecule.

In a further aspect of the invention, a method is provided for identifying compounds that alter DCL polypeptide activity comprising

- (a) mixing a test compound with a polypeptide of the invention; and
- 15 (b) determining whether the test compound alters the DCL polypeptide activity of said polypeptide.

In another aspect of the invention, a method is provided identifying compounds that inhibit the binding activity of DCL polypeptides comprising

- (a) mixing a test compound with a polypeptide of the invention and a binding
20 partner of said polypeptide; and
- (b) determining whether the test compound inhibits the binding activity of said polypeptide.

In alternative embodiments, the binding partner is a natural ligand, which may be an antigen, which in turn may be an/a oligosaccharide, polysaccharide, carbohydrate,
25 glycoprotein, phospholipid, glycolipid, glycosphingolipid and the like; the natural ligand may be selected from the group consisting of bacterial, viral, fungal or protozoan polypeptides, as well as cell membrane-associated polypeptides. A binding partner may alternatively comprise an antibody, either agonistic or antagonistic to DCL activity. Also, a binding partner may comprise a fragment, derivative, fusion protein or peptidomimetic
30 of a DCL natural ligand.

The invention also provides a method for increasing DCL polypeptide activities comprising providing at least one compound selected from the group consisting of the polypeptides of the invention and agonists of said polypeptides. An additional embodiment of the method further comprising increasing said activities in a patient by
35 administering at least one polypeptide of the invention. Agonists may comprise antibodies, isolated DCL polypeptide(s) or fragment(s) thereof, DCL peptide(s) and/or peptidomimetic(s).

WO 03/031578

PCT/US02/31996

DCL polypeptide activities include, but are not limited to, antigen binding, antigen internalization, antigen processing and antigen presentation; antigen presenting cell (APC) activation, APC differentiation, APC maturation, APC homing and APC transmigration; cell to cell interactions including binding and modulation of intracellular signaling pathways in either an excitatory or inhibitory manner; extracellular communication through secretion of soluble factors that act in an autocrine, paracrine and/or endocrine fashion; C-type lectin activity; carbohydrate recognition domain activity; aspartyl protease activity and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory-like motif (ITIM) activity. Examples of cells that may bind to APCs expressing DCL polypeptides include cells of the immune system, including T-cells, B-cells, NK cells, as well as precursors thereof.

Further provided by the invention is a method for decreasing one or more of the activities described immediately above, comprising providing at least one antagonist of the polypeptides of the invention; with a preferred embodiment of the method further comprising decreasing said activities in a patient by administering at least one antagonist of the polypeptides of the invention, and with a further preferred embodiment wherein the antagonist is an antibody, an isolated DCL polypeptide or fragment thereof, DCL peptide and/or peptidomimetic that inhibits the activity of any of said polypeptides.

In other aspects, the invention provides assays utilizing DCL compositions to screen for potential agonists and/or antagonists of DCL activity and/or DCL-associated cellular events. In addition, methods of using DCL polypeptides, polynucleotides, fragments, variants, muteins, fusion proteins, antibodies, binding proteins and the like in the rational design of antagonists and/or agonists thereof are also an aspect of the invention.

The invention additionally provides a method for treating autoimmune disorders, inflammation, cancer, transplantation-associated conditions, and infectious diseases comprising administering at least one compound selected from the group consisting of the polypeptides of the invention and agonists and antagonists of said polypeptides.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows the polynucleotide and polypeptide sequences for DCL 1. The || symbol in the polynucleotide sequence denotes exon/intron junction (introns not shown) and underlined regions show the positions of oligonucleotide primers used in PCR reactions. In the polypeptide sequence, italic type indicates predicted transmembrane domains; boxed sequences indicate predicted aspartyl (or acid) protease domains; bold-italic type denotes an ITIM motif; underlined regions indicate C-type lectin domains and bold type indicates putative N-linked glycosylation sites.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Figure 2 shows the polynucleotide and polypeptide sequences for DCL 2. The same annotations described for Figure 1 are also employed in Figure 2.

Figure 3 shows the polynucleotide and polypeptide sequences for DCL 3. The annotations described for Figure 1 are employed in Figure 3.

5 Figure 4 shows the polynucleotide and polypeptide sequences for DCL 4. The annotations described for Figure 1 are employed in Figure 4.

Figure 5 shows the polynucleotide and polypeptide sequences for DCL 5. The annotations described for Figure 1 are employed in Figure 5.

10 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed to identifying, isolating and characterizing novel members of the calcium-dependent (C-type) lectin family associated with mammalian cells, and in particular, antigen presenting cells of the DC lineage. The present invention provides novel polypeptides having C-type lectin domains that are expressed on murine dendritic cells, herein designated as DCL 1, DCL 2, DCL 3 and DCL 4, as well as splice variants svDCL 2, svDCL 3 and svDCL 4, and a human homologue herein designated DCL 5. For convenience, DCL 1, DCL 2, DCL 3, DCL 4 and DCL 5 (as well as splice variants and homologs) are often referred to collectively as DCL polypeptides. When using the term DCL, it is understood to mean one or more of DCL 1, 2, 3, 4 and/or 5, as well as splice variants svDCL 2, svDCL 3 and svDCL 4, alone or in any combination.

20 The present invention provides polynucleotides encoding DCL polypeptides and recombinant expression vectors that include polynucleotides encoding DCL polypeptides. The present invention additionally provides methods for isolating DCL polypeptides and methods for producing recombinant DCL polypeptides by cultivating host cells transfected or transformed with the recombinant expression vectors under conditions appropriate for expressing polypeptides of the present invention and recovering the expressed polypeptides.

30 It is to be understood that this invention is not limited to the particular methodology, protocols, cell lines, animal species or genera, constructs, and reagents described, as such may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to limit the scope of the present invention which will be limited only by the appended claims.

35 The term "vector" is used to refer to any molecule (e.g. nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell. The term "expression vector" refers to a vector that is suitable for transformation of a host cell and contains nucleic acid sequences that direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

The term "operably linked" is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

The term "host cell" is used to refer to a cell that has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

The term "DCL polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or a truncation at the carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NOs: 2, 6, 10, 12, 16, 18, 22 and 24. The term "DCL polypeptide fragment" also refers to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of DCL polypeptide orthologs, DCL polypeptide derivatives, or DCL polypeptide variants, or to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of the polypeptides encoded by DCL polypeptide allelic variants or DCL polypeptide splice variants. DCL polypeptide fragments may result from alternative RNA splicing or from in vivo protease activity. Membrane-bound forms of an DCL polypeptide, are also contemplated by the present invention. In preferred embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids. Such DCL polypeptide fragments may optionally comprise an amino-terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to DCL polypeptides.

The term "DCL polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to DCL polypeptide amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. For example, mouse and human DCL polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "DCL polypeptide variants" refers to DCL polypeptides comprising

WO 03/031578

PCT/US02/31996

amino acid sequences having at least one amino acid sequence substitutions, deletions (such as internal deletions and/or DCL polypeptide fragments), and/or additions (such as internal additions and/or DCL fusion polypeptides) as compared to the DCL polypeptide amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 (with or without a leader sequence). Variants may be naturally occurring (e.g., DCL polypeptide allelic variants, DCL polypeptide orthologs, and DCL polypeptide splice variants) or artificially constructed. Such DCL polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

The term "DCL polypeptide derivatives" refers to the polypeptide as set forth in either DCL 1 (SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:12) and DCL 4 (SEQ ID NO:22), as well as splice variants svDCL 2 (SEQ ID NO:10), svDCL 3 (SEQ ID NO:16) and svDCL 4 (SEQ ID NO:22), and a human homologue, herein designated DCL 5 (SEQ ID NO:24); DCL polypeptide fragments; DCL polypeptide orthologs; or DCL polypeptide variants; as defined herein, that have been chemically modified. The term "DCL polypeptide derivatives" also refers to the polypeptides encoded by DCL polypeptide allelic variants or DCL polypeptide splice variants, as defined herein, that have been chemically modified.

The term "mature DCL polypeptide" refers to a DCL polypeptide lacking a leader sequence. A mature DCL polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl-terminus, cleavage of a smaller polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like. Exemplary mature DCL polypeptides are depicted by the amino acid sequences of DCL 1 (SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:12) and DCL 4 (SEQ ID NO:22), as well as splice variants svDCL 2 (SEQ ID NO:10), svDCL 3 (SEQ ID NO:16) and svDCL 4 (SEQ ID NO:22), and a human homologue, herein designated DCL 5 (SEQ ID NO:24).

The term "DCL fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous protein or peptide) at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in DCL 1 (SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:12) and DCL 4 (SEQ ID NO:22), as well as splice variants svDCL 2 (SEQ ID NO:10), svDCL 3 (SEQ ID NO:16) and svDCL 4 (SEQ ID NO:22), and a human homologue, herein designated DCL 5 (SEQ ID NO:24), DCL polypeptide fragments, DCL polypeptide orthologs, DCL polypeptide variants, or DCL derivatives, as defined

WO 03/031578

PCT/US02/31996

herein. The term "DCL fusion polypeptide" also refers to a fusion of one or more amino acids at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide encoded by DCL polypeptide allelic variants or DCL polypeptide splice variants, as defined herein.

The term "biologically active DCL polypeptides" refers to DCL polypeptides having at least one DCL activity characteristic of the polypeptide comprising the amino acid sequence of DCL 1 (SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:12), DCL 4 (SEQ ID NO:22) and DCL 5 (SEQ ID NO:24), as well as splice variants svDCL 2 (SEQ ID NO:10), svDCL 3 (SEQ ID NO:16) and svDCL 4 (SEQ ID NO:22). Examples of DCL activities include, but are not limited to, antigen binding, antigen internalization, antigen processing and antigen presentation; antigen presenting cell (APC) activation, APC differentiation, APC maturation, APC homing and APC transmigration; cell to cell interactions including binding and modulation of intracellular signaling pathways in either an excitatory or inhibitory manner; extracellular communication through secretion of soluble factors that act in an autocrine, paracrine and/or endocrine fashion; C-type lectin activity; carbohydrate recognition domain activity; aspartyl protease activity and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory-like motif (ITIM) activity. Examples of cells that may bind to APCs expressing DCL polypeptides include cells of the immune system, including T-cells, B-cells, NK cells, as well as precursors thereof.

In addition, a DCL polypeptide may be active as an immunogen; that is, the DCL polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

The term "transformation" as used herein refers to a change in a cell's genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain a new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction, the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the cell, may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or may replicate independently as a plasmid. A cell is considered to have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

A "peptibody" refers to molecules comprising an Fc domain and at least one peptide. Such peptibodies may be multimers or dimers or fragments thereof, and they may be derivatized. Peptibodies are described in greater detail in WO 00/24782 and WO 01/83525, which are incorporated herein by reference in their entirety. The peptide may

WO 03/031578

PCT/US02/31996

be from the amino acid sequence of DCL 1 (SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:12) and DCL 4 (SEQ ID NO:22), as well as splice variants svDCL 2 (SEQ ID NO:10), svDCL 3 (SEQ ID NO:16) and svDCL 4 (SEQ ID NO:22), and a human homologue, herein designated DCL 5 (SEQ ID NO:24).

5 A "peptide," as used herein refers to molecules of 1 to 40 amino acids. Alternative embodiments comprise molecules of 5 to 20 amino acids. Exemplary peptides may comprise portions of the extracellular domain of naturally occurring molecules or comprise randomized sequences of DCL 1 (SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:12) and DCL 4 (SEQ ID NO:22), as well as splice variants svDCL 2 (SEQ ID NO:10), svDCL 3 (SEQ ID NO:16) and svDCL 4 (SEQ ID NO:22), and a human homologue, herein designated DCL 5 (SEQ ID NO:24).

10 The term "randomized" as used to refer to peptide sequences refers to fully random sequences (e.g., selected by phage display methods or RNA-peptide screening) and sequences in which one or more residues of a naturally occurring molecule is replaced by an amino acid residue not appearing in that position in the naturally occurring molecule. Exemplary methods for identifying peptide sequences include phage display, *E. coli* display, ribosome display, RNA-peptide screening, chemical screening, and the like.

15 The term "Fc domain" encompasses native Fc and Fc variant molecules and sequences as defined below. As with Fc variants and native Fc's, the term "Fc domain" includes molecules in monomeric or multimeric form, whether digested from whole antibody or produced by other means.

20 The term "native Fc" refers to molecule or sequence comprising the sequence of a non-antigen-binding fragment resulting from digestion of whole antibody, whether in monomeric or multimeric form. The original immunoglobulin source of the native Fc is preferably of human origin and may be any of the immunoglobulins, although IgG1 and IgG2 are preferred. Native Fc's are made up of monomeric polypeptides that may be linked into dimeric or multimeric forms by covalent (i.e., disulfide bonds) and non-covalent association. The number of intermolecular disulfide bonds between monomeric subunits of native Fc molecules ranges from 1 to 4 depending on class (e.g., IgG, IgA, IgE) or subclass (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2). One example of a native Fc is a disulfide-bonded dimer resulting from papain digestion of an IgG (see Ellison *et al.* (1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9). The term "native Fc" as used herein is generic to the monomeric, dimeric, and multimeric forms.

30 The term "Fc variant" refers to a molecule or sequence that is modified from a native Fc but still comprises a binding site for the salvage receptor, FcRn. International applications WO 97/34631 (published 25 September 1997) and WO 96/32478 describe exemplary Fc variants, as well as interaction with the salvage receptor, and are hereby

WO 03/031578

PCT/US02/31996

incorporated by reference in their entirety. Thus, the term "Fc variant" comprises a molecule or sequence that is humanized from a non-human native Fc. Furthermore, a native Fc comprises sites that may be removed because they provide structural features or biological activity that are not required for the fusion molecules of the present invention. Thus, the term "Fc variant" comprises a molecule or sequence that lacks one or more native Fc sites or residues that affect or are involved in (1) disulfide bond formation, (2) incompatibility with a selected host cell (3) N-terminal heterogeneity upon expression in a selected host cell, (4) glycosylation, (5) interaction with complement, (6) binding to an Fc receptor other than a salvage receptor, or (7) antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Fc variants are described in further detail hereinafter.

A "peptidomimetic" is a peptide analog that displays more favorable pharmacological properties than their prototype native peptides, such as a) metabolic stability, b) good bioavailability, c) high receptor affinity and receptor selectivity, and d) minimal side effects. Designing peptidomimetics and methods of producing the same are known in the art (see for example, U.S.P.N. 6,407,059 and 6,420,118). Peptidomimetics may be derived from the binding site of the extracellular domain of DCL 1-5 and splice variants svDCL 2, svDCL 3 and svDCL 4. In alternative embodiments, a peptidomimetic comprises non-peptide compounds having the same three-dimensional structure as peptides derived from DCL 1-5 and splice variants svDCL 2, svDCL 3 and svDCL 4, or compounds in which part of a peptide from the molecules listed above is replaced by a non-peptide moiety having the same three-dimensional structure.

A "mimotope" is defined herein as peptide sequences that mimic binding sites on proteins (see, Partidos, CD, *et al.*, *Combinatorial Chem & High Throughput Screening*, 2002 5:15-27). A mimotope may have the capacity to mimic a conformationally-dependent binding site of a protein. The sequences of these mimotopes do not identify a continuous linear native sequence or necessarily occur in a naturally-occurring protein. Mimotopes and methods of production are taught in U.S.P.N. 5,877,155 and U.S.P.N. 5,998,577, which are incorporated by reference in their entireties.

The term "acidic residue" refers to amino acid residues in D- or L-form having sidechains comprising acidic groups. Exemplary acidic residues include D and E.

The term "amide residue" refers to amino acids in D- or L-form having sidechains comprising amide derivatives of acidic groups. Exemplary residues include N and Q.

The term "aromatic residue" refers to amino acid residues in D- or L-form having sidechains comprising aromatic groups. Exemplary aromatic residues include F, Y, and W.

The term "basic residue" refers to amino acid residues in D- or L-form having sidechains comprising basic groups. Exemplary basic residues include H, K, and R.

The term "hydrophilic residue" refers to amino acid residues in D- or L-form

WO 03/031578

PCT/US02/31996

having sidechains comprising polar groups. Exemplary hydrophilic residues include C, S, T, N, and Q.

The term "nonfunctional residue" refers to amino acid residues in D- or L-form having sidechains that lack acidic, basic, or aromatic groups. Exemplary nonfunctional amino acid residues include M, G, A, V, I, L and norleucine (Nle).

The term "neutral hydrophobic residue" refers to amino acid residues in D- or L-form having sidechains that lack basic, acidic, or polar groups. Exemplary neutral hydrophobic amino acid residues include A, V, L, I, P, W, M, and F.

The term "polar hydrophobic residue" refers to amino acid residues in D- or L-form having sidechains comprising polar groups. Exemplary polar hydrophobic amino acid residues include T, G, S, Y, C, Q, and N.

The term "hydrophobic residue" refers to amino acid residues in D- or L-form having sidechains that lack basic or acidic groups. Exemplary hydrophobic amino acid residues include A, V, L, I, P, W, M, F, T, G, S, Y, C, Q, and N.

The term "subject" as used herein, refers to mammals. For example, mammals contemplated by the present invention include humans; primates; pets of all sorts, such as dogs, cats, etc.; domesticated animals, such as, sheep, cattle, goats, pigs, horses and the like; common laboratory animals, such as mice, rats, rabbits, guinea pigs, etc.; as well as captive animals, such as in a zoo or free wild animals. Throughout the specification, the term host is used interchangeably with subject.

As used herein the singular forms "a", "and", and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "an immunization" includes a plurality of such immunizations and reference to "the cell" includes reference to one or more cells and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth. All technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood to one of ordinary skill in the art to which this invention belongs unless clearly indicated otherwise.

As used herein, a dendritic cell, or DC, refers to any member of a diverse population of phenotypically and/or morphologically similar cell types found in lymphoid or non-lymphoid tissues. DCs are a class of "professional" antigen presenting cells, and have a high capacity for sensitizing MHC-restricted T cells. Depending upon their lineage and stage of maturation, DCs may be recognized by function, or by phenotype, particularly by cell surface phenotype. These cells are characterized by their distinctive morphology, phagocytic/endocytotic capacity, high levels of surface MHC-class II expression and ability to present antigen to T cells, particularly to naive T cells (Banchereau, et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 18:767-811, 2000 and USPN 6,274,378, incorporated herein by reference for its description of such cells). For illustrative purposes only, DCs described herein may be characterized by veil-like projections and

WO 03/031578

PCT/US02/31996

expression of the cell surface markers CD1a⁺, CD4⁺, CD86⁺, or HLA-DR⁺. Mature DCs are typically CD11c⁺, while precursors of DCs include those having the phenotype CD11c⁻, IL-3R α ^{low}, and those that are CD11c⁻ IL-3R α ^{high}. Treatment with GM-CSF *in vivo* preferentially expands CD11b^{high}, CD11c^{high} DC, while Flt-3 ligand has been shown to expand CD11c⁺ IL-3R α ^{low} DC, and CD11c⁻ IL-3R α ^{high} DC precursors. The DCs expressing C-type lectins of the present invention may be immature or mature dendritic cells of the lymphoid and/or myeloid lineage. Functionally, dendritic cells maybe identified by any convenient assay for determination of antigen presentation. Such assays may include testing the ability to stimulate antigen-primed or naive T cells by presentation of a test antigen, following by determination of T cell proliferation, release of IL-2, and the like.

A C-type lectin, as used herein, refers to any of the Ca⁺⁺-dependent binding proteins having affinity for and the capacity to bind to carbohydrate moieties, as well as other attributes well known in the art, which is referred to herein as "C-type lectin activity." C-type lectins also include collectins, selectins and the C-type lectin superfamily of the immune system, as reviewed in Weis, W.I., *Immunol. Rev.*, 163:19-34, 1998 and Feizi, T., *Immunol. Rev.*, 173:79-88, 2000).

Identifying genes that are upregulated in DCs in response to external stimuli, such as bacterial antigens and pro-inflammatory cytokines, may shed light on how the immune system responds to varying types of stimuli. Generally speaking, DCs mature in response to bacterial lipopolysaccharide (LPS) and CpG DNA, TNF- α or CD40-Ligand, which represent pathogens, endogenous inflammatory signals or T cell feedback signals, respectively. Following *in vitro* or *in vivo* exposure to bacterial antigens, DCs undergo maturation by one of two signaling pathways: via the ERK kinase pathway, which allows for DC survival, or via the NF- κ B signaling pathway, which is characterized by increased expression of costimulatory and MHC-class II molecules, release of chemokines and migration culminating in high T cell stimulatory capacity and IL-12 release. Bacterial LPS is one of the major molecules recognized by the innate immune system (Verhasselt, H., et al., *J. Immunol.* 158:2919-25, 1997). Ligation of membrane-associated CD14 by LPS complexes and soluble LPS-binding protein lead to pro-inflammatory signals, such as TNF and IL-1 secretion, which increase the turnover of local APCs as well as recruitment of precursor cells at the site of tissue damage. Also, Toll-like receptor-2 (TLR2) has been shown to be a signaling receptor activated by LPS in a response that is dependent on LPS-binding protein and is enhanced by CD14 (Yang, R.B., et al., *Nature* 395:284-88, 1998). Toll-like receptor-4 (TLR4) transduces intracellular signaling in LPS responses leading to NF- κ B activation and TLR4-deficient mice are hyporesponsive to LPS (Brighthill, H.D., et al., *Science* 285:732-36, 1999). In addition, TLR2, but not TLR4, mediates responses elicited by components of gram-positive bacteria, such as

WO 03/031578

PCT/US02/31996

peptidoglycan and lipoteichoic acid (Yoshimura, A., et al., *J. Immunol.* 163:1-5, 1999; Schwander, R., et al., *J. Biol. Chem.* 274:17406-9, 1999). Other Toll-like receptors include, Toll-like receptor-5 (TLR5), which recognizes and is activated by bacterial flagellin (Hayashi, F., et al., *Nature* 408:740-745, 2000), and Toll-like receptor-9 (TLR9), which recognizes and is activated by hypomethylated CpG DNA motifs (Hemmi H., et al., *Nature* 410:1099-1103, 2001)

Different antigenic stimuli have profound effects on DC biology that may influence the immune system as a whole. Generally speaking, IL-12-producing myeloid DCs prime Th1 responses, whereas lymphoid DCs that produce Interferon α and/or β , prime Th2 responses, which are driven by IL-4 produced by activated T cells (Kalinsky, P., et al., *Immunol Today* 20:561-67, 1999). Myeloid DCs produce IL-12 in response to pathogens such as bacteria, viruses and mycoplasmas, but fail to do so in response to other maturation stimuli such as TNF- α , IL-1, cholera toxin or FasL. IL-12 production can be potentially induced by CD40L, which is expressed at high levels on activated memory T cells (Cella, M., *J. Exp. Med.* 184:747-52, 1996). However, systemic stimulation with LPS leads to a paralysis of IL-12 production (Reis e Sousa, C., et al., *Immunity* 11:637-47, 1999). Furthermore, various cytokines present in peripheral tissues during the induction of DC maturation can also modulate IL-12 production. For example, IFN- γ and IL-4 enhance IL-12 production induced by LPS or CD40L, whereas IL-10 has a suppressive effect, and TGF- β has also been shown to inhibit the response to LPS while augmenting the response to CD40L.

Determining the effect of antigenic stimuli, such as LPS, on DC biology may provide insights into antigen binding and uptake, antigen processing and presentation, the activation, differentiation, maturation, homing and transmigration of antigen presenting cells, as well as cell to cell interactions with various cells of the immune system, such as T- and B-cells. Towards this end, murine DC populations were treated with various agents, such as LPS and IFN- α , to determine differential expression of DC-associated genes in response to those agents. Through this type of analysis, four novel murine genes that encode polypeptides having, *inter alia*, C-type lectin domains were discovered, which are referred to as Dendritic Cell C-type Lectins 1 through 4 (DCL 1-4), as well as splice variants thereof. Additionally, a novel human homologue of the DCL 1-4 polypeptides has been discovered and is referred to as DCL 5 (DCL 1 (SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:12) and DCL 4 (SEQ ID NO:22), as well as splice variants svDCL 2 (SEQ ID NO:10), svDCL 3 (SEQ ID NO:16) and svDCL 4 (SEQ ID NO:22), and a human homologue, herein designated DCL 5 (SEQ ID NO:24)).

Bone marrow (BM) cells were isolated from C57BL/10 mice and cultured under conditions essentially as described in Example 1. BM cells were cultured in Flt3-ligand for nine days. The cultures were stimulated for 4 hours with the following

WO 03/031578

PCT/US02/31996

stimuli/conditions: (a) 10 ng/ml recombinant murine GM-CSF, 1000 U/ml human; (b) 500U/ml IFN- α /D (Genzyme, Cambridge, MA); (c) 1 μ g/ml *Escherichia coli* (*E. coli*)(0217:B8)-derived LPS (Difco, Detroit, MI) and (d) no stimulus. After 4 hr exposure to the stimuli, the cells were lysed and the RNA isolated using methods well known in the art. In a separate set of experiments, mice were treated with Flt3-ligand or pegylated GM-CSF prior to harvesting in order to increase the number of DCs.

The preparation of the target RNAs and hybridization to the microarray chips was performed essentially as described in the Affymetrix protocols (Affymetrix Corp., Santa Clara, CA), which are incorporated herein by reference. Briefly, the target sample was prepared using 10 μ g of total RNA, which was first converted to single-stranded cDNA using Superscript IITM reverse transcriptase (Gibco BRL Life Technologies) and a primer encoding the bacteriophage T7 RNA polymerase promoter. The single-stranded cDNA was then converted to double-stranded cDNA. The T7 promoter was used to generate a labeled cRNA target in a reaction containing T7 RNA polymerase and biotinylated nucleotide triphosphates. After purification, the cRNA was chemically fragmented to an average length of 50-200 bases and hybridized overnight at 45°C to Affymetrix Gene ChipsTM. After hybridization, the chips were processed in the Affymetrix fluidics station where they were washed, stained with streptavidin phycoerythrin (SAPE), probed with biotinylated goat anti-streptavidin, and finally, a second round of SAPE.

Polynucleotides encoding DCL Polypeptides

The present invention provides novel polypeptides of the calcium-dependent lectin family that are expressed on murine dendritic cells, herein designated as DCL 1, DCL 2, DCL 3 and DCL 4, as well as splice variants svDCL 2, svDCL 3 and svDCL 4, and a human homologue herein designated DCL 5. Such proteins are substantially free of contaminating endogenous materials and, optionally, without associated native-pattern glycosylation. Derivatives of DCL polypeptides within the scope of the invention also include various structural forms of the primary protein which retain biological activity. Due to the presence of ionizable amino and carboxyl groups, for example, DCL protein may be in the form of acidic or basic salts, or may be in neutral form. Individual amino acid residues may also be modified by oxidation or reduction.

Gene microarray technology provides a tool to study differential gene expression across different mouse dendritic cell subpopulations derived under a number of different stimulation conditions. As described above, the hybridization signals from DC stimulated with LPS were compared with the signals from DC stimulated with IFN- α , as well as those from DC stimulated with GM-CSF. Gene expression upregulated by LPS, but unaltered by IFN- α or GM-CSF, were identified. Analysis of the gene sequences that correspond to the identified signals was performed. One such gene identified was

WO 03/031578

PCT/US02/31996

represented in the Affymetrix data as GenBank accession no. AA389977 and NCBI Unigene entry MM.3443. From the NCBI Unigene site, nine GenBank accessions, including AA389977, were listed as corresponding to this same Unigene entry. The sequences from these nine entries were assembled, and the resulting 'contig' was compared using the BLAST algorithm to public database protein sequences. From this comparison, the contig was revealed to encode a putative protein with homology to molecules characterized as "C-type lectins."

Since the assembled EST contig comparison with these known C-type lectins predicted that the assembly encoded an incomplete (missing the 5' end) sequence, this same EST assembly was used in a BLAST comparison with mouse genomic sequences contained within the Celera™ proprietary database to obtain the genomic counterpart. Searching candidate mouse genomic sequences for the specific coding regions corresponding to a C-type lectin open reading frame revealed that multiple genes were contained within a single large mouse genomic fragment (over 400,000 bp). Further analysis showed that there are nine or more closely related genes in the mouse, including the following four novel sequences: DCL 1 (SEQ ID NO:1 and the corresponding amino acid sequence provided in SEQ ID NO:2), DCL 2 (SEQ ID NO:5 and the corresponding amino acid sequence provided in SEQ ID NO:6), DCL 3 (SEQ ID NO:11 and the corresponding amino acid sequence provided in SEQ ID NO:12) and DCL 4 (SEQ ID NO:17 and the corresponding amino acid sequence provided in SEQ ID NO:18). Given their close chromosomal proximity to each other and their high degree of homology, it is likely that these genes arose through gene duplication events.

To predict the existence of multiple family members, mouse genomic contigs, which were determined to encode the sequence corresponding to DCL1 and related sequences, were examined by comparing the amino acid sequences of two known family members, dectin 2 (Ariizumi, K., et al., *supra*) and DCIR, which is also referred to as dcml1 (Bates, E., et al., *supra*) with all 6 possible translated reading frames of the genomic contigs, using the GCG program TFASTA. Iterative TFASTA analyses and manual examination of the outputs led to the realization that a large number of related genes existed. At this time, it is thought that there are nine different closely related mouse genes, with five corresponding human genes. Using the TFASTA program, sequence maps of the mouse genomic regions and an understanding of the canonical sequences of exon/intron junctions in mammalian DNA, the open reading frames and intron/exon boundaries were predicted for the DCL 1-5 polypeptides. Using this sequence information, unique oligonucleotide pairs specific to each gene's 5' and 3' coding region were designed and synthesized. Specifically, SEQ ID NOs:3 and 4 are the sense and antisense oriented PCR primers, respectively, for DCL 1 (see Figure 1); SEQ ID NOs:7 and 8 are the sense and antisense oriented PCR primers, respectively, for DCL 2 (see

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Figure 2); SEQ ID NOs:13 and 14 are the sense and antisense oriented PCR primers, respectively, for DCL 3 (see Figure 3); SEQ ID NOs:19 and 20 are the sense and antisense oriented PCR primers, respectively, for DCL 4 (see Figure 4); and SEQ ID NOs:25 and 26 are the sense and antisense oriented PCR primers, respectively, for DCL 5 (see Figure 5). These primer pairs were added to PCR mixes containing templates from a large collection of human and mouse tissue-specific cDNAs (Clontech, Palo Alto, CA), and PCRs were performed. Amplimers of the predicted sizes were obtained from these reactions. These fragments were gel purified and submitted for DNA sequence analysis, which demonstrated that the determined cDNA sequences were identical to the predicted sequences for all five novel DCL molecules. In addition, smaller amplimers were sequenced and found to encode alternate splice forms, namely svDCL 2, svDCL 3 and svDCL 4.

Throughout the following discussion, the amino acid designations for defined motifs and/or polypeptide regions and/or signature sequences are inclusive. Those skilled in the art will recognize that naturally occurring variants, such as allelic variant, may vary in the numbering of these regions and therefore may differ from that predicted by computer analysis. Thus, the amino acid designation for the beginning and ending of a region or motif may vary from 1 to 5 amino acids from the ascribed numbering. C-type lectin domains and internal signature patterns were determined using the GCG program MOTIFS (PROSITE Dictionary of Protein Sites and Patterns). N-linked glycosylation sites are defined herein as Asn-X-Ser/Thr, where X is any amino acid except proline. Predictions were made using the Transmembrane Hidden Markov Model (TMHMM) prediction tool at <http://www.cbs.dtu.dk/services/>, and the C-type lectin and aspartyl protease domains were predicted using the GCG program MOTIFS, which uses the PROSITE Dictionary of protein patterns. Other programs used by those skilled in the art of sequence comparison can also be used, such as, for example, the BLASTN program version 2.0.9, available for use via the National Library of Medicine website www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi, or the UW-BLAST 2.0 algorithm. Standard default parameter settings for UW-BLAST 2.0 are described at the following Internet site: sapiens.wustl.edu/blast/blast/#Features. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) were predicted using the established consensus sequence.

The cDNA sequence for DCL 1 is provided in SEQ ID NO:1 and comprises a 738 bp polynucleotide having an initiation codon, 5 exon/intron splice junction sites and a stop codon at nucleotides 736-738, as depicted in Figure 1. DCL 1 has been mapped to murine chromosome 6. The full-length DCL 1 polypeptide sequence (SEQ ID NO:2) comprises a 245 amino acid open reading frame (ORF) having an amino-terminus intracellular region essentially spanning amino acids 1-53, a transmembrane region essentially spanning amino acids 54-76 and an extracellular region essentially spanning

WO 03/031578

PCT/US02/31996

amino acids 77-245. The extracellular region has a number of putative N-linked glycosylation sites found approximately at amino acids 102-104 and 195-197. DCL 1 has a characteristic C-type lectin domain having a representative signature sequence spanning approximately amino acids 211-238 and an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory-
 5 like motif (ITIM) at approximately amino acids 5-10. Soluble DCL 1 comprises the extracellular domain (residues 77-245 of SEQ ID NO:2) or a fragment thereof.

The cDNA sequence for DCL 2 is provided in SEQ ID NO:5 and comprises a 714 bp polynucleotide having an initiation codon, 5 exon/intron splice junction sites and a stop codon at nucleotides 712-714, as depicted in Figure 2. DCL 2 has been mapped to
 10 murine chromosome 6. The full-length DCL 2 polypeptide sequence (SEQ ID NO:6) comprises a 237 amino acid ORF having an amino-terminus intracellular region essentially spanning amino acids 1-44, a transmembrane region essentially spanning amino acids 45-68 and an extracellular region essentially spanning amino acids 69-237.

The extracellular region has a number of putative N-linked glycosylation sites found
 15 approximately at amino acids 86-88, 130-132 and 188-190. DCL 2 also has a predicted aspartyl (or acid) protease domain spanning approximately amino acids 157-168, as well as a characteristic C-type lectin domain having a representative signature sequence spanning approximately amino acids 204-230. Soluble DCL 2 comprises the extracellular domain (residues 69-237 of SEQ ID NO:6) or a fragment thereof.

In addition, DCL 2 has a truncated splice variant isoform referred to as svDCL
 20 2 wherein exon 3 has been deleted (cDNA sequence provided in SEQ ID NO:9 and corresponding amino acid sequence provided in SEQ ID NO:10). The svDCL 2 cDNA sequence comprises a 612 bp fragment having an initiation codon, 4 exon/intron splice junction sites and a stop codon at nucleotides 610-612. The full-length svDCL 2
 25 polypeptide sequence comprises a 203 amino acid ORF having an amino-terminus intracellular region essentially spanning amino acids 1-44, a transmembrane region essentially spanning amino acids 45-67 and an extracellular region essentially spanning amino acids 68-203. The extracellular region has a number of putative N-linked glycosylation sites at amino acids 96-98 and 154-156. svDCL 2 also has a predicted
 30 aspartyl (or acid) protease domain spanning approximately amino acids 123-134, as well as a characteristic C-type lectin domain having a representative signature sequence spanning approximately amino acids 170-196. Soluble svDCL 2 comprises the extracellular domain (residues 68-203 of SEQ ID NO:10) or a fragment thereof.

The cDNA sequence for DCL 3 is provided in SEQ ID NO:11 and comprises a
 35 711 bp polynucleotide having an initiation codon, 5 exon/intron splice junction sites and a stop codon at nucleotides 709-711, as depicted in Figure 3. DCL 3 has been mapped to murine chromosome 6. The full-length DCL 3 polypeptide sequence (SEQ ID NO:12) comprises a 236 amino acid ORF having an amino-terminus intracellular region

WO 03/031578

PCT/US02/31996

essentially spanning amino acids 1-44, a transmembrane region essentially spanning amino acids 45-69 and an extracellular region essentially spanning amino acids 70-236. The extracellular region has a number of putative N-linked glycosylation sites at approximately amino acids 123-125, 130-132, 160-162 and 136-138. DCL 3 has a characteristic C-type lectin domain having a representative signature sequence spanning approximately amino acids 24-229. Soluble DCL 3 comprises the extracellular domain (residues 70-236 of SEQ ID NO:12) or a fragment thereof.

DCL 3 has a truncated splice variant isoform referred to as svDCL 3 wherein exons 4 and 5 are deleted (cDNA sequence provided in SEQ ID NO:15 and corresponding partial amino acid sequence provided in SEQ ID NO:16). The svDCL 3 cDNA sequence comprises a 443 bp fragment having an initiation codon, 3 exon/intron splice junction sites and a number of termination sequences, such as at nucleotides 349-351. One isoform of the predicted svDCL 3 polypeptide sequence comprises a 116 amino acid ORF having an amino-terminus intracellular region essentially spanning amino acids 1-45, a transmembrane region essentially spanning amino acids 46-69 and an extracellular region essentially spanning amino acids 70-116. The extracellular region has an N-linked glycosylation site at amino acids 95-97 and an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif at approximately amino acids 5-10. Soluble svDCL 3 comprises the extracellular domain (residues 70-116 of SEQ ID NO:16) or a fragment thereof.

The cDNA sequence for DCL 4 is provided in SEQ ID NO:17 and comprises a 627 bp polynucleotide having an initiation codon, 5 exon/intron splice junction sites and a stop codon at nucleotides 625-627, as depicted in Figure 4. DCL 4 has been mapped to murine chromosome 6. The full-length DCL 4 polypeptide sequence (SEQ ID NO:18) comprises a 208 amino acid ORF having an amino-terminus intracellular region essentially spanning amino acids 1-20, a transmembrane region essentially spanning amino acids 21-43 and an extracellular region essentially spanning amino acids 44-208. The extracellular region has a putative N-linked glycosylation site at approximately amino acids 102-104. DCL 4 also has a characteristic C-type lectin domain having a representative signature sequence spanning approximately amino acids 176-201. Soluble DCL 4 comprises the extracellular domain (residues 44-208 of SEQ ID NO:18) or a fragment thereof.

DCL 4 has a truncated splice variant isoform referred to as svDCL 4 wherein exon 4 is deleted (cDNA sequence provided in SEQ ID NO:21 and corresponding partial amino acid sequence provided in SEQ ID NO:22). The svDCL 4 cDNA sequence comprises a 472 bp fragment having an initiation codon, 4 exon/intron splice junction sites and a number of termination sequences, such as at nucleotides 283-285. One isoform of the predicted svDCL 4 polypeptide sequence comprises a 94 amino acid ORF having an amino-terminus intracellular region essentially spanning amino acids 1-19, a

WO 03/031578

PCT/US02/31996

transmembrane region essentially spanning amino acids 20-42 and an extracellular region essentially spanning amino acids 42-94. Soluble svDCL 4 comprises the extracellular domain (residues 42-94 of SEQ ID NO:16) or a fragment thereof.

5 A human homologue to the DCL polypeptides was also discovered and is referred to as DCL 5. The cDNA sequence is provided in SEQ ID NO:23 with the determined amino acid sequence provided in SEQ ID NO:24. The DCL 5 polynucleotide sequence comprises a 648 bp polynucleotide having an initiation codon, 5 exon/intron splice junction sites and a stop codon at nucleotides 646-648, as depicted in Figure 5. DCL 5 has been mapped to human chromosome 12. The full-length DCL 5 polypeptide
10 sequence (SEQ ID NO:24) comprises a 215 amino acid ORF having an amino-terminus intracellular region essentially spanning amino acids 1-19, a transmembrane region essentially spanning amino acids 20-41 and an extracellular region essentially spanning amino acids 42-215. The extracellular region has a number of putative N-linked glycosylation sites at approximately amino acids 45-47, 102-104 and 111-113. DCL 5
15 also has a characteristic C-type lectin domain having a representative signature sequence spanning approximately amino acids 182-207. Soluble DCL 5 comprises the extracellular domain (residues 42-215 of SEQ ID NO:24) or a fragment thereof.

DCL 1-5 are characterized as members of the calcium-dependent lectin family and as type II membrane proteins. DCL 1-5 share homology to other C-type lectin family
20 members such as the Dendritic Cell Immunoreceptor (DCIR), a type II glycoprotein with homology to the macrophage lectin and hepatic asialoglycoprotein receptors, which is believed to play a particular role in directing the ontogeny and/or the Ag-handling potential of DCs for initiation of specific immunity (Bates, E., et al., *J. Immunol.* 163:1973-83, 1999); DC-associated C-type lectins (Dectin-1 and 2), which are thought
25 to be involved in T-cell binding and delivering T-cell co-stimulatory signals (Ariizumi, K., et al., *J. Biol.Chem.*, 275:20157-167, 2000 and Ariizumi, K., et al., *J. Biol.Chem.*, 275:11957-963, 2000, respectively); and Langerhans cell-specific C-type lectin (Langerin), which is thought to be an endocytotic receptor that induces formation of Birbeck granules (Valladeau, J., *Immunity* 12:71-81, 2000).

30 Family members of type II proteins having C-type lectin domains with a single carbohydrate recognition domain at the carboxy terminus include cell surface receptors, such as hepatic asialoglycoprotein receptors 1 and 2 and the macrophage lectin, which binds oligosaccharide groups, and are involved in ligand internalization and uptake of antigen. Therefore, DCL polypeptides are likely to bind oligosaccharide groups and are
35 involved in ligand internalization and uptake of antigen. Furthermore, DCL polypeptides are likely to be involved in cell to cell interaction and communication, such as binding and initiation of intracellular signaling pathways.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

The finding that several of the novel polypeptides have the combination of a protease and lectin function is unique. Aspartyl proteases have been associated with activity in intracellular vesicles, as well as associated with cell surface membranes.

DCL1 and DCL 3 also have and at least one immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM). Many receptors that mediate positive signaling have cytoplasmic tails containing sites of tyrosine phosphatase phosphorylation known as immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM). A common mechanistic pathway for positive signaling involves the activation of tyrosine kinases, which phosphorylate sites on the cytoplasmic domains of the receptors and on other signaling molecules. Once the receptors are phosphorylated, binding sites for signal transduction molecules are created which initiate the signaling pathways and activate the cell. The inhibitory pathways involve receptors having immunoreceptor tyrosine based inhibitory motifs (ITIM) which, like the ITAMs, are phosphorylated by tyrosine kinases. Receptors having ITIM motifs are involved in inhibitory signaling, which block signaling by removing tyrosine from activated receptors or signal transduction molecules (Renard *et al.*, *Immun Rev* 155:205-221, 1997). ITIMs have the consensus sequence *I/VxYxxL/V* (SEQ ID NO:28), and are found in the cytoplasmic portions of diverse signal transduction proteins of the immune system, many of which belong to the Ig superfamily or to the family of type II dimeric C-lectins (see Renard *et al.*, 1997, *supra*). Proteins that contain ITIMs include the "killer cell Ig-like receptors," or "KIRs," and some members of the leukocyte Ig-like receptor or "LIR" family of proteins (Renard *et al.*, 1997, *supra*; Cosman *et al.*, *Immunity* 7:273-82, 1997; Borges *et al.*, *J Immunol* 159:5192-96, 1997). Signal transduction by an ITIM is believed to downregulate targeted cellular activities, such as expression of cell surface proteins. Renard *et al.* propose that the regulation of complex cellular functions is fine-tuned by the interplay of ITIM-mediated inhibitory signal transduction and activation of the same functions by a 16-18 amino acid activatory motif, or "ITAM" sequence that is present in other proteins. CD22 and FcγRIIb1 also have ITIMs in their cytoplasmic domain and function to send inhibitory signals that down regulate or inhibit cell function. It has been shown that these receptors associate with SHP-1 phosphatase via binding to the ITIM motifs. Recruitment of the SHP-1 phosphatase by the receptor appears to be required for intracellular signaling pathways that regulate the inhibitory function of the receptors. Significantly, C-type lectins that are type II membrane proteins having a single intracellular ITIM motif have also been reported. For example, genes localized on human chromosome 12p12-p13 in a region designated as the NK gene complex includes products of the NKG2 complex and CD94, which are involved in recognition of MHC class I molecules and in regulation of NK cell activity. Inhibition of cellular functions by NKG2A/B-CD94 heterodimers is linked to the

WO 03/031578

PCT/US02/31996

presence of ITIMs in the NKG2A/B intracellular domain (Lazetic, S.C., et al., *J. Immunol.* 157:4741, 1996; Houchins, J.P., et al., *J. Immunol.* 158:3603, 1997).

Thus, by analogy with other C-type lectin family members having ITIM motifs, the polypeptides presented in SEQ ID NO:2, 12 and 16 having ITIM motifs, deliver an inhibitory signal via the interaction of its ITIM with one or more phosphatases, such as tyrosine phosphatases (including SHP-1 tyrosine phosphatase), when the DCL polypeptides are bound with an appropriate receptor or natural ligand. Also by analogy with immunoregulatory receptors possessing ITIMs, DCL family members have a regulatory influence on humoral and cell-mediated immunity, recognition of MHC class I molecules and in regulation of immune cell activity, as well as modulating inflammatory and allergic responses. Clearly, the immune system activatory and inhibitory signals mediated by opposing kinases and phosphatases are very important for maintaining balance in the immune system. Systems with a predominance of activatory signals will lead to autoimmunity and inflammation. Immune systems with a predominance of inhibitory signals are less able to challenge infected cells or cancer cells. Thus, DCL family members play a role in maintaining balance in the immune system.

Encompassed within the invention are polynucleotides encoding DCL polypeptides. These nucleic acids can be identified in several ways, including isolation of genomic or cDNA molecules from a suitable source. Nucleotide sequences corresponding to the amino acid sequences described herein, to be used as probes or primers for the isolation of nucleic acids or as query sequences for database searches, can be obtained by "back-translation" from the amino acid sequences, or by identification of regions of amino acid identity with polypeptides for which the coding DNA sequence has been identified. The well-known polymerase chain reaction (PCR) procedure can be employed to isolate and amplify a DNA sequence encoding one or more DCL polypeptides or a desired combination of DCL polypeptide fragments. Oligonucleotides that define the desired termini of the combination of DNA fragments are employed as 5' and 3' primers. The oligonucleotides can additionally contain recognition sites for restriction endonucleases, to facilitate insertion of the amplified combination of DNA fragments into an expression vector. PCR techniques are described in Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; and *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Polynucleotide or nucleic acid molecules, as used herein, include DNA and RNA in both single-stranded and double-stranded form, as well as the corresponding complementary sequences. DNA includes, for example, cDNA, genomic DNA, chemically synthesized DNA, DNA amplified by PCR, and combinations thereof. The nucleic acid molecules of the invention include full-length genes or cDNA molecules as

WO 03/031578

PCT/US02/31996

well as a combination of fragments thereof. The nucleic acids of the invention are preferentially derived from human sources, but the invention includes those derived from non-human species, as well.

An "isolated polynucleotide" is a polynucleotide that has been separated from adjacent genetic sequences present in the genome of the organism from which the polynucleotide was isolated, in the case of polynucleotides isolated from naturally occurring sources. In the case of polynucleotides synthesized enzymatically from a template or chemically, such as PCR products, cDNA molecules, or oligonucleotides for example, it is understood that the polynucleotides resulting from such processes are isolated polynucleotides. An isolated polynucleotide molecule may also refer to a polynucleotide molecule in the form of a separate fragment or as a component of a larger polynucleotide construct. In one preferred embodiment, the polynucleotides are substantially free from contaminating endogenous material. The polynucleotide molecule has preferably been derived from DNA or RNA isolated at least once in substantially pure form and in a quantity or concentration enabling identification, manipulation, and recovery of its component nucleotide sequences by standard biochemical methods (such as those outlined in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Such sequences are preferably provided and/or constructed in the form of an open reading frame uninterrupted by internal non-translated sequences, or introns, that are typically present in eukaryotic genes. Sequences of non-translated DNA can be present 5' or 3' from an open reading frame, where the same do not interfere with manipulation or expression of the coding region.

The present invention also includes polynucleotides that hybridize under moderately stringent conditions, and more preferably highly stringent conditions, to polynucleotides encoding DCL polypeptides described herein. The basic parameters affecting the choice of hybridization conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4), and can be readily determined by those having ordinary skill in the art based on, for example, the length and/or base composition of the DNA. One way of achieving moderately stringent conditions involves the use of a prewashing solution containing 5 x SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0), hybridization buffer of about 50% formamide, 6 x SSC, and a hybridization temperature of about 55 degrees C (or other similar hybridization solutions, such as one containing about 50% formamide, with a hybridization temperature of about 42 degrees C), and washing conditions of about 60 degrees C, in 0.5 x SSC, 0.1% SDS. Generally,

WO 03/031578

PCT/US02/31996

highly stringent conditions are defined as hybridization conditions as above, but with washing at approximately 68 degrees C, 0.2 x SSC, 0.1% SDS. SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10 mM NaH.sub.2 PO.sub.4, and 1.25 mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15 mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes after hybridization is complete. It should be understood that the wash temperature and wash salt concentration can be adjusted as necessary to achieve a desired degree of stringency by applying the basic principles that govern hybridization reactions and duplex stability, as known to those skilled in the art and described further below (see, e.g., Sambrook et al., 1989). When hybridizing a nucleic acid to a target nucleic acid of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing nucleic acid. When nucleic acids of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the nucleic acids and identifying the region or regions of optimal sequence complementarity. The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5 to 10 degrees C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m (degrees C) = 2(# of A + T bases) + 4(# of #G + C bases). For hybrids above 18 base pairs in length, T_m (degrees C) = 81.5 + 16.6(log₁₀ [Na⁺]) + 0.41(% G + C) - (600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and [Na⁺] is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ([Na⁺] for 1xSSC = 0.165M). Preferably, each such hybridizing nucleic acid has a length that is at least 15 nucleotides (or more preferably at least 18 nucleotides, or at least 20 nucleotides, or at least 25 nucleotides, or at least 30 nucleotides, or at least 40 nucleotides, or most preferably at least 50 nucleotides), or at least 25% (more preferably at least 50%, or at least 60%, or at least 70%, and most preferably at least 80%) of the length of the nucleic acid of the present invention to which it hybridizes, and has at least 60% sequence identity (more preferably at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, or at least 99%, and most preferably at least 99.5%) with the nucleic acid of the present invention to which it hybridizes, where sequence identity is determined by comparing the sequences of the hybridizing nucleic acids when aligned so as to maximize overlap and identity while minimizing sequence gaps as described in more detail above.

Other derivatives of the DCL protein and homologs thereof within the scope of this invention include covalent or aggregative conjugates of the protein or its fragments with other proteins or polypeptides, such as by synthesis in recombinant culture as N-terminal or C-terminal fusions. For example, the conjugated peptide may be a signal (or leader) polypeptide sequence at the N-terminal region of the protein which co-translationally or post-translationally directs transfer of the protein from its site of

WO 03/031578

PCT/US02/31996

synthesis to its site of function inside or outside of the cell membrane or wall (e.g., the yeast α -factor leader).

Species homologues (also referred to as an orthologue) of DCL polypeptides and nucleic acids encoding them are also provided by the present invention. As used herein, a "species homologue" is a polypeptide or nucleic acid with a different species of origin from that of a given polypeptide or nucleic acid, but with significant sequence similarity to the given polypeptide or nucleic acid, as determined by those of skill in the art. Species homologues can be isolated and identified by making suitable probes or primers from polynucleotides encoding the amino acid sequences provided herein and screening a suitable nucleic acid source from the desired species. The invention also encompasses allelic variants of DCL polypeptides and nucleic acids encoding them; that is, naturally-occurring alternative forms of such polypeptides and nucleic acids in which differences in amino acid or nucleotide sequence are attributable to genetic polymorphism (allelic variation among individuals within a population).

Protein fusions can comprise peptides added to facilitate purification or identification of DCL proteins and homologs (e.g., poly-His). The amino acid sequence of the inventive proteins can also be linked to an identification peptide such as that described by Hopp et al., *BioTechnology* 6:1204 (1988). Such a highly antigenic peptide provides an epitope reversibly bound by a specific monoclonal antibody, enabling rapid assay and facile purification of expressed recombinant protein. The sequence of Hopp et al. is also specifically cleaved by bovine mucosal enterokinase, allowing removal of the peptide from the purified protein. Fusion proteins capped with such peptides may also be resistant to intracellular degradation in *E. coli*. Fusion proteins further comprise the amino acid sequence of a DCL protein linked to an immunoglobulin Fc region. An exemplary Fc region is a human IgG1 and operative fragments thereof, as well as Fc muteins, which are all well known in the art. Depending on the portion of the Fc region used, a fusion protein may be expressed as a dimer, through formation of interchain disulfide bonds. If the fusion proteins are made with both heavy and light chains of an antibody, it is possible to form a protein oligomer with as many as four DCL regions.

Further, fusion polypeptides can comprise peptides added to facilitate purification and identification. Such peptides include, for example, poly-His or the antigenic identification peptides described in U.S. Patent No. 5,011,912 and in Hopp et al., *BioTechnology* 6:1204, 1988. One such peptide is the FLAG[®] peptide, which is highly antigenic and provides an epitope reversibly bound by a specific monoclonal antibody, enabling rapid assay and facile purification of expressed recombinant polypeptide. A murine hybridoma designated 4E11 produces a monoclonal antibody that binds the FLAG[®] peptide in the presence of certain divalent metal cations, as described in U.S.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Patent 5,011,912. The 4E11 hybridoma cell line has been deposited with the American Type Culture Collection under accession no. HB 9259. Monoclonal antibodies that bind the FLAG[®] peptide are available from Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut.

5 In another embodiment, DCL and homologs thereof further comprise an oligomerizing zipper domain. Zipper domains are well known in the art and need not be described in detail. Examples of leucine zipper domains are those found in the yeast transcription factor GCN4 and a heat-stable DNA-binding protein found in rat liver (C/EBP; Landschulz et al., *Science* 243:1681, 1989), the nuclear transforming proteins, 10 *fos* and *jun*, which preferentially form a heterodimer (O'Shea et al., *Science* 245:646, 1989; Turner and Tjian, *Science* 243:1689, 1989), and the gene product of the murine proto-oncogene, *c-myc* (Landschulz et al., *Science* 240:1759, 1988). The fusogenic proteins of several different viruses, including paramyxovirus, coronavirus, measles virus and many retroviruses, also possess leucine zipper domains (Buckland and Wild, *Nature* 15 338:547, 1989; Britton, *Nature* 353:394, 1991; Delwart and Mosialos, *AIDS Research and Human Retroviruses* 6:703, 1990).

The present invention also provides for soluble forms of DCL polypeptides comprising certain fragments or domains of these polypeptides, as previously described above. Soluble DCL polypeptides may be secreted from cells in which they are expressed 20 and preferably retain DCL polypeptide activity. Soluble DCL polypeptides further include oligomers or fusion polypeptides comprising at least one DCL polypeptide, and fragments of any of these polypeptides that have DCL polypeptide activity. A secreted soluble polypeptide can be identified (and distinguished from its non-soluble membrane-bound counterparts) by separating intact cells which express the desired polypeptide from 25 the culture medium, e.g., by centrifugation, and assaying the medium (supernatant) for the presence of the desired polypeptide. The presence of the desired polypeptide in the medium indicates that the polypeptide was secreted from the cells and thus is a soluble form of the polypeptide. The use of soluble forms of DCL polypeptides is advantageous for many applications. Purification of the polypeptides from recombinant host cells is 30 facilitated, since the soluble polypeptides are secreted from the cells. Moreover, soluble polypeptides are generally more suitable than membrane-bound forms for parenteral administration and for many enzymatic procedures.

Derivatives of DCL polypeptides may also be used as immunogens, reagents in *in vitro* assays, or as binding agents for affinity purification procedures. Such derivatives 35 may also be obtained by cross-linking agents, such as M-maleimidobenzoyl succinimide ester and N-hydroxysuccinimide, at cysteine and lysine residues. The inventive proteins may also be covalently bound through reactive side groups to various insoluble substrates, such as cyanogen bromide-activated, bisoxirane-activated,

WO 03/031578

PCT/US02/31996

carbonyldiimidazole-activated or tosyl-activated agarose structures, or by adsorbing to polyolefin surfaces (with or without glutaraldehyde cross-linking). Once bound to a substrate, proteins may be used to selectively bind (for purposes of assay or purification) antibodies raised against the DCL or other proteins which are similar in structure and/or

5 function to the DCL proteins.

The present invention also includes DCL polypeptides with or without associated native-pattern glycosylation. Proteins expressed in yeast or mammalian expression systems, e.g., COS-7 cells, may be similar or slightly different in molecular weight and glycosylation pattern than the native molecules, depending upon the expression system.

10 Expression of DNAs encoding the inventive proteins in bacteria such as *E. coli* provides non-glycosylated molecules. Functional mutant analogs of DCL protein or homologs thereof having inactivated N-glycosylation sites can be produced by oligonucleotide synthesis and ligation or by site-specific mutagenesis techniques. These analog proteins can be produced in a homogeneous, reduced-carbohydrate form in good yield using yeast

15 expression systems. N-glycosylation sites in eukaryotic proteins are characterized by the amino acid triplet Asn-A₁-Z, where A₁ is any amino acid except Pro, and Z is Ser or Thr. In this sequence, asparagine provides a side chain amino group for covalent attachment of carbohydrate. Such a site can be eliminated by substituting another amino acid for Asn or for residue Z, deleting Asn or Z, or inserting a non-Z amino acid between A₁ and Z,

20 or an amino acid other than Asn between Asn and A₁.

DCL protein derivatives may also be obtained by mutations of the native DCL polypeptide or its subunits. A DCL mutated protein, as referred to herein, is a polypeptide homologous to a DCL protein but which has an amino acid sequence different from the native DCL because of at least one or a plurality of deletions, insertions

25 or substitutions. The effect of any mutation made in a DNA encoding a DCL peptide may be easily determined by analyzing the ability of the mutated DCL peptide to bind proteins that specifically bind DCL (for example, antibodies or natural ligands). Moreover, activity of DCL analogs, muteins or derivatives can be determined by any of the assays methods described herein. Similar mutations may be made in homologs of

30 DCL, and tested in a similar manner.

Bioequivalent analogs of the inventive proteins may be constructed by, for example, making various substitutions of residues or sequences or deleting terminal or internal residues or sequences not needed for biological activity. For example, cysteine residues can be deleted or replaced with other amino acids to prevent formation of

35 incorrect intramolecular disulfide bridges upon renaturation. Other approaches to mutagenesis involve modification of adjacent dibasic amino acid residues to enhance expression in yeast systems in which KEX2 protease activity is present.

For example, a "conservative amino acid substitution" may involve a substitution

WO 03/031578

PCT/US02/31996

of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position. Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis" (see, for example, MacLennan et al., 1998, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67; Sasaki et al., 1998, *Adv. Biophys.* 35:1-24, which discuss alanine scanning mutagenesis).

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the peptide sequence, or to increase or decrease the affinity of the peptide or vehicle-peptide molecules (see preceding formulae) described herein. Exemplary amino acid substitutions are set forth in Table 1.

Table 1—Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Lys (K)	Arg, 1,4 Diamino-butyrlic Acid, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

In certain embodiments, conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues which are typically incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems.

As noted above, naturally occurring residues may be divided into classes based on common sidechain properties that may be useful for modifications of sequence. For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the peptide that are homologous with non-human orthologs, or into the non-homologous regions of the molecule. In addition, one may also make modifications using P or G for the purpose of influencing chain orientation.

In making such modifications, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of their hydrophobicity and charge characteristics, these are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

WO 03/031578

PCT/US02/31996

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is understood in the art. (Kyte, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 157: 105-131 (1982)). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity. The greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, i.e., with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in the foregoing sequences using well known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be changed without destroying activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of a peptide to similar peptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of a peptide that are not conserved relative to such similar peptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of the peptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the peptide structure.

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies

WO 03/031578

PCT/US02/31996

identifying residues in similar peptides that are important for activity or structure. In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in a peptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar peptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of the peptides.

One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of that information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of a peptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each desired amino acid residue. The variants can then be screened using activity assays known to those skilled in the art. Such data could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See, Moult J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4): 422-427 (1996); Chou *et al.*, *Biochemistry*, 13(2): 222-245 (1974); Chou *et al.*, *Biochemistry*, 113(2): 211-222 (1974); Chou *et al.*, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 and Chou *et al.*, *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins which have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40% often have similar structural topologies. The recent growth of the protein structural data base (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within a polypeptide's or protein's structure. See Holm, *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 27(1): 244-247 (1999). It has been suggested (Brenner *et al.*, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3): 369-376 (1997)) that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will gain dramatically in accuracy.

Additional methods of predicting secondary structure include "threading" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3): 377-87 (1997); Sippl, *et al.*, *Structure*, 4(1): 15-9

WO 03/031578

PCT/US02/31996

(1996)), "profile analysis" (Bowie, *et al.*, *Science*, 253: 164-170 (1991); Gribskov, *et al.*, *Meth. Enzym.*, 183: 146-159 (1990); Gribskov, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13): 4355-8 (1987)), and "evolutionary linkage" (See Holm, *supra*, and Brenner, *supra*).

Mutations in nucleotide sequences constructed for expression of analog DCL polypeptides must, of course, preserve the reading frame phase of the coding sequences and preferably will not create complementary regions that could hybridize to produce secondary mRNA structures such as loops or hairpins which would adversely affect translation of the receptor mRNA. Although a mutation site may be predetermined, it is not necessary that the nature of the mutation *per se* be predetermined. For example, in order to select for optimum characteristics of mutants at a given site, random mutagenesis may be conducted at the target codon and the expressed mutated viral proteins screened for the desired activity.

Not all mutations in the nucleotide sequence that encodes a DCL protein or homolog thereof will be expressed in the final product, for example, nucleotide substitutions may be made to enhance expression, primarily to avoid secondary structure loops in the transcribed mRNA (see EPA 75,444A, incorporated herein by reference), or to provide codons that are more readily translated by the selected host, e.g., the well-known *E. coli* preference codons for *E. coli* expression.

Mutations can be introduced at particular loci by synthesizing oligonucleotides containing a mutant sequence, flanked by restriction sites enabling ligation to fragments of the native sequence. Following ligation, the resulting reconstructed sequence encodes an analog having the desired amino acid insertion, substitution, or deletion.

Alternatively, oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis procedures can be employed to provide an altered gene having particular codons altered according to the substitution, deletion, or insertion required. Exemplary methods of making the alterations set forth above are disclosed by Walder *et al.* (*Gene* 42:133, 1986); Bauer *et al.* (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, January 1985, 12-19); Smith *et al.* (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); and U.S. Patent Nos. 4,518,584 and 4,737,462 disclose suitable techniques, and are incorporated by reference herein.

The DCL polypeptides and analogs described herein will have numerous uses, including the preparation of pharmaceutical compositions. The inventive proteins will also be useful in preparing kits that are used to detect DCL polypeptides, for example, in tissue specimens. Such kits will also find uses in detecting the interaction of DCL polypeptides with their natural ligands, as is necessary when screening for antagonists or mimetics of this interaction (for example, peptides or small molecules that inhibit or mimic, respectively, the interaction). A variety of assay formats are useful in such kits,

WO 03/031578

PCT/US02/31996

including (but not limited to) ELISA, dot blot, solid phase binding assays (such as those using a biosensor), rapid format assays and bioassays.

Expression of Recombinant DCL polypeptides

5 The polypeptides of the present invention are preferably produced by recombinant DNA methods by inserting a DNA sequence encoding DCL polypeptides or a homolog thereof into a recombinant expression vector and expressing the DNA sequence in a recombinant microbial expression system under conditions promoting expression. DNA sequences encoding the proteins provided by this invention can be assembled from cDNA
10 fragments and short oligonucleotide linkers, or from a series of oligonucleotides, to provide a synthetic gene which is capable of being inserted in a recombinant expression vector and expressed in a recombinant transcriptional unit.

Recombinant expression vectors include synthetic or cDNA-derived DNA fragments encoding DCL polypeptides, homologs, or bioequivalent analogs, operably
15 linked to suitable transcriptional or translational regulatory elements derived from mammalian, microbial, viral or insect genes. Such regulatory elements include a transcriptional promoter, an optional operator sequence to control transcription, a sequence encoding suitable mRNA ribosomal binding sites, and sequences which control the termination of transcription and translation, as described in detail below. The ability
20 to replicate in a host, usually conferred by an origin of replication, and a selection gene to facilitate recognition of transformants may additionally be incorporated.

DNA regions are operably linked when they are functionally related to each other. For example, DNA for a signal peptide (secretory leader) is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a precursor which participates in the secretion of the
25 polypeptide; a promoter is operably linked to a coding sequence if it controls the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to permit translation. Generally, operably linked means contiguous and, in the case of secretory leaders, contiguous and in reading frame. DNA sequences encoding DCL polypeptides or homologs which are to be expressed in a
30 microorganism will preferably contain no introns that could prematurely terminate transcription of DNA into mRNA.

Useful expression vectors for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from commercially available plasmids comprising genetic elements of the well-known cloning vector pBR322 (ATCC 37017). Such
35 commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). These pBR322 "backbone" sections are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed. *E. coli* is typically transformed using derivatives of pBR322,

WO 03/031578

PCT/US02/31996

a plasmid derived from an *E. coli* species (Bolivar et al., *Gene* 2:95, 1977). pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides simple means for identifying transformed cells.

Promoters commonly used in recombinant microbial expression vectors include the β -lactamase (penicillinase) and lactose promoter system (Chang et al., *Nature* 275:615, 1978; and Goeddel et al., *Nature* 281:544, 1979), the tryptophan (trp) promoter system (Goeddel et al., *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980; and EPA 36,776) and tac promoter (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). A particularly useful bacterial expression system employs the phage λ P_L promoter and cI857ts thermolabile repressor. Plasmid vectors available from the American Type Culture Collection which incorporate derivatives of the λ P_L promoter include plasmid pHUB2, resident in *E. coli* strain JMB9 (ATCC 37092) and pPLc28, resident in *E. coli* RR1 (ATCC 53082).

Suitable promoter sequences in yeast vectors include the promoters for metallothionein, 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255:2073, 1980) or other glycolytic enzymes (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968; and Holland et al., *Biochem.* 17:4900, 1978), such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in R. Hitzeman et al., EPA 73,657.

Preferred yeast vectors can be assembled using DNA sequences from pBR322 for selection and replication in *E. coli* (Amp^r gene and origin of replication) and yeast DNA sequences including a glucose-repressible ADH2 promoter and α -factor secretion leader. The ADH2 promoter has been described by Russell et al. (*J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982) and Beier et al. (*Nature* 300:724, 1982). The yeast α -factor leader, which directs secretion of heterologous proteins, can be inserted between the promoter and the structural gene to be expressed. See, e.g., Kurjan et al., *Cell* 30:933, 1982; and Bitter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330, 1984. The leader sequence may be modified to contain, near its 3' end, one or more useful restriction sites to facilitate fusion of the leader sequence to foreign genes.

The transcriptional and translational control sequences in expression vectors to be used in transforming vertebrate cells may be provided by viral sources. For example, commonly used promoters and enhancers are derived from Polyoma, Adenovirus 2, Simian Virus 40 (SV40), and human cytomegalovirus. DNA sequences derived from the SV40 viral genome, for example, SV40 origin, early and late promoter, enhancer, splice, and polyadenylation sites may be used to provide the other genetic elements required for expression of a heterologous DNA sequence. The early and late promoters are

WO 03/031578

PCT/US02/31996

particularly useful because both are obtained easily from the virus as a fragment which also contains the SV40 viral origin of replication (Fiers et al., *Nature* 273:113, 1978).

Smaller or larger SV40 fragments may also be used, provided the approximately 250 bp sequence extending from the *Hind* III site toward the *Bgl* II site located in the viral origin of replication is included. Further, viral genomic promoter, control and/or signal sequences may be utilized, provided such control sequences are compatible with the host cell chosen. Exemplary vectors can be constructed as disclosed by Okayama and Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983).

A useful system for stable high level expression of mammalian receptor cDNAs in C127 murine mammary epithelial cells can be constructed substantially as described by Cosman et al. (*Mol. Immunol.* 23:935, 1986). A preferred eukaryotic vector for expression of DCL polynucleotides is referred to as pDC406 (McMahan et al., *EMBO J.* 10:2821, 1991), and includes regulatory sequences derived from SV40, human immunodeficiency virus (HIV), and Epstein-Barr virus (EBV). Other preferred vectors include pDC409 and pDC410, which are derived from pDC406. pDC410 was derived from pDC406 by substituting the EBV origin of replication with sequences encoding the SV40 large T antigen. pDC409 differs from pDC406 in that a *Bgl* II restriction site outside of the multiple cloning site has been deleted, making the *Bgl* II site within the multiple cloning site unique.

A useful cell line that allows for episomal replication of expression vectors, such as pDC406 and pDC409, which contain the EBV origin of replication, is CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478). The CV-1/EBNA cell line was derived by transfection of the CV-1 cell line with a gene encoding Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) and constitutively express EBNA-1 driven from human CMV immediate-early enhancer/promoter.

Host Cells

Transformed host cells are cells which have been transformed or transfected with expression vectors constructed using recombinant DNA techniques and which contain sequences encoding the proteins of the present invention. Transformed host cells may express the desired protein (one or more of the DCL polypeptides or homologs thereof), but host cells transformed for purposes of cloning or amplifying the inventive DNA do not need to express the protein. Expressed proteins will preferably be secreted into the culture supernatant, depending on the DNA selected, but may be deposited in the cell membrane.

Suitable host cells for expression of viral proteins include prokaryotes, eukaryotes, bacterial, yeast, insect, mammalian (human, monkey, ape, rodent, etc.) or other higher order eukaryotic cells under the control of appropriate promoters.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Prokaryotes include gram negative or gram positive organisms, for example *E. coli* or *Bacillus* spp. Higher eukaryotic cells include established cell lines of mammalian origin as described below. Cell-free translation systems could also be employed to produce viral proteins using RNAs derived from the DNA constructs disclosed herein.

- 5 Appropriate cloning and expression vectors for use with bacterial, fungal, yeast, and mammalian cellular hosts are described by Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985), the relevant disclosure of which is hereby incorporated by reference.

- 10 Prokaryotic expression hosts may be used for expression of DCL or homologs that do not require extensive proteolytic and disulfide processing. Prokaryotic expression vectors generally comprise one or more phenotypic selectable markers, for example a gene encoding proteins conferring antibiotic resistance or supplying an autotrophic requirement, and an origin of replication recognized by the host to ensure amplification within the host. Suitable prokaryotic hosts for transformation include *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, and various species within the genera *Pseudomonas*,
15 *Streptomyces*, and *Staphylococcus*, although others may also be employed as a matter of choice.

- Recombinant DCL polypeptides may also be expressed in yeast hosts, preferably from the *Saccharomyces* species, such as *S. cerevisiae*. Yeast of other genera, such as
20 *Pichia* or *Kluyveromyces* may also be employed. Yeast vectors will generally contain an origin of replication from the 2 μ yeast plasmid or an autonomously replicating sequence (ARS), promoter, DNA encoding the viral protein, sequences for polyadenylation and transcription termination and a selection gene. Preferably, yeast vectors will include an origin of replication and selectable marker permitting transformation of both yeast and
25 *E. coli*, e.g., the ampicillin resistance gene of *E. coli* and *S. cerevisiae* *trp1* gene, which provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, and a promoter derived from a highly expressed yeast gene to induce transcription of a structural sequence downstream. The presence of the *trp1* lesion in the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting
30 transformation by growth in the absence of tryptophan.

- Suitable yeast transformation protocols are known to those of skill in the art; an exemplary technique is described by Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978, selecting for Trp⁺ transformants in a selective medium consisting of 0.67% yeast nitrogen base, 0.5% casamino acids, 2% glucose, 10 μ g/ml adenine and 20 μ g/ml uracil.
35 Host strains transformed by vectors comprising the ADH2 promoter may be grown for expression in a rich medium consisting of 1% yeast extract, 2% peptone, and 1% glucose supplemented with 80 μ g/ml adenine and 80 μ g/ml uracil. Derepression of the ADH2

WO 03/031578

PCT/US02/31996

promoter occurs upon exhaustion of medium glucose. Crude yeast supernatants are harvested by filtration and held at 4°C prior to further purification.

The inventive polypeptide can also be produced by operably linking the isolated nucleic acid of the invention to suitable control sequences in one or more insect expression vectors, and employing an insect expression system. Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available in kit form from, e.g., Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A. (the MaxBac® kit), and such methods are well known in the art, as described in Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), and Luckow and Summers, *BioTechnology* 6:47 (1988). Cell-free translation systems could also be employed to produce polypeptides using RNAs derived from nucleic acid constructs disclosed herein.

Various mammalian or insect cell culture systems can be employed to express recombinant protein. Baculovirus systems for production of heterologous proteins in insect cells are reviewed by Luckow and Summers, *BioTechnology* 6:47 (1988). Examples of suitable mammalian host cell lines include the COS-7 line of monkey kidney cells (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., *Cell* 23:175, 1981), L cells, C127 cells, 3T3 cells (ATCC CCL 163), Chinese hamster ovary (CHO) cells or their derivatives such as Veggie CHO and related cell lines which grow in serum-free media (Rasmussen et al., 1998, *Cytotechnology* 28: 31), HeLa cells, BHK (ATCC CRL 10) cell lines, the CV1/EBNA cell line derived from the African green monkey kidney cell line CV1 (ATCC CCL 70) (McMahan et al., 1991, *EMBO J.* 10: 2821, 1991), human embryonic kidney cells such as 293, 293 EBNA or MSR 293, human epidermal A431 cells, human Colo205 cells, other transformed primate cell lines, normal diploid cells, cell strains derived from in vitro culture of primary tissue, primary explants, HL-60, U937, HaK or Jurkat cells. Optionally, mammalian cell lines such as HepG2/3B, KB, NIH 3T3 or S49, for example, can be used for expression of the polypeptide when it is desirable to use the polypeptide in various signal transduction or reporter assays. Mammalian expression vectors may comprise nontranscribed elements such as an origin of replication, a suitable promoter and enhancer linked to the gene to be expressed, and other 5' or 3' flanking nontranscribed sequences, and 5' or 3' nontranslated sequences, such as necessary ribosome binding sites, a polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, and transcriptional termination sequences.

Purification of DCL Polypeptides

The polypeptides may also be isolated and purified in accordance with conventional methods of recombinant synthesis. For example, a lysate may be prepared of the expression host and the lysate purified using HPLC, exclusion chromatography, gel electrophoresis, affinity chromatography, or other purification technique. For the

WO 03/031578

PCT/US02/31996

most part, the compositions which are used will comprise at least 20% by weight of the desired product, more usually at least about 75% by weight, preferably at least about 95% by weight, and for therapeutic purposes, usually at least about 99.5% by weight, in relation to contaminants related to the method of preparation of the product and its purification. Usually, the percentages will be based upon total protein.

Purified DCL polypeptides, variants, homologs, or analogs are prepared by culturing suitable host/vector systems to express the recombinant translation products of the DNAs of the present invention, which are then purified from culture media or cell extracts. For example, supernatants from systems which secrete recombinant protein into culture media can be first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit.

Following the concentration step, the concentrate can be applied to a suitable purification matrix. For example, a suitable affinity matrix can comprise a counter structure protein or antibody molecule bound to a suitable support. Alternatively, an anion exchange resin can be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) groups. The matrices can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose or other types commonly employed in protein purification. Alternatively, a cation exchange step can be employed. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. Sulfopropyl groups are preferred. Gel filtration chromatography also provides a means of purifying the inventive proteins.

Affinity chromatography is a particularly preferred method of purifying DCL polypeptides and variants, homologs, or analogs thereof. For example, a DCL polypeptide expressed as a fusion protein comprising an immunoglobulin Fc region can be purified using Protein A or Protein G affinity chromatography. Moreover, a DCL protein comprising an oligomerizing zipper domain may be purified on a resin comprising an antibody specific to the oligomerizing zipper domain. Monoclonal antibodies against the DCL protein may also be useful in affinity chromatography purification, by utilizing methods that are well-known in the art. A ligand, such as a carbohydrate or glycoprotein moiety may also be used to prepare an affinity matrix for affinity purification of DCL.

Finally, one or more reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify a DCL composition. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations, can also be employed to provide a homogeneous recombinant protein.

Recombinant protein produced in bacterial culture is usually isolated by initial extraction from cell pellets, followed by one or more concentration, salting-out, aqueous

WO 03/031578

PCT/US02/31996

ion exchange or size exclusion chromatography steps. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps. Microbial cells employed in expression of recombinant viral protein can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

5 Fermentation of yeast that express the inventive protein as a secreted protein greatly simplifies purification. Secreted recombinant protein resulting from a large-scale fermentation can be purified by methods analogous to those disclosed by Urdal et al. (*J. Chromatog.* 296:171, 1984). This reference describes two sequential, reversed-phase
10 HPLC steps for purification of recombinant human GM-CSF on a preparative HPLC column.

Protein synthesized in recombinant culture is characterized by the presence of cell components, including proteins, in amounts and of a character which depend upon the purification steps taken to recover the inventive protein from the culture. These
15 components ordinarily will be of yeast, prokaryotic or non-human higher eukaryotic origin and preferably are present in innocuous contaminant quantities, on the order of less than about 1 percent by weight. Further, recombinant cell culture enables the production of the inventive proteins free of other proteins which may be normally associated with the proteins as they are found in nature in the species of origin.

20 Screening Assays and Methods

The present invention provides methods for screening for a molecule (often referred to as a "test compound") that antagonizes or agonizes the activity of DCL polypeptides and DCL-associated substrates and/or binding partners. DCL polypeptide
25 activities include, but are not limited to, antigen binding, internalization, processing and presentation; APC activation, differentiation, maturation, homing and transmigration; cell to cell interactions including binding and modulation of intracellular signaling pathways in either an excitatory or inhibitory manner, as well as extracellular communication through pathways leading to secretion of factors that act in an autocrine, paracrine and/or
30 endocrine fashion. Examples of cells that may bind to APCs expressing DCL polypeptides include cells of the immune system, including DCs, T-cells, B-cells, NK cells, as well as precursors thereof.

Binding partner, as used herein, may comprise a natural ligand, which may be an/a oligosaccharide, polysaccharide, carbohydrate, glycoprotein, phospholipid,
35 glycolipid, glycosphingolipid and the like; preferably, the natural ligand is selected from the group consisting of bacterial, viral, fungal or protozoan polypeptides, as well as cell membrane-associated polypeptides. A binding partner may also comprise an antibody,

WO 03/031578

PCT/US02/31996

either agonistic or antagonistic to DCL activity. Also, a binding partner may comprise a fragment, derivative, fusion protein or peptidomimetic of a DCL natural ligand.

In the most basic sense, illustrative assays comprise a method for identifying test compounds that modulate DCL polypeptide activity, which may be in the form of agonist or antagonists, comprising mixing a test compound with one or more DCL polypeptides and determining whether the test compound alters the DCL polypeptide activity of said polypeptide. Other embodiments comprise a method for identifying compounds that inhibit the binding activity of DCL polypeptides comprising mixing a test compound with one or more DCL polypeptides and a binding partner of said polypeptide and determining whether the test compound inhibits the binding activity of said polypeptide.

Additional embodiments include methods of screening for active compounds with particularized biological readouts, such as for example, modulating C-type lectin activity.

As used throughout this application, modulate means to either increase or decrease activity. Further embodiments may use modulation of aspartyl protease activity as a biological readout. And, in further embodiments biological readouts may include modulating ITIM activity (as well as associated pathways, such as interactions with ITAM domains and one or more phosphatases, such as tyrosine phosphatases including SHP-1 tyrosine phosphatase).

The methods of the invention may be used to identify antagonists and agonists of DCL signaling activity from cells, cell-free preparations, chemical libraries, cDNA libraries, recombinant antibody libraries (or libraries comprising subunits of antibodies) and natural product mixtures. The antagonists and agonists may be natural or modified substrates, ligands, enzymes, receptors, etc. of the polypeptides of the instant invention, or may be structural or functional mimetics of one of the DCL polypeptides and fragments thereof. Potential antagonists of the instant invention may include small molecules, peptides and antibodies that bind to and occupy a binding site of the inventive polypeptides or a binding partner thereof, causing them to be unavailable to bind to their natural binding partners and therefore preventing normal biological activity. Potential agonists include small molecules, peptides and antibodies which bind to the instant polypeptides or binding partners thereof, and elicit the same or enhanced biologic effects as those caused by the binding of the polypeptides of the instant invention.

In one aspect, the inventive methods utilize homogeneous assay formats such as fluorescence resonance energy transfer, fluorescence polarization, time-resolved fluorescence resonance energy transfer, scintillation proximity assays, reporter gene assays, fluorescence quenched enzyme substrate, chromogenic enzyme substrate and electrochemiluminescence. In another aspect, the inventive methods utilize heterogeneous assay formats such as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) or radioimmunoassays. In yet another aspect of the invention are cell-based assays, for

WO 03/031578

PCT/US02/31996

example those utilizing reporter genes, as well as functional assays that analyze the effect of an antagonist or agonist on biological function(s).

Small molecule agonists and antagonists are usually less than 10K molecular weight and may possess a number of physicochemical and pharmacological properties which enhance cell penetration, resist degradation and prolong their physiological half-lives (Gibbs, J., *Pharmaceutical Research in Molecular Oncology*, Cell, Vol. 79 (1994)). Antibodies, which include intact molecules as well as fragments such as Fab and F(ab')₂ fragments, as well as recombinant molecules derived therefrom (including antibodies expressed on phage, intrabodies, single chain antibodies such as scFv and other molecules derived from immunoglobulins that are known in the art), may be used to bind to and inhibit the polypeptides of the instant invention by blocking the propagation of a signaling cascade. It is preferable that the antibodies are humanized, and more preferable that the antibodies are human. The antibodies of the present invention may be prepared by any of a variety of well-known methods.

Additional examples of candidate molecules, also referred to herein as "test compounds," to be tested for DCL agonist or antagonist activity include, but are not limited to, carbohydrates, small molecules (usually organic molecules or peptides), proteins, and nucleic acid molecules (including oligonucleotide fragments typically consisting of from 8 to 30 nucleic acid residues). Peptides to be tested typically consist of from 5 to 25 amino acid residues. Also, candidate nucleic acid molecules can be antisense nucleic acid sequences, and/or can possess ribozyme activity. Candidate molecules that can be assayed for DCL agonist or antagonist activity may also include, but are not limited to, small organic molecules, such as those that are commercially available - often as part of large combinatorial chemistry compound 'libraries' - from companies such as Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Arqule (Woburn, MA), Enzymed (Iowa City, IA), Maybridge Chemical Co.(Trevillet, Cornwall, UK), MDS Panlabs (Bothell, WA), Pharmacopeia (Princeton, NJ), and Trega (San Diego, CA). Compounds including natural products, inorganic chemicals, and biologically active materials such as proteins and toxins can also be assayed using these methods for the ability to modulate DCL-associated cellular events.

Specific screening methods are known in the art and along with integrated robotic systems and collections of chemical compounds/natural products are extensively incorporated in high throughput screening so that large numbers of test compounds can be tested for antagonist or agonist activity within a short amount of time. These methods include homogeneous assay formats such as fluorescence resonance energy transfer, fluorescence polarization, time-resolved fluorescence resonance energy transfer, scintillation proximity assays, reporter gene assays, fluorescence quenched enzyme substrate, chromogenic enzyme substrate and electrochemiluminescence, as well as more

WO 03/031578

PCT/US02/31996

traditional heterogeneous assay formats such as enzyme-linked immunosorbant assays (ELISA) or radioimmunoassays. Homogeneous assays are preferred. Also comprehended herein are cell-based assays, for example those utilizing reporter genes, as well as functional assays that analyze the effect of an antagonist or agonist on biological function(s) (for example, phosphorylation of substrates, secretion of cytokines or growth factors, proliferation and/or differentiation of cells or tissues, and the like).

Moreover, combinations of screening assays can be used to find molecules that regulate the biological activity of DCL. Molecules that regulate the biological activity of a polypeptide may be useful as agonists or antagonists of the peptide. In using combinations of various assays, it is usually first determined whether a candidate molecule binds to a polypeptide by using an assay that is amenable to high throughput screening. Binding candidate molecules identified in this manner are then added to a biological assay to determine biological effects. Molecules that bind and that have an agonistic or antagonistic effect on biologic activity will be useful in treating or preventing disease or conditions with which the polypeptide(s) are implicated.

Generally, an antagonist will inhibit the activity by at least 30%; more preferably, antagonists will inhibit activity by at least 50%, most preferably by at least 90%. Similarly, an agonist will enhance the activity by at least 20%; more preferably, agonists will enhance activity by at least 30%, most preferably by at least 50%. Those of skill in the art will recognize that agonists and/or antagonists with different levels of agonism or antagonism respectively may be useful for different applications (i.e., for treatment of different disease states).

Homogeneous assays are mix-and-read style assays that are very amenable to robotic application, whereas heterogeneous assays require separation of free from bound analyte by more complex unit operations such as filtration, centrifugation or washing.

These assays are utilized to detect a wide variety of specific biomolecular interactions (including protein-protein, receptor-ligand, enzyme-substrate, and so on), and the inhibition thereof by small organic molecules. These assay methods and techniques are well known in the art (see, e.g., High Throughput Screening: The Discovery of Bioactive Substances, John P. Devlin (ed.), Marcel Dekker, New York, 1997 ISBN: 0-8247-0067-8). The screening assays of the present invention are amenable to high throughput screening of chemical libraries and are suitable for the identification of small molecule drug candidates, antibodies, peptides, and other antagonists and/or agonists, natural or synthetic.

One such assay is based on fluorescence resonance energy transfer (FRET; for example, HTRF[®], Packard BioScience Company, Meriden, CT; LANCE[™], PerkinElmer LifeSciences, Wallac Oy., Turku, Finland) between two fluorescent labels, an energy donating long-lived chelate label and a short-lived organic acceptor. The energy transfer

WO 03/031578

PCT/US02/31996

occurs when the two labels are brought in close proximity via the molecular interaction between DCL and a substrate and/or binding partner. In a FRET assay for detecting inhibition of the binding of DCL and a substrate and/or binding partner, europium chelate or cryptate labeled DCL or substrate and/or binding partner serves as an energy donor and streptavidin-labeled allophycocyanin (APC) bound to the appropriate binding partner (i.e., substrate and/or binding partner if DCL is labeled, or DCL if a substrate or binding partner is labeled) serves as an energy acceptor. Once DCL associates with a substrate and/or binding partner, the donor and acceptor molecules are brought in close proximity, and energy transfer occurs, generating a fluorescent signal at 665 nm. Antagonists of the interaction of DCL and a substrate and/or binding partner will thus inhibit the fluorescent signal, whereas agonists of this interaction would enhance it.

Another useful assay is a bioluminescence resonance energy transfer, or BRET, assay, substantially as described in Xu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:151 (1999). Similar to a FRET assay, BRET is based on energy transfer from a bioluminescent donor to a fluorescent acceptor protein. However, a green fluorescent protein (GFP) is used as the acceptor molecule, eliminating the need for an excitation light source. Exemplary BRET assays include BRET and BRET² from Packard BioScience, Meriden, CT.

DELFI[®] (dissociated enhanced lanthanide fluorimmunoassay; PerkinElmer LifeSciences, Wallac Oy., Turku, Finland) is a solid-phase assay based on time-resolved fluorometry analysis of lanthanide chelates (see, for example, US Patent 4,565,790, issued January 21, 1986). For this type of assay, microwell plates are coated with a first protein (NEMO or CYLD). The binding partner (DCL or a substrate and/or binding partner of DCL, respectively) is conjugated to europium chelate or cryptate, and added to the plates. After suitable incubation, the plates are washed and a solution that dissociates europium ions from solid phase bound protein, into solution, to form highly fluorescent chelates with ligands present in the solution, after which the plates are read using a reader such as a VICTOR²™ (PerkinElmer LifeSciences, Wallac Oy., Turku, Finland) plate reader to detect emission at 615 nm).

Another assay that may be useful in the inventive methods is a FlashPlate[®] (Packard Instrument Company, IL)-based assay. This assay measures the ability of compounds to inhibit protein-protein interactions. FlashPlates[®] are coated with a first protein (either DCL or a substrate and/or binding partner of DCL), then washed to remove excess protein. For the assay, compounds to be tested are incubated with the second protein (a substrate and/or binding partner of DCL, if the plates are coated with DCL, or DCL if plates are coated with a substrate and/or binding partner of DCL) and I¹²⁵ labeled antibody against the second protein and added to the plates. After suitable incubation and washing, the amount of radioactivity bound is measured using a

WO 03/031578

PCT/US02/31996

scintillation counter (such as a MicroBeta® counter; PerkinElmer LifeSciences, Wallac Oy., Turku, Finland).

The AlphaScreen™ assay (Packard Instrument Company, Meriden, CT). AlphaScreen™ technology is an "Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay" method utilizing latex microbeads (250 nm diameter) containing a photosensitizer (donor beads), or chemiluminescent groups and fluorescent acceptor molecules (acceptor beads). Upon illumination with laser light at 680 nm, the photosensitizer in the donor bead converts ambient oxygen to singlet-state oxygen. The excited singlet-state oxygen molecules diffuse approximately 250 nm (one bead diameter) before rapidly decaying. If the acceptor bead is in close proximity to the donor bead (i.e., by virtue of the interaction of DCL and a substrate and/or binding partner of DCL), the singlet-state oxygen molecules reacts with chemiluminescent groups in the acceptor beads, which immediately transfer energy to fluorescent acceptors in the same bead. These fluorescent acceptors shift the emission wavelength to 520-620 nm, resulting in a detectable signal. Antagonists of the interaction of DCL and a substrate and/or binding partner of DCL will thus inhibit the shift in emission wavelength, whereas agonists of this interaction would enhance it.

Polypeptides of the DCL family and fragments thereof can be used to identify binding partners. For example, they can be tested for the ability to bind a candidate binding partner in any suitable assay, such as a conventional binding assay, as well as a yeast two hybrid system. To illustrate, the DCL polypeptide can be labeled with a detectable reagent (e.g., a radionuclide, chromophore, enzyme that catalyzes a colorimetric or fluorometric reaction, and the like). The labeled polypeptide is contacted with cells expressing the candidate binding partner. The cells then are washed to remove unbound labeled polypeptide, and the presence of cell-bound label is determined by a suitable technique, chosen according to the nature of the label.

One example of a binding assay procedure is as follows. A recombinant expression vector containing the candidate binding partner cDNA is constructed. CV1-EBNA-1 cells in 10 cm² dishes are transfected with this recombinant expression vector. CV-1/EBNA-1 cells (ATCC CRL 10478) constitutively express EBV nuclear antigen-1 driven from the CMV Immediate-early enhancer/promoter. CV1-EBNA-1 was derived from the African Green Monkey kidney cell line CV-1 (ATCC CCL 70), as described by McMahon et al., (EMBO J. 10:2821, 1991). The transfected cells are cultured for 24 hours, and the cells in each dish then are split into a 24-well plate. After culturing an additional 48 hours, the transfected cells (about 4 x 10⁵ cells/well) are washed with BM-NFDM, which is binding medium (RPMI 1640 containing 25 mg/ml bovine serum albumin, 2 mg/ml sodium azide, 20 mM Hepes pH 7.2) to which 50 mg/ml nonfat dry milk has been added. The cells then are incubated for 1 hour at 37°C with various

WO 03/031578

PCT/US02/31996

concentrations of, for example, a soluble polypeptide/Fc fusion polypeptide made as set forth above. Cells then are washed and incubated with a constant saturating concentration of a ^{125}I -mouse anti-human IgG in binding medium, with gentle agitation for 1 hour at 37°C. After extensive washing, cells are released via trypsinization. The mouse anti-human IgG employed above is directed against the Fc region of human IgG and can be obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. The antibody is radioiodinated using the standard chloramine-T method. The antibody will bind to the Fc portion of any polypeptide/Fc polypeptide that has bound to the cells. In all assays, non-specific binding of ^{125}I -antibody is assayed in the absence of the Fc fusion polypeptide/Fc, as well as in the presence of the Fc fusion polypeptide and a 200-fold molar excess of unlabeled mouse anti-human IgG antibody. Cell-bound ^{125}I -antibody is quantified on a Packard Autogamma counter. Affinity calculations (Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949) are generated on RS/1 (BBN Software, Boston, MA) run on a Microvax computer. Binding can also be detected using methods that are well suited for high-throughput screening procedures, such as scintillation proximity assays (Udenfriend et al., 1985, Proc Natl Acad Sci USA 82: 8672-8676), homogeneous time-resolved fluorescence methods (Park et al., 1999, Anal Biochem 269: 94-104), fluorescence resonance energy transfer (FRET) methods (Clegg RM, 1995, Curr Opin Biotechnol 6: 103-110), or methods that measure any changes in surface plasmon resonance when a bound polypeptide is exposed to a potential binding partner, using for example a biosensor such as that supplied by Biacore AB (Uppsala, Sweden).

Yeast Two-Hybrid or "Interaction Trap" assays may be used in screening for test compounds. Where the DCL polypeptide binds or potentially binds to another polypeptide, the nucleic acid encoding the DCL polypeptide can also be used in interaction trap assays (such as, for example, that described in Gyuris et al., Cell 75:791-803 (1993)) to identify nucleic acids encoding the other polypeptide with which binding occurs or to identify inhibitors of the binding interaction. Polypeptides involved in these binding interactions can also be used to screen for peptide or small molecule inhibitors or agonists of the binding interaction.

Another type of suitable binding assay is a competitive binding assay. To illustrate, biological activity of a variant can be determined by assaying for the variant's ability to compete with the native polypeptide for binding to the candidate binding partner. Competitive binding assays can be performed by conventional methodology.

Reagents that can be employed in competitive binding assays include radiolabeled DCL and intact cells expressing DCL (endogenous or recombinant) on the cell surface. For example, a radiolabeled soluble DCL fragment can be used to compete with a soluble DCL variant for binding to cell surface receptors. Instead of intact cells, one could substitute a soluble binding partner/Fc fusion polypeptide bound to a solid phase through

WO 03/031578

PCT/US02/31996

the interaction of Polypeptide A or Polypeptide G (on the solid phase) with the Fc moiety. Chromatography columns that contain Polypeptide A and Polypeptide G include those available from Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ.

Cell proliferation, cell death, cell differentiation and cell adhesion assays may also be used to screen for test compounds. A DCL polypeptide, fragment and/or derivative thereof of the present invention may exhibit cytokine, cell proliferation (either inducing or inhibiting), or cell differentiation (either inducing or inhibiting) activity, or may induce production of other cytokines, chemokines or other soluble factor in certain cell populations. Many polypeptide factors discovered to date have exhibited such activity in one or more factor-dependent cell proliferation assays, and hence the assays serve as a convenient confirmation of cell stimulatory activity. The activity of agonists and/or antagonists of DCL of the present invention is evidenced by any one of a number of routine factor-dependent cell proliferation assays for cell lines including, without limitation, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e and CMK. The activity of a DCL polypeptide of the invention may, among other means, be measured by the following methods:

Assays for cytokine production and/or proliferation of spleen cells, lymph node cells or thymocytes include, without limitation, those described in: Kruisbeek and Shevach, 1994, Polyclonal T cell stimulation, in *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. eds. Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto; and Schreiber, 1994, Measurement of mouse and human interferon gamma in *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. eds. Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto.

Assays for cell movement and adhesion include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology* Coligan et al. eds, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 6.12, Measurement of alpha and beta chemokines 6.12.1-6.12.28); Taub et al. *J. Clin. Invest.* 95:1370-1376, 1995; Lind et al. *APMIS* 103:140-146, 1995; Muller et al *Eur. J. Immunol.* 25: 1744-1748; Gruber et al. *J Immunol.* 152:5860-5867, 1994; Johnston et al. *J Immunol.* 153: 1762-1768, 1994

Assays for receptor-ligand activity include without limitation those described in: *Current Protocols in Immunology* Coligan et al. eds, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 7.28, Measurement of cellular adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22), Takai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6864-6868, 1987; Bierer et al., *J. Exp. Med.* 168:1145-1156, 1988; Rosenstein et al., *J. Exp. Med.* 169:149-160 1989; Stoltenberg et al., *J. Immunol. Methods* 175:59-68, 1994; Stitt et al., *Cell* 80:661-670, 1995.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Methods of the present invention may be used to screen for antisense molecules that inhibit the functional expression of one or more mRNA molecules that encode one or more proteins that mediate a DCL-dependent cellular response. An anti-sense nucleic acid molecule is a DNA sequence that is inverted relative to its normal orientation for transcription and so expresses an RNA transcript that is complementary to a target mRNA molecule expressed within the host cell (i.e., the RNA transcript of the anti-sense nucleic acid molecule can hybridize to the target mRNA molecule through Watson-Crick base pairing). An anti-sense nucleic acid molecule may be constructed in a number of different ways provided that it is capable of interfering with the expression of a target protein. Typical anti-sense oligonucleotides to be screened preferably are 30-40 nucleotides in length. The anti-sense nucleic acid molecule generally will be substantially identical (although in antisense orientation) to the target gene. The minimal identity will typically be greater than about 65%, but a higher identity might exert a more effective repression of expression of the endogenous sequences. Substantially greater identity of more than about 80% is preferred, though about 95% to absolute identity would be most preferred.

Candidate nucleic acid molecules may possess ribozyme activity. Thus, the methods of the invention can be used to screen for ribozyme molecules that inhibit the functional expression of one or more mRNA molecules that encode one or more proteins that mediate a CD40 dependent cellular response. Ribozymes are catalytic RNA molecules that can cleave nucleic acid molecules having a sequence that is completely or partially homologous to the sequence of the ribozyme. It is possible to design ribozyme transgenes that encode RNA ribozymes that specifically pair with a target RNA and cleave the phosphodiester backbone at a specific location, thereby functionally inactivating the target RNA. In carrying out this cleavage, the ribozyme is not itself altered, and is thus capable of recycling and cleaving other molecules. The inclusion of ribozyme sequences within antisense RNAs confers RNA-cleaving activity upon them, thereby increasing the activity of the antisense constructs. The design and use of target RNA-specific ribozymes is described in Haseloff et al. (Nature, 334:585, 1988; see also U.S. Patent No.5,646,023), both of which publications are incorporated herein by reference. Tabler et al. (Gene 108:175, 1991) have greatly simplified the construction of catalytic RNAs by combining the advantages of the anti-sense RNA and the ribozyme technologies in a single construct. Smaller regions of homology are required for ribozyme catalysis, therefore this can promote the repression of different members of a large gene family if the cleavage sites are conserved.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Rational Drug Design

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptides of interest or of small molecules with which they interact, e.g., inhibitors, agonists, antagonists, etc. Any of these examples can be used to fashion drugs which are more active or stable forms of the active compound or which enhance or interfere with the function of a DCL active compound in vivo (Hodgson J (1991) Biotechnology 9:19-21). In one approach, the three-dimensional structure of an active compound of interest is determined by x-ray crystallography, by nuclear magnetic resonance, or by computer homology modeling or, most typically, by a combination of these approaches. Both the shape and charges of the active compound must be ascertained to elucidate the structure and to determine active site(s) of the molecule. Less often, useful information regarding the structure of a polypeptide may be gained by modeling based on the structure of homologous polypeptides. In both cases, relevant structural information is used to design analogous DCL-like molecules, to identify efficient inhibitors, or to identify small molecules that bind DCL polypeptides or DCL-associated substrates and/or binding partners. Useful examples of rational drug design include molecules which have improved activity or stability as shown by Braxton S and Wells JA (1992 Biochemistry 31:7796-7801) or which act as inhibitors, agonists, or antagonists of native peptides as shown by Athauda SB et al (1993 J Biochem 113:742-746). The use of DCL polypeptide structural information in molecular modeling software systems to assist in agonists and/or antagonist design and in studying agonists/antagonists-DCL polypeptide interaction is also encompassed by the invention. A particular method of the invention comprises analyzing the three dimensional structure of DCL polypeptides for likely binding sites of substrates, synthesizing a new molecule that incorporates a predictive reactive site, and assaying the new molecule as described further herein.

It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by functional assay, as described further herein, and then to solve its crystal structure. This approach, in principle, yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass polypeptide crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analog of the original antigen. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced peptides. The isolated peptides would then act as the pharmacore.

The purified DCL polypeptides of the invention (including polypeptides and fragments thereof, muteins, variants, oligomers, fusion proteins, and other forms) are useful in a variety of assays. For example, the DCL molecules of the present invention

WO 03/031578

PCT/US02/31996

can be used to identify binding partners of DCL polypeptides, which can also be used to modulate intercellular communication, cell stimulation, or immune cell activity. Alternatively, they can be used to identify non-binding-partner molecules or substances that modulate intercellular communication, cell stimulatory pathways, or immune cell activity.

Therapeutic Applications

Methods provided herein comprise administering DCL polypeptides and/or agonists and/or antagonists thereof to a patient, thereby modulating biological responses mediated by DCL proteins on antigen presenting cells, which in turn play a role in a particular condition. DCL polypeptide activities that may play a role in a particular condition include, but are not limited to, antigen binding, internalization, processing and presentation; APC activation, differentiation, maturation, homing and transmigration; cell to cell interactions including binding and modulation of intracellular signaling pathways in either an excitatory or inhibitory manner, as well as extracellular communication through pathways leading to secretion of factors that act in an autocrine, paracrine and/or endocrine fashion. Examples of cells that may bind to APCs expressing DCL polypeptides include cells of the immune system, including DCs, T-cells, B-cells, NK cells, as well as precursors thereof.

Treatment encompasses alleviation of at least one symptom of a disorder, or reduction of disease severity, and the like. An antagonist need not effect a complete "cure", or eradicate every symptom or manifestation of a disease, to constitute a viable therapeutic agent. As is recognized in the pertinent field, drugs employed as therapeutic agents may reduce the severity of a given disease state, but need not abolish every manifestation of the disease to be regarded as useful therapeutic agents.

Polynucleotides and polypeptides of the present invention may be used to treat or prevent disease states associated with infectious agents, as well as augment an immune response to infectious agents. In one embodiment, bacterial and/or viral antigens are targeted to APCs- preferably DCs, that express DCL polypeptides. The present invention provides compositions for targeting bacterial and/or viral antigens to APCs. For example, one or more DCL polypeptide agonists, are bound or chemically linked or coupled with one or more bacterial or viral antigens and administered *in vivo*, or by established *ex vivo* methods, to a patient in need thereof in order to facilitate antigen uptake and presentation in APCs expressing DCL polypeptides. Examples of DCL agonists include, for example, anti-DCL antibodies, or derivative thereof, a DCL natural ligand, or derivatives and peptide mimetics thereof, as well as anti-idiotypic antibodies directed against anti-natural ligand antibodies.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

The present invention also provides methods for treating or preventing disease states associated with infectious agents, as well as augmenting an immune response to infectious agents, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more bacterial or viral antigens.

In alternative embodiments, the present invention provides methods of augmenting an immune response to infectious agents, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more bacterial or viral antigens wherein the DCL polypeptides also facilitate trafficking to peripheral lymph nodes for antigen presentation to T and B cells located therein. In additional embodiments, DCL agonists may be used to alter the pattern of APC trafficking to specific organs of choice, such as preferentially trafficking to draining lymph nodes, spleen and the like.

In yet another embodiment, the present invention provides methods of augmenting an immune response to infectious agents, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more bacterial or viral antigens wherein the DCL polypeptides also facilitate trafficking to peripheral lymph nodes for antigen presentation to T cells, and wherein the DCL polypeptides also facilitate binding to and costimulation of T cells.

Examples of infectious virus include: Retroviridae (e.g., human immunodeficiency viruses, such as HIV-1 (also referred to as HTLV-III, LAV or HTLV-III/LAV, or HIV-III; and other isolates, such as HIV-LP; Picornaviridae (e.g., polio viruses, hepatitis A virus; enteroviruses, human coxsackie viruses, rhinoviruses, echoviruses); Calciviridae (e.g., strains that cause gastroenteritis); Togaviridae (e.g., equine encephalitis viruses, rubella viruses); Flaviridae (e.g., dengue viruses, encephalitis viruses, yellow fever viruses); Coronaviridae (e.g., coronaviruses); Rhabdoviridae (e.g., vesicular stomatitis viruses, rabies viruses); Filoviridae (e.g., ebola viruses); Paramyxoviridae (e.g., parainfluenza viruses, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus); Orthomyxoviridae (e.g., influenza viruses); Bunyaviridae (e.g., Hantaan viruses, bunya viruses, phleboviruses and Nairo viruses); Arena viridae (hemorrhagic fever viruses); Reoviridae (e.g., reoviruses, orbiviruses and rotaviruses); Birnaviridae; Hepadnaviridae (Hepatitis B virus); Parvoviridae (parvoviruses); Papovaviridae (papilloma viruses, polyoma viruses); Adenoviridae (most adenoviruses); Herpesviridae (herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, varicella zoster virus, cytomegalovirus (CMV), herpes viruses); Poxviridae (variola viruses, vaccinia viruses, pox viruses); and Iridoviridae (e.g., African swine fever virus); and unclassified viruses (e.g., the etiological agents of Spongiform encephalopathies, the agent of delta hepatitis (thought to be a

WO 03/031578

PCT/US02/31996

defective satellite of hepatitis B virus), the agents of non-A, non-B hepatitis (class 1=internally transmitted; class 2=parenterally transmitted (i.e., Hepatitis C); Norwalk and related viruses, and astroviruses).

Examples of infectious bacteria include: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (e.g. *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*), *Streptococcus (viridans group)*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus (anaerobic sps.)*, *Streptococcus pneumoniae*, pathogenic *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, and *Actinomyces israelii*.

Polynucleotides and polypeptides of the present invention may be used to treat disease states associated with fungal infections or parasitic infestations, as well as augment an immune response to those disorders. In one embodiment, fungal or parasitic antigens are targeted to APCs, preferably DCs expressing DCL polypeptides. Therefore, the present invention provides compositions for targeting fungal or parasitic antigens to APCs. One or more DCL polypeptides agonists, are bound or chemically linked or coupled with one or more fungal or parasitic antigens and administered either *in vivo* or by established *ex vivo* methods to a patient in need thereof in order to facilitate antigen uptake and presentation in APCs expressing DCL polypeptides. Examples of DCL agonists include, for example, an anti-DCL antibodies, or derivative thereof, a DCL natural ligand, or derivatives and peptide mimetic thereof and anti-idiotypic antibodies directed against anti-natural ligand antibodies.

The present invention also provides methods for treating disease states associated with fungal infections or parasitic infestations, as well as augmenting an immune response to fungal infections or parasitic infestations, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more fungal or parasitic antigens.

In alternative embodiments, the present invention provides methods of augmenting an immune response to fungal infections or parasitic infestations, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more fungal or parasitic antigens wherein the DCL polypeptides also facilitate trafficking to peripheral lymph nodes for antigen presentation to T and B cells located therein.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

In yet another embodiment, the present invention provides methods of augmenting an immune response to fungal infections or parasitic infestations, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more fungal or parasitic antigens wherein the DCL polypeptides also facilitate trafficking to peripheral lymph nodes for antigen presentation to T cells, and wherein the DCL polypeptides also facilitate binding to and costimulation of T cells.

Examples of infectious organisms may include, but is not limited to, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans* and the like. Examples of infectious organisms include *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*.

Polynucleotides and polypeptides of the present invention may be used to treat disease states associated with various hematologic and oncologic disorders, as well as augment an immune response to those disorders. In one embodiment, tumor antigens are targeted to APCs, preferably DCs expressing DCL polypeptides. Therefore, the present invention provides compositions for targeting tumor antigens to APCs. One or more DCL polypeptides agonists, are bound or chemically linked or coupled with one or more tumor antigens and administered either *in vivo* or by established *ex vivo* methods to a patient in need thereof in order to facilitate antigen uptake and presentation in APCs expressing DCL polypeptides. Examples of DCL agonists include, for example, an anti-DCL antibodies, or derivative thereof, a DCL natural ligand, or derivatives and peptide mimetic thereof and anti-idiotypic antibodies directed against anti-natural ligand antibodies.

The present invention also provides methods for treating disease states associated with cancer, hematologic and oncologic disorders, as well as augmenting an immune response to hematologic and oncologic disorders, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more tumor antigens.

In alternative embodiments, the present invention provides methods of augmenting an immune response to hematologic and oncologic disorders, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more bacterial or viral antigens wherein the DCL polypeptides also facilitate trafficking to peripheral lymph nodes for antigen presentation to T and B cells located therein.

In yet another embodiment, the present invention provides methods of augmenting an immune response to hematologic and oncologic disorders, the method comprising administering to a patient in need thereof one or more DCL agonists that have been bound to or chemically coupled or linked to one or more bacterial or viral antigens

WO 03/031578

PCT/US02/31996

wherein the DCL polypeptides also facilitate trafficking to peripheral lymph nodes for antigen presentation to T cells, and wherein the DCL polypeptides also facilitate binding to and costimulation of T cells.

5 Tumor antigens are well known in the art, such as those described in Minev, B., et al., *Pharmacol. Ther.*, Vol. 81, No. 2, pp. 121-139, 1999, and may also include tumor antigens associated with the following examples. Tumor antigens may be isolated, i.e., partially purified, cell-associated or some form of fusion protein.

10 Examples of hematologic and oncologic disorders include acute myelogenous leukemia, Epstein-Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma, glioma, colon, stomach, prostate, renal cell, cervical and ovarian cancers, lung cancer (SCLC and NSCLC), including cancer-associated cachexia, fatigue, asthenia, paraneoplastic syndrome of cachexia and hypercalcemia. In addition, solid tumors, including sarcoma, osteosarcoma, and carcinoma, such as adenocarcinoma (for example, breast cancer); melanotic neoplasia, including melanocytic nevus, radial and vertical growth phase melanoma;
15 squamous cell neoplasia, including seborrheic keratosis, actinic keratosis, basal cell carcinomas and squamous cell carcinoma. Furthermore, leukemia, including acute myelogenous leukemia, chronic or acute lymphoblastic leukemia and hairy cell leukemia may be treated. Other malignancies with invasive metastatic potential can be treated with the subject compounds, compositions and combination therapies, including multiple
20 myeloma. In addition, the present invention can be used to treat anemias and hematologic disorders, including anemia of chronic disease, aplastic anemia, including Fanconi's aplastic anemia; idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP); myelodysplastic syndromes (including refractory anemia, refractory anemia with ringed sideroblasts, refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in
25 transformation); myelofibrosis/myeloid metaplasia; and sickle cell vasocclusive crisis.

Various lymphoproliferative disorders also are treatable including autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), chronic lymphoblastic leukemia, hairy cell leukemia, chronic lymphatic leukemia, peripheral T-cell lymphoma, small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma, follicular lymphoma, Burkitt's lymphoma, Epstein-
30 Barr virus-positive T cell lymphoma, histiocytic lymphoma, Hodgkin's disease, diffuse aggressive lymphoma; acute lymphatic leukemias, T gamma lymphoproliferative disease, cutaneous B cell lymphoma, cutaneous T cell lymphoma (i.e., mycosis fungoides) and Sézary syndrome.

Disorders associated with transplantation are treatable with the disclosed DCL
35 polypeptides, such as graft-versus-host disease and complications resulting from solid organ transplantation, including transplantation of heart, liver, lung, skin, kidney or other organs. DCL polypeptides may be administered, for example, to facilitate skin grafts

WO 03/031578

PCT/US02/31996

and/or suppress differentiation of artificial skin grafts, as well as prevent or inhibit the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation.

The present invention also provides compositions and methods for the treatment of disorders and symptoms associated with autoimmunity and inflammation. Examples of include arthritis, diabetes, inflammatory bowel disease, systemic lupus erythmatosus, hemolytic anemia, as well as those diseases and conditions well known in the art. In one embodiment, DCL polypeptides, agonists and/or antagonists thereof are used in conjunction with one or more antigens associated with autoimmunity or inflammation whereby antigen-specific T-cell tolerance is induced to those antigens.

Administration of DCL Pharmaceutical Compositions

The present invention provide pharmaceutical compositions comprising an effective amount of a protein (DCL polypeptides, analogs, fragments, derivatives, fusion proteins, agonists and antagonists thereof) and a suitable diluent and carrier, as well as methods of using those pharmaceutical compositions for treating or preventing various diseases described above, or augmenting immune responses to those diseases. The use of DCL or homologs in conjunction with soluble cytokine receptors or cytokines, or other immunoregulatory molecules is also contemplated. Moreover, DNA encoding soluble DCL or homologs will also be useful; a tissue or organ to be transplanted can be transfected with the DNA by any method known in the art.

For therapeutic use, purified protein is administered to a patient, preferably a human, for treatment in a manner appropriate to the indication. Thus, for example, DCL protein compositions administered to regulate immune function can be given by bolus injection, continuous infusion, sustained release from implants, or other suitable technique. Typically, a therapeutic agent will be administered in the form of a composition comprising purified DCL, in conjunction with physiologically acceptable carriers, excipients or diluents. Such carriers will be nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

Ordinarily, the preparation of such protein compositions entails combining the inventive protein with buffers, antioxidants such as ascorbic acid, low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides, proteins, amino acids, carbohydrates including glucose, sucrose or dextrans, chelating agents such as EDTA, glutathione and other stabilizers and excipients. Neutral buffered saline or saline mixed with conspecific serum albumin are exemplary appropriate diluents. Preferably, product is formulated as a lyophilizate using appropriate excipient solutions (e.g., sucrose) as diluents. Appropriate dosages can be determined in trials. The amount and frequency of administration will depend, of course, on such factors as the nature and severity of the indication being treated, the desired response, the condition of the patient, and so forth.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Suitable agonists, in addition to those described above and variants thereof, include peptides, small organic molecules, peptidomimetics, antibodies, or the like. Antibodies may be polyclonal or monoclonal; intact or truncated, *e.g.* F(ab')₂, Fab, Fv; xenogeneic; allogeneic; syngeneic; or modified forms thereof, *e.g.* humanized, chimeric, etc.

In many cases, the agonist will be a polypeptide, an antibody or fragment thereof, etc., but other molecules that provide relatively high specificity and affinity may also be employed. Combinatorial libraries provide compounds other than oligopeptides that have the necessary binding characteristics.

Candidate agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic molecules, preferably small organic compounds having a molecular weight of more than 50 and less than about 2,500 daltons. Candidate agents comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl, sulfhydryl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules including peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or combinations thereof.

Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. Additionally, natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical and biochemical means. Known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification to produce structural analogs.

Diagnostic and Other Uses of DCL Polypeptides and Nucleic Acids

The nucleic acids encoding the DCL polypeptides provided by the present invention can be used for numerous diagnostic or other useful purposes. The nucleic acids of the invention can be used to express recombinant polypeptide for analysis, characterization or therapeutic use; as markers for tissues in which the corresponding polypeptide is preferentially expressed (either constitutively or at a particular stage of tissue differentiation or development or in disease states); as chromosome markers or tags (when labeled) to identify chromosomes or to map related gene positions; to compare

WO 03/031578

PCT/US02/31996

with endogenous DNA sequences in patients to identify potential genetic disorders; as probes to hybridize and thus discover novel, related DNA sequences; as a source of information to derive PCR primers for genetic fingerprinting; as a probe to "subtract-out" known sequences in the process of discovering other novel nucleic acids; for selecting and making oligomers for attachment to a "gene chip" or other support, including for examination of expression patterns; to raise anti-polypeptide antibodies using DNA immunization techniques; as an antigen to raise anti-DNA antibodies or elicit another immune response, and, for gene therapy. Uses of DCL polypeptides and fragmented polypeptides include, but are not limited to, the following: purifying polypeptides and measuring the activity thereof; delivery agents; therapeutic and research reagents; molecular weight and isoelectric focusing markers; controls for peptide fragmentation; identification of unknown polypeptides; and preparation of antibodies. Any or all nucleic acids suitable for these uses are capable of being developed into reagent grade or kit format for commercialization as products. Methods for performing the uses listed above are well known to those skilled in the art. References disclosing such methods include without limitation "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis eds., 1989, and "Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques", Academic Press, Berger, S. L. and A. R. Kimmel eds., 1987

Probes and Primers. Among the uses of the disclosed DCL nucleic acids, and combinations of fragments thereof, is the use of fragments as probes or primers. Such fragments generally comprise at least about 17 contiguous nucleotides of a DNA sequence. In other embodiments, a DNA fragment comprises at least 30, or at least 60, contiguous nucleotides of a DNA sequence. The basic parameters affecting the choice of hybridization conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook et al., 1989 and are described in detail above. Using knowledge of the genetic code in combination with the amino acid sequences set forth above, sets of degenerate oligonucleotides can be prepared. Such oligonucleotides are useful as primers, e.g., in polymerase chain reactions (PCR), whereby DNA fragments are isolated and amplified. In certain embodiments, degenerate primers can be used as probes for human or non-human genetic libraries. Such libraries would include but are not limited to cDNA libraries, genomic libraries, and even electronic EST (express sequence tag) or DNA libraries.

Diagnostics and Gene Therapy. The nucleic acids encoding DCL polypeptides, and the disclosed fragments and combinations of these nucleic acids can be used by one skilled in the art using well-known techniques to analyze abnormalities associated with the genes corresponding to these polypeptides. This enables one to distinguish conditions in which this marker is rearranged or deleted. In addition, nucleic acids of the invention

WO 03/031578

PCT/US02/31996

or a fragment thereof can be used as a positional marker to map other genes of unknown location. The DNA can be used in developing treatments for any disorder mediated (directly or indirectly) by defective, or insufficient amounts of, the genes corresponding to the nucleic acids of the invention. Disclosure herein of native nucleotide sequences permits the detection of defective genes, and the replacement thereof with normal genes. Defective genes can be detected in *in vitro* diagnostic assays, and by comparison of a native nucleotide sequence disclosed herein with that of a gene derived from a person suspected of harboring a defect in this gene.

Methods of Screening for Binding Partners. The polypeptides of the present invention each can be used as reagents in methods to screen for or identify binding partners. For example, the DCL polypeptides can be attached to a solid support material and may bind to their binding partners in a manner similar to affinity chromatography. In particular embodiments, a polypeptide is attached to a solid support by conventional procedures. As one example, chromatography columns containing functional groups that will react with functional groups on amino acid side chains of polypeptides are available (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). In an alternative, a polypeptide/Fc polypeptide (as discussed above) is attached to protein A- or protein G-containing chromatography columns through interaction with the Fc moiety. The DCL polypeptides also find use in identifying cells that express a DCL binding partner. Purified DCL polypeptides are bound to a solid phase such as a column chromatography matrix or a similar suitable substrate. For example, magnetic microspheres can be coated with the polypeptides and held in an incubation vessel through a magnetic field. Suspensions of cell mixtures or cell lysates of isolated cells containing potential binding-partner-expressing cells are contacted with the solid phase having the polypeptides thereon. Cells expressing the binding partner on the cell surface bind to the fixed polypeptides, and unbound cells are washed away. In an alternative format, intracellular binding partners or substrates DCL from cell lysates bind to DCL polypeptides and unbound proteins are removed. Alternatively, DCL polypeptides can be conjugated to a detectable moiety, then incubated with cells to be tested for binding partner expression. After incubation, unbound labeled matter is removed and the presence or absence of the detectable moiety on the cells is determined. In a further alternative, mixtures of cells or cell lysates suspected of expressing the binding partner are incubated with biotinylated polypeptides. Incubation periods are typically at least one hour in duration to ensure sufficient binding. The resulting mixture then is passed through a column packed with avidin-coated beads, whereby the high affinity of biotin for avidin provides binding of the desired cells or binding partners to the beads. Procedures for using avidin-coated beads are known (see Berenson, et al. *J. Cell. Biochem.*, 10D:239, 1986). Washing to remove unbound material, and the release of the bound cells or binding partners, are performed using

WO 03/031578

PCT/US02/31996

conventional methods. In some instances, the above methods for screening for or identifying binding partners may also be used or modified to isolate or purify such binding partner molecules or cells expressing them.

Carriers and Delivery Agents. The polypeptides also find use as carriers for delivering agents attached thereto to cells bearing identified binding partners. The polypeptides thus can be used to deliver diagnostic or therapeutic agents to such cells (or to other cell types found to express binding partners on the cell surface) in *in vitro* or *in vivo* procedures. Detectable (diagnostic) and therapeutic agents that can be attached to a polypeptide include, but are not limited to, toxins, other cytotoxic agents, drugs, radionuclides, chromophores, enzymes that catalyze a colorimetric or fluorometric reaction, and the like, with the particular agent being chosen according to the intended application. Among the toxins are ricin, abrin, diphtheria toxin, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, ribosomal inactivating polypeptides, mycotoxins such as trichothecenes, and derivatives and fragments (e.g., single chains) thereof. Radionuclides suitable for diagnostic use include, but are not limited to, ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , and ^{76}Br . Examples of radionuclides suitable for therapeutic use are ^{131}I , ^{211}At , ^{77}Br , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{109}Pd , ^{64}Cu , and ^{67}Cu . Such agents can be attached to the polypeptide by any suitable conventional procedure. The polypeptide comprises functional groups on amino acid side chains that can be reacted with functional groups on a desired agent to form covalent bonds, for example. Alternatively, the polypeptide or agent can be derivatized to generate or attach a desired reactive functional group. The derivatization can involve attachment of one of the bifunctional coupling reagents available for attaching various molecules to polypeptides (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). A number of techniques for radiolabeling polypeptides are known. Radionuclide metals can be attached to polypeptides by using a suitable bifunctional chelating agent, for example. Conjugates comprising polypeptides and a suitable diagnostic or therapeutic agent (preferably covalently linked) are thus prepared. The conjugates are administered or otherwise employed in an amount appropriate for the particular application.

30 Antibodies to DCL Polypeptides

Antibodies that are immunoreactive with the polypeptides of the invention are provided herein. Such antibodies specifically bind to the polypeptides via the antigen-binding sites of the antibody (as opposed to non-specific binding). In the present invention, specifically binding antibodies are those that will specifically recognize and bind with DCL polypeptides, homologues, and variants, but not with other molecules. In one preferred embodiment, the antibodies are specific for the polypeptides of the present invention and do not cross-react with other polypeptides. In this manner, the

WO 03/031578

PCT/US02/31996

DCL polypeptides, fragments, variants, fusion polypeptides, etc., as set forth above can be employed as "immunogens" in producing antibodies immunoreactive therewith.

More specifically, the polypeptides, fragment, variants, fusion polypeptides, etc. contain antigenic determinants or epitopes that elicit the formation of antibodies. These antigenic determinants or epitopes can be either linear or conformational (discontinuous). Epitopes can be identified by any of the methods known in the art. Thus, one aspect of the present invention relates to the antigenic epitopes of the polypeptides of the invention. Such epitopes are useful for raising antibodies, in particular monoclonal antibodies, as described in more detail below. Additionally, epitopes from the polypeptides of the invention can be used as research reagents, in assays, and to purify specific binding antibodies from substances such as polyclonal sera or supernatants from cultured hybridomas. Such epitopes or variants thereof can be produced using techniques well known in the art such as solid-phase synthesis, chemical or enzymatic cleavage of a polypeptide, or using recombinant DNA technology.

As to the antibodies that can be elicited by the epitopes of the polypeptides of the invention, whether the epitopes have been isolated or remain part of the polypeptides, both polyclonal and monoclonal antibodies can be prepared by conventional techniques. See, for example, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, New York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Kohler and Milstein, (U.S. Pat. No. 4,376,110); the human B-cell hybridoma technique (Kozbor *et al.*, 1984, *J. Immunol.* 133:3001-3005; Cole *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030); and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies specific for the polypeptides of the invention are also contemplated herein. Such hybridomas can be produced and identified by conventional techniques. The hybridoma producing the mAb of this invention can be cultivated in vitro or in vivo. Production of high titers of mAbs in vivo makes this the presently preferred method of production. One method for producing such a hybridoma cell line comprises immunizing an animal with a polypeptide; harvesting spleen cells from the immunized animal; fusing said spleen cells to a myeloma cell line, thereby generating hybridoma cells; and identifying a hybridoma cell line that produces a monoclonal antibody that binds the polypeptide. For the production of antibodies, various host animals can be immunized by injection with one or more of the following: a DCL polypeptide, a fragment of a DCL polypeptide, a functional equivalent of a DCL polypeptide, or a mutant form of a DCL polypeptide. Such host animals can include but are not limited to rabbits, guinea pigs, mice, and rats. Various adjuvants can be used to increase the immunologic response, depending on the

WO 03/031578

PCT/US02/31996

host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and
 5 *Corynebacterium parvum*. The monoclonal antibodies can be recovered by conventional techniques. Such monoclonal antibodies can be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Takeda *et al.*, 1985, *Nature*, 314: 452-454; Morrison *et al.*, 1984, *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6851-6855; Boulianne *et al.*, 1984, *Nature* 312: 643-646; Neuberger *et al.*, 1985, *Nature* 314: 268-270) by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. A chimeric antibody is a molecule in which
 10 different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a porcine mAb and a human immunoglobulin constant region. The monoclonal antibodies of the present invention also include humanized versions of murine monoclonal antibodies. Such humanized antibodies can be prepared by known techniques and offer the advantage of reduced immunogenicity when the antibodies are administered to humans. In one embodiment, a humanized monoclonal
 15 antibody comprises the variable region of a murine antibody (or just the antigen binding site thereof) and a constant region derived from a human antibody. Alternatively, a humanized antibody fragment can comprise the antigen binding site of a murine monoclonal antibody and a variable region fragment (lacking the antigen-binding site) derived from a human antibody. Procedures for the production of chimeric and further
 20 engineered monoclonal antibodies include those described in Riechmann *et al.* (*Nature* 332:323, 1988), Liu *et al.* (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick *et al.* (*BioTechnology* 7:934, 1989), and Winter and Harris (*TIPS* 14:139, Can, 1993). Useful techniques for humanizing antibodies are also discussed in U.S. Patent 6,054,297. Procedures to generate antibodies transgenically can be found in GB 2,272,440, US Patent Nos.
 25 5,569,825 and 5,545,806, and related patents. Preferably, for use in humans, the antibodies are human or humanized; techniques for creating such human or humanized antibodies are also well known and are commercially available from, for example, Medarex Inc. (Princeton, NJ) and Abgenix Inc. (Fremont, CA). In another preferred embodiment, fully human antibodies for use in humans are produced by screening a
 30 phage display library of human antibody variable domains (Vaughan *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol.* 16(6): 535-539; and U.S. Patent No. 5,969,108).

Antigen-binding antibody fragments that recognize specific epitopes can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited

WO 03/031578

PCT/US02/31996

to: the F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the (ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries can be constructed (Huse *et al.*, 1989, *Science*, 246:1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. Techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778; Bird, 1988, *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; and Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544-546) can also be adapted to produce single chain antibodies against DCL gene products. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide. Such single chain antibodies can also be useful intracellularly (i.e., as intrabodies), for example as described by Marasco *et al.* (*J. Immunol. Methods* 231:223-238, 1999) for genetic therapy in HIV infection. In addition, antibodies to the DCL polypeptide can, in turn, be utilized to generate anti-idiotypic antibodies that "mimic" the DCL polypeptide and that may bind to the DCL polypeptide's binding partners using techniques well known to those skilled in the art. (See, e.g., Greenspan & Bona, 1993, *FASEB J* 7(5):437-444; and Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438).

Antibodies that are immunoreactive with the polypeptides of the invention include bispecific antibodies (i.e., antibodies that are immunoreactive with the polypeptides of the invention via a first antigen binding domain, and also immunoreactive with a different polypeptide via a second antigen binding domain). A variety of bispecific antibodies have been prepared, and found useful both *in vitro* and *in vivo* (see, for example, U.S. Patent 5,807,706; and Cao and Suresh, 1998, *Bioconjugate Chem* 9: 635-644). Numerous methods of preparing bispecific antibodies are known in the art, including the use of hybrid-hybridomas such as quadromas, which are formed by fusing two differed hybridomas, and triomas, which are formed by fusing a hybridoma with a lymphocyte (Milstein and Cuello, 1983, *Nature* 305: 537-540; U.S. Patent 4,474,893; and U.S. Patent 6,106,833). U.S. Patent 6,060,285 discloses a process for the production of bispecific antibodies in which at least the genes for the light chain and the variable portion of the heavy chain of an antibody having a first specificity are transfected into a hybridoma cell secreting an antibody having a second specificity. Chemical coupling of antibody fragments has also been used to prepare antigen-binding molecules having specificity for two different antigens (Brennan *et al.*, 1985, *Science* 229: 81-83; Glennie *et al.*, *J. Immunol.*, 1987, 139:2367-2375; and U.S. Patent 6,010,902). Bispecific antibodies can also be produced via recombinant means, for example, by using the leucine zipper moieties from the *Fos* and *Jun* proteins (which preferentially form heterodimers) as described by Kostelny *et al.* (*J. Immunol.* 148:1547-4553; 1992). U.S. Patent 5,582,996 discloses the use of complementary interactive domains (such as leucine

WO 03/031578

PCT/US02/31996

zipper moieties or other lock and key interactive domain structures) to facilitate heterodimer formation in the production of bispecific antibodies. Tetravalent, bispecific molecules can be prepared by fusion of DNA encoding the heavy chain of an F(ab')₂ fragment of an antibody with either DNA encoding the heavy chain of a second F(ab')₂ molecule (in which the CH1 domain is replaced by a CH3 domain), or with DNA encoding a single chain FV fragment of an antibody, as described in U.S. Patent 5,959,083. Expression of the resultant fusion genes in mammalian cells, together with the genes for the corresponding light chains, yields tetravalent bispecific molecules having specificity for selected antigens. Bispecific antibodies can also be produced as described in U.S. Patent 5,807,706. Generally, the method involves introducing a protuberance (constructed by replacing small amino acid side chains with larger side chains) at the interface of a first polypeptide and a corresponding cavity (prepared by replacing large amino acid side chains with smaller ones) in the interface of a second polypeptide. Moreover, single-chain variable fragments (sFvs) have been prepared by covalently joining two variable domains; the resulting antibody fragments can form dimers or trimers, depending on the length of a flexible linker between the two variable domains (Kortt *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10:423-433).

Screening procedures by which such antibodies can be identified are well known, and can involve immunoaffinity chromatography, for example. Antibodies can be screened for agonistic (*i.e.*, ligand-mimicking) properties. Such antibodies, upon binding to cell surface DCL, induce biological effects (e.g., transduction of biological signals) similar to the biological effects induced when the DCL binding partner binds to cell surface DCL. Agonistic antibodies can be used to induce DCL-mediated cell stimulatory pathways or intercellular communication. Bispecific antibodies can be identified by screening with two separate assays, or with an assay wherein the bispecific antibody serves as a bridge between the first antigen and the second antigen (the latter is coupled to a detectable moiety).

Those antibodies that can block binding of the DCL polypeptides of the invention to binding partners for DCL can be used to inhibit DCL-mediated intercellular communication or cell stimulation that results from such binding. Such blocking antibodies can be identified using any suitable assay procedure, such as by testing antibodies for the ability to inhibit binding of DCL to certain cells expressing an DCL binding partner. Alternatively, blocking antibodies can be identified in assays for the ability to inhibit a biological effect that results from binding of soluble DCL to target cells. Antibodies can be assayed for the ability to inhibit DCL binding partner-mediated cell stimulatory pathways, for example. Such an antibody can be employed in an *in vitro* procedure, or administered *in vivo* to inhibit a biological activity mediated by the entity that generated the antibody. Disorders caused or exacerbated (directly or indirectly) by

WO 03/031578

PCT/US02/31996

the interaction of DCL with cell surface binding partner receptor thus can be treated. A therapeutic method involves *in vivo* administration of a blocking antibody to a mammal in an amount effective in inhibiting DCL binding partner-mediated biological activity. Monoclonal antibodies are generally preferred for use in such therapeutic methods. In one embodiment, an antigen-binding antibody fragment is employed. Compositions comprising an antibody that is directed against DCL and a physiologically acceptable diluent, excipient, or carrier, are provided herein. Suitable components of such compositions are as described below for compositions containing DCL polypeptides.

Also provided herein are conjugates comprising a detectable (e.g., diagnostic) or therapeutic agent, attached to the antibody. Examples of such agents are presented above. The conjugates find use in *in vitro* or *in vivo* procedures. The antibodies of the invention can also be used in assays to detect the presence of the polypeptides or fragments of the invention, either *in vitro* or *in vivo*. The antibodies also can be employed in purifying polypeptides or fragments of the invention by immunoaffinity chromatography.

15

EXAMPLES

The following examples are put forth so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make and use the subject invention, and are not intended to limit the scope of what is regarded as the invention.

Efforts have been made to insure accuracy with respect to the numbers used (e.g. amounts, temperature, concentrations, etc.) but some experimental errors and deviations should be allowed for. Unless otherwise indicated, parts are parts by weight, molecular weight is average molecular weight, temperature is in degrees centigrade, and pressure is at or near atmospheric.

25

EXAMPLE 1:

GENERATION OF BONE-MARROW DERIVED MURINE DCs AND PREPARATION OF LABELED TARGETS FOR AFFYMETRIX GENE CHIPTM MICROARRAY EXPERIMENTS

30 *Mice*

Female C57BL/10 mice (8 to 12 weeks of age) were obtained from Taconic (Germantown, NY). All mice were housed under specific pathogen-free conditions.

Cell preparations:

Bone marrow (BM) cells were isolated by flushing femurs with 2 ml phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD). The BM cells were centrifuged once and then resuspended in tris-ammonium chloride at 37°C for 2 minutes to lyse red blood cells. The cells were centrifuged again and then resuspended in culture medium (CM)

WO 03/031578

PCT/US02/31996

consisting of McCoy's medium supplemented with essential and nonessential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate, 2.5 mmol/l Hepes buffer pH 7.4, vitamins, 5.5×10^{-5} mol/l 2-mercaptoethanol (2-ME), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.3 mg/ml L-glutamine (PSG), and 10% FBS (all media reagents from Gibco).

5

DC cultures:

BM cells were cultured in CM containing 200 ng/ml (180 units/ml) human Flt3-L (Amgen Corp.) for 9 days at 1×10^6 /ml, in 6-well plates (Costar/Corning Incorp., Acton, MA). Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air. DCs were harvested from the cultures by vigorously pipetting and removing nonadherent cells, then washing each well 2 times with room temperature PBS without Ca⁺⁺ or Mg⁺⁺ to remove loosely adherent cells, which were pooled with the nonadherent fraction.

It is well known in the art that the overall number of functionally mature dendritic cells in the host may be expanded through the prior administration of a suitable growth factor, which growth factor may be one or more of Flt3-L; GM-CSF; G-CSF; GM-CSF + IL-4; GM-CSF + IL-3; etc. For example, Flt3-L (Amgen Corp., Seattle, WA) has been found to stimulate the generation of large numbers of functionally mature dendritic cells, both *in vivo* and *in vitro* (U.S. Ser. No. 08/539,142, filed Oct. 4, 1995). Flt3-L refers to a genus of polypeptides that are described in EP 0627487 A2 and in WO 94/28391, both incorporated herein by reference. Other useful cytokines include granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF; described in U.S. Pat. Nos. 5,108,910, and 5,229,496 each of which is incorporated herein by reference). Moreover, GM-CSF/IL-3 fusion proteins (i.e., a C-terminal to N-terminal fusion of GM-CSF and IL-3) may be used. Such fusion proteins are well known in the art and are described in U.S. Pat. Nos. 5,199,942; 5,108,910 and 5,073,627, each of which is incorporated herein by reference. Various routes and regimens for delivery may be used, as known and practiced in the art. For example, where the agent is Flt3-L, the Flt3-L may be administered daily, where the dose is from about 1 to 100 mg/kg body weight, more usually from about 10 to about 50 mg/kg body weight. Administration may be at a localized site, e.g. subcutaneous, or systemic, e.g. intraperitoneal, intravenous, etc.

The Flt3-L-derived DCs were cultured for 10 days. On day ten, the cultures were stimulated for 4 hours with the following stimuli/conditions: (a) 10 ng/ml recombinant murine GM-CSF, 1000 U/ml human; (b) 500U/ml IFN- γ /D (Genzyme, Cambridge, MA); (c) 1 μ g/ml *Escherichia coli* (*E. coli*)(0217:B8)-derived LPS (Difco, Detroit, MI) and (d) no stimulus.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

RNA isolation:

After the 4 hr stimulation, the cells were immediately lysed in Trizol™ (Gibco BRL Life Technologies) and the RNA was isolated according to manufacturer's recommendations. The isolated RNA was further isolated using the RNeasy™ kit from Qiagen (Qiagen Inc., Valencia, CA).

Preparation of labeled RNA targets for hybridization to Affymetrix™ arrays:

The preparation of the target RNAs and hybridization to the microarray chips was performed essentially as described in the Affymetrix protocols (Affymetrix Corp., Santa Clara, CA), which are incorporated herein by reference. Briefly, the target sample was prepared using 10ug of total RNA, which was first converted to single-stranded cDNA using Superscript II™ reverse transcriptase (Gibco BRL Life Technologies) and a primer encoding the bacteriophage T7 RNA polymerase promoter. The single-stranded cDNA was then converted to double-stranded cDNA. The T7 promoter was used to generate a labeled cRNA target in a reaction containing T7 RNA polymerase and biotinylated nucleotide triphosphates. After purification, the cRNA was chemically fragmented to an average length of 50-200 bases and hybridized overnight at 45°C to Affymetrix gene chips. This cRNA is complementary to short DNA probes synthesized on the Affymetrix Gene Chip™ arrays. After hybridization, the chips were processed in the Affymetrix fluidics station. They were washed, stained with streptavidin phycoerythrin (SAPE), followed by biotinylated goat anti-streptavidin, and a second round of SAPE.

EXAMPLE 2:**PREPARATION OF ANTIBODIES**

The following example illustrates a method for preparing monoclonal antibodies that bind DCL polypeptides. Other conventional techniques may be used, such as those described in U.S. Patent 4,411,993. Immunogen preparation, choice of adjuvant and immunization protocol are methods that are well known in the art and may be found, for example in *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988). Suitable immunogens that may be employed in generating such antibodies include, but are not limited to, purified DCL polypeptides, an immunogenic fragment thereof, and cells expressing high levels of DCL polypeptides or an immunogenic fragment thereof. DNA encoding one or more DCL polypeptides may also be used as an immunogen, for example, as reviewed by Pardoll and Beckerleg in *Immunity* 3: 165, 1995.

Rodents (BALB/c mice or Lewis rats, for example) are immunized with a DCL polypeptide immunogen emulsified in an adjuvant (such as complete or incomplete

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Freund's adjuvant, alum, or another adjuvant, such as Ribi adjuvant R700 (Ribi, Hamilton, MT)), and injected in amounts ranging from 10-100 micrograms subcutaneously or intraperitoneally. DNA may be given intradermally (Raz et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9519) or intramuscularly (Wang et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4156); saline has been found to be a suitable diluent for DNA-based antigens. Ten days to three weeks days later, the immunized animals are boosted with additional immunogen and periodically boosted thereafter on a weekly, biweekly or every third week immunization schedule.

Serum samples are periodically taken by retro-orbital bleeding or tail-tip excision to test for DCL polypeptide antibodies by dot-blot assay, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), immunoprecipitation, or other suitable assays, such as FACS analysis of inhibition of binding of DCL polypeptide to a DCL polypeptide binding partner. Following detection of an appropriate antibody titer, positive animals are provided one last intravenous injection of DCL polypeptide in saline. Three to four days later, the animals are sacrificed, and spleen cells are harvested and fused to a murine myeloma cell line, e.g., NS1 or preferably P3X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580). These cell fusions generate hybridoma cells, which are plated in multiple microtiter plates in a HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine) selective medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

The hybridoma cells may be screened by ELISA for reactivity against purified DCL polypeptide by adaptations of the techniques disclosed in Engvall et al., (*Immunochem.* 8: 871, 1971) and in U.S. Patent 4,703,004. A preferred screening technique is the antibody capture technique described in Beckmann et al., (*J. Immunol.* 144: 4212, 1990). Positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic rodents to produce ascites containing high concentrations (for example, greater than 1 milligram per milliliter) of anti-DCL polypeptide monoclonal antibodies. Alternatively, hybridoma cells can be grown *in vitro* in flasks or roller bottles by various techniques. Monoclonal antibodies can be purified by ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can also be used, as can affinity chromatography based upon binding to DCL polypeptide.

EXAMPLE 3:

ANTISENSE INHIBITION OF DCL NUCLEIC ACID EXPRESSION

In accordance with the present invention, a series of oligonucleotides are designed to target different regions of the DCL mRNA molecule, using the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 5, 9, 11, 15, 17, 21 and 23 as the basis for the design of the oligonucleotides. The oligonucleotides are selected to be approximately 10, 12, 15, 18,

WO 03/031578

PCT/US02/31996

or more preferably 20 nucleotide residues in length, and to have a predicted hybridization temperature that is at least 37 degrees C. Preferably, the oligonucleotides are selected so that some will hybridize toward the 5' region of the mRNA molecule, others will hybridize to the coding region, and still others will hybridize to the 3' region of the mRNA molecule. Methods such as those of Gray and Clark (U.S. Patent Nos 5,856,103 and 6,183,966) can be used to select oligonucleotides that form the most stable hybrid structures with target sequences, as such oligonucleotides are desirable for use as antisense inhibitors.

The oligonucleotides may be oligodeoxynucleotides, with phosphorothioate backbones (internucleoside linkages) throughout, or may have a variety of different types of internucleoside linkages. Generally, methods for the preparation, purification, and use of a variety of chemically modified oligonucleotides are described in U.S. Patent No. 5,948,680. As specific examples, the following types of nucleoside phosphoramidites may be used in oligonucleotide synthesis: deoxy and 2'-alkoxy amidites; 2'-fluoro amidites such as 2'-fluorodeoxyadenosine amidites, 2'-fluorodeoxyguanosine, 2'-fluorouridine, and 2'-fluorodeoxycytidine; 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified amidites such as 2,2'-anhydro[1-(beta-D-arabino-furanosyl)-5-methyluridine], 2'-O-methoxyethyl-5-methyluridine, 2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methyluridine, 3'-O-acetyl-2'-O-methoxy-ethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methyluridine, 3'-O-acetyl-2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methyl-4-triazoleuridine, 2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methylcytidine, N4-benzoyl-2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methylcytidine, and N4-benzoyl-2'-O-methoxyethyl-5'-O-di-methoxytrityl-5-methylcytidine-3'-amidite; 2'-O-(aminoxyethyl) nucleoside amidites and 2'-O-(dimethylaminoxyethyl) nucleoside amidites such as 2'-(dimethylaminoxyethoxy) nucleoside amidites, 5'-O-tert-butyl-diphenylsilyl-O²-2'-anhydro-5-methyluridine, 5'-O-tert-butyl-diphenylsilyl-2'-O-(2-hydroxyethyl)-5-methyluridine, 2'-O-[(2-phthalimidoxy)ethyl]-5'-t-butyl-diphenyl-silyl-5-methyluridine, 5'-O-tert-butyl-diphenylsilyl-2'-O-[(2-formadoximinooxy)ethyl]-5-methyluridine, 5'-O-tert-butyl-diphenylsilyl-2'-O-[N,N-dimethylaminoxyethyl]-5-methyluridine, 2'-O-(dimethylaminoxy-ethyl)-5-methyluridine, 5'-O-DMT-2'-O-(dimethylaminoxyethyl)-5-methyluridine, and 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimethylaminoxyethyl)-5-methyluridine-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphor-amidite]; and 2'-(aminoxyethoxy) nucleoside amidites such as N2-isobutyl-6-O-diphenyl-carbamoyl-2'-O-(2-ethylacetyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)guanosine-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diiso-propylphosphoramidite].

Modified oligonucleosides may also be used in oligonucleotide synthesis, for example methylenemethylimino-linked oligonucleosides, also called MMI-linked oligonucleosides; methylene-dimethylhydrazo-linked oligonucleosides, also called MDH-linked oligonucleosides; methylene-carbonylamino-linked oligonucleosides, also called

WO 03/031578

PCT/US02/31996

amide-3-linked oligonucleosides; and methylene-aminocarbonyl-linked oligonucleosides, also called amide-4-linked oligonucleosides, as well as mixed backbone compounds having, for instance, alternating MMI and P=O or P=S linkages, which are prepared as described in U.S. Pat. Nos. 5,378,825, 5,386,023, 5,489,677, 5,602,240 and 5,610,289.

- 5 Formacetal- and thioformacetal-linked oligonucleosides may also be used and are prepared as described in U.S. Pat. Nos. 5,264,562 and 5,264,564; and ethylene oxide linked oligonucleosides may also be used and are prepared as described in U.S. Pat. No. 5,223,618. Peptide nucleic acids (PNAs) may be used as in the same manner as the oligonucleotides described above, and are prepared in accordance with any of the various
- 10 procedures referred to in *Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23; and U.S. Pat. Nos. 5,539,082, 5,700,922, and 5,719,262.

- Chimeric oligonucleotides, oligonucleosides, or mixed oligonucleotides/oligonucleosides of the invention can be of several different types. These include a first type wherein the "gap" segment of linked nucleosides is positioned
- 15 between 5' and 3' "wing" segments of linked nucleosides and a second "open end" type wherein the "gap" segment is located at either the 3' or the 5' terminus of the oligomeric compound. Oligonucleotides of the first type are also known in the art as "gapmers" or gapped oligonucleotides. Oligonucleotides of the second type are also known in the art as "hemimers" or "wingmers". Some examples of different types of chimeric
- 20 oligonucleotides are: [2'-O-Me]-[2'-deoxy]-[2'-O-Me] chimeric phosphorothioate oligonucleotides, [2'-O-(2-methoxyethyl)]-[2'-deoxy]-[2'-O-(methoxyethyl)] chimeric phosphorothioate oligonucleotides, and [2'-O-(2-methoxy-ethyl)phosphodiester]-[2'-deoxy phosphoro-thioate]-[2'-O-(2-methoxyethyl)phosphodiester] chimeric
- 25 oligonucleotides, all of which may be prepared according to U.S. Patent No. 5,948,680. In one preferred embodiment, chimeric oligonucleotides ("gapmers") 18 nucleotides in length are utilized, composed of a central "gap" region consisting of ten 2'-deoxynucleotides, which is flanked on both sides (5' and 3' directions) by four-nucleotide "wings". The wings are composed of 2'-methoxyethyl (2'-MOE) nucleotides. The
- 30 internucleoside (backbone) linkages are phosphorothioate (P=S) throughout the oligonucleotide. Cytidine residues in the 2'-MOE wings are 5-methylcytidines. Other chimeric oligonucleotides, chimeric oligonucleosides, and mixed chimeric oligonucleotides/oligonucleosides are synthesized according to U.S. Pat. No. 5,623,065.

- Oligonucleotides are preferably synthesized via solid phase P(III)
- 35 phosphoramidite chemistry on an automated synthesizer. The concentration of oligonucleotide in each well is assessed by dilution of samples and UV absorption spectroscopy. The full-length integrity of the individual products is evaluated by

WO 03/031578

PCT/US02/31996

capillary electrophoresis, and base and backbone composition is confirmed by mass analysis of the compounds utilizing electrospray-mass spectroscopy.

The effect of antisense compounds on target nucleic acid expression can be tested in any of a variety of cell types provided that the target nucleic acid is present at measurable levels. This can be routinely determined using, for example, PCR or Northern blot analysis. Cells are routinely maintained for up to 10 passages as recommended by the supplier. When cells reached 80% to 90% confluency, they are treated with oligonucleotide. For cells grown in 96-well plates, wells are washed once with 200 microliters OPTI-MEM-1 reduced-serum medium (Gibco BRL) and then treated with 130 microliters of OPTI-MEM-1 containing 3.75 g/mL LIPOFECTIN (Gibco BRL.) and the desired oligonucleotide at a final concentration of 150 nM. After 4 hours of treatment, the medium is replaced with fresh medium. Cells are harvested 16 hours after oligonucleotide treatment. Preferably, the effect of several different oligonucleotides should be tested simultaneously, where the oligonucleotides hybridize to different portions of the target nucleic acid molecules, in order to identify the oligonucleotides producing the greatest degree of inhibition of expression of the target nucleic acid.

Antisense modulation of DCL nucleic acid expression can be assayed in a variety of ways known in the art. For example, DCL mRNA levels can be quantitated by, e.g., Northern blot analysis, competitive polymerase chain reaction (PCR), or real-time PCR. Real-time quantitative PCR is presently preferred. RNA analysis can be performed on total cellular RNA or poly(A)+ mRNA. Methods of RNA isolation and Northern blot analysis are taught in, for example, Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 1, pp. 4.1.1-4.2.9 and 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1996. Real-time quantitative (PCR) can be conveniently accomplished using the commercially available ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, available from PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif. and used according to manufacturer's instructions. This fluorescence detection system allows high-throughput quantitation of PCR products. As opposed to standard PCR, in which amplification products are quantitated after the PCR is completed, products in real-time quantitative PCR are quantitated as they accumulate. This is accomplished by including in the PCR reaction an oligonucleotide probe that anneals specifically between the forward and reverse PCR primers, and contains two fluorescent dyes. A reporter dye (e.g., JOE or FAM, obtained from either Operon Technologies Inc., Alameda, Calif. or PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif.) is attached to the 5' end of the probe and a quencher dye (e.g., TAMRA, obtained from either Operon Technologies Inc., Alameda, Calif. or PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif.) is attached to the 3' end of the probe. When the probe and dyes are intact, reporter dye emission is quenched by the proximity of the 3' quencher dye. During amplification, annealing of the probe to the target sequence creates a substrate that can be cleaved by

WO 03/031578

PCT/US02/31996

the 5'-exonuclease activity of Taq polymerase. During the extension phase of the PCR amplification cycle, cleavage of the probe by Taq polymerase releases the reporter dye from the remainder of the probe (and hence from the quencher moiety) and a sequence-specific fluorescent signal is generated. With each cycle, additional reporter dye molecules are cleaved from their respective probes, and the fluorescence intensity is monitored at regular (six-second) intervals by laser optics built into the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. In each assay, a series of parallel reactions containing serial dilutions of mRNA from untreated control samples generates a standard curve that is used to quantitate the percent inhibition after antisense oligonucleotide treatment of test samples. Other methods of quantitative PCR analysis are also known in the art. DCL protein levels can be quantitated in a variety of ways well known in the art, such as immunoprecipitation, Western blot analysis (immunoblotting), ELISA, or fluorescence-activated cell sorting (FACS). Antibodies directed to DCL polypeptides can be prepared via conventional antibody generation methods such as those described herein. Immunoprecipitation methods, Western blot (immunoblot) analysis, and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are standard in the art (see, for example, Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.16.1-10.16.11, 10.8.1-10.8.21, and 11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991).

All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

SEQUENCE IDENTIFIERS

- SEQ ID NO:1 is the full-length cDNA sequence for DCL 1.
- SEQ ID NO:2 is the full-length ORF amino acid sequence for DCL 1.
- SEQ ID NO:3 is the sense-oriented PCR primer for cloning DCL 1.
- SEQ ID NO:4 is the antisense-oriented PCR primer for cloning DCL 1.
- SEQ ID NO:5 is the full-length cDNA sequence for DCL 2.
- SEQ ID NO:6 is the full-length ORF amino acid sequence for DCL 2.
- SEQ ID NO:7 is the sense-oriented PCR primer for cloning DCL 2.
- SEQ ID NO:8 is the antisense-oriented PCR primer for cloning DCL 2.
- SEQ ID NO:9 is the cDNA sequence for an alternative splice variant of DCL 2 (exon 3 deleted).

WO 03/031578

PCT/US02/31996

- SEQ ID NO:10 is the amino acid sequence for an alternative splice variant of DCL 2 (exon 3 deleted).
- SEQ ID NO:11 is the full-length cDNA sequence for DCL 3.
- SEQ ID NO:12 is the full-length ORF amino acid sequence for DCL 3.
- 5 SEQ ID NO:13 is the sense-oriented PCR primer for cloning DCL 3.
- SEQ ID NO:14 is the antisense-oriented PCR primer for cloning DCL 3.
- SEQ ID NO:15 is the cDNA sequence for an alternative splice variant of DCL 3 (exons 4 and 5 deleted).
- SEQ ID NO:16 is the amino acid sequence for an alternative splice variant of DCL 3 (exons 4 and 5 deleted).
- 10 SEQ ID NO:17 is the full-length cDNA sequence for DCL 4.
- SEQ ID NO:18 is the full-length ORF amino acid sequence for DCL 4.
- SEQ ID NO:19 is the sense-oriented PCR primer for cloning DCL 4.
- SEQ ID NO:20 is the antisense-oriented PCR primer for cloning DCL 4.
- 15 SEQ ID NO:21 is the cDNA sequence for an alternative splice variant of DCL 4 (exon 4 deleted).
- SEQ ID NO:22 is the amino acid sequence for an alternative splice variant of DCL 4 (exon 4 deleted).
- SEQ ID NO:23 is the full-length cDNA sequence for DCL 5.
- 20 SEQ ID NO:24 is the full-length ORF amino acid sequence for DCL 5.
- SEQ ID NO:25 is the sense-oriented PCR primer for cloning DCL 5.
- SEQ ID NO:26 is the antisense-oriented PCR primer for cloning DCL 5.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

What is Claimed is:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - (a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2;
 - (b) an amino acid sequence selected from the group consisting of: amino acids 1 through 245 of SEQ ID NO:2 and amino acids 77 through 245 of SEQ ID NO:2;
 - (c) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 comprising all or part of the extracellular domain having at least one DCL activity;
 - (d) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids having at least one DCL activity;
 - (e) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids having a C-type lectin domain;
 - (f) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids having an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory-like motif (ITIM) amino acid sequences;
 - (g) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids that are immunogenic;
 - (h) amino acid sequences comprising at least 25 amino acids and sharing amino acid identity with the amino acid sequences of any of (a)-(g), wherein the percent amino acid identity is at least 80%, wherein the amino acid sequences have at least one DCL activity; and
 - (i) amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 20 amino acids having at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the amino acid sequences have at least one DCL activity.
2. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.
3. The polynucleotide of claim 2 comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - (a) SEQ ID NO:1;
 - (b) nucleotides 1 through 738 of SEQ ID NO:1; and
 - (c) allelic variants of (a)-(b).
4. An isolated genomic polynucleotide corresponding to the polynucleotide of any of the claims 2 and 3:

WO 03/031578

PCT/US02/31996

5. An isolated polynucleotide, having a length of at least 15 nucleotides, that hybridizes under conditions of moderate stringency to a complementary nucleic acid of the polynucleotide of claim 3, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide having at least one DCL activity.
6. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence that shares nucleotide sequence identity with the nucleotide sequences of the nucleic acids of claim 3, wherein the percent nucleotide sequence identity is at least 80%, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide having at least one DCL activity.
7. An expression vector comprising at least one polynucleotide according to any of claims 2 through 6.
8. A transformed host cell comprising at least one polynucleotide according to any of claims 2 through 6.
9. The transformed host cell of claim 8, wherein the transformed host cell is selected from the group consisting of prokaryotic cells, eukaryotic cells, bacterial cells, yeast cells, insect cells, and mammalian cells such as human, monkey, ape and rodent.
10. A process for producing a polypeptide encoded by the polynucleotide of any of claims 2 through 6, comprising culturing a transformed host cell under conditions promoting expression of said polypeptide, wherein the transformed host cell comprises at least one polynucleotide according to any of claims 2 through 6.
11. The process of claim 10 further comprising purifying said polypeptide.
12. The polypeptide produced by the process of claim 11.
13. An isolated antibody that binds to the polypeptide of claim 1.
14. The antibody of claim 13 wherein the antibody is a monoclonal antibody.
15. The antibody of claim 14 wherein the monoclonal antibody is a human or humanized monoclonal antibody.
16. The antibody of claim 15 wherein the antibody agonizes one or more DCL activities of the polypeptide of claim 1.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

17. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
- (a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:5;
 - (b) an amino acid sequence selected from the group consisting of: amino acids 1 through 215 of SEQ ID NO:5 and amino acids 42 through 215 of SEQ ID NO:5;
 - (c) the amino acid sequence of SEQ ID NO:5 comprising all or part of the extracellular domain having at least one DCL activity;
 - (d) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids having at least one DCL activity;
 - (e) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids having a C-type lectin domain;
 - (f) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 25 contiguous amino acids that are immunogenic;
 - (g) amino acid sequences comprising at least 25 amino acids and sharing amino acid identity with the amino acid sequences of any of (a)-(f), wherein the percent amino acid identity is at least 80%, wherein the amino acid sequences have at least one DCL activity; and
 - (h) amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising at least 20 amino acids having at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the amino acid sequences have at least one DCL activity.
18. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 17.
19. The polynucleotide of claim 18 comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) SEQ ID NO:23;
 - (b) nucleotides 1 through 648 of SEQ ID NO:23; and
 - (c) allelic variants of (a)-(b).
20. An isolated genomic polynucleotide corresponding to the polynucleotide of any of claims 18 and 19.
21. An isolated polynucleotide, having a length of at least 15 nucleotides, that hybridizes under conditions of moderate stringency to a complementary nucleic acid of the polynucleotide of claim 19, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide having at least one DCL activity.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

22. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence that shares nucleotide sequence identity with the nucleotide sequences of the nucleic acids of claim 19, wherein the percent nucleotide sequence identity is at least 80%, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide having at least one DCL activity.
23. An expression vector comprising at least one polynucleotide according to any of claims 18 through 22.
24. A transformed host cell comprising at least one polynucleotide according to any of claims 18 through 22.
25. The transformed host cell of claim 24, wherein the transformed host cell is selected from the group consisting of prokaryotic cells, eukaryotic cells, bacterial cells, yeast cells, insect cells, and mammalian cells such as human, monkey, ape and rodent.
26. A process for producing a polypeptide encoded by the polynucleotide of any of claims 18 through 22, comprising culturing a transformed host cell under conditions promoting expression of said polypeptide, wherein the transformed host cell comprises at least one polynucleotide according to any of claims 18 through 22.
27. The process of claim 26 further comprising purifying said polypeptide.
28. The polypeptide produced by the process of claim 27.
29. An isolated antibody that binds to the polypeptide of claim 17.
30. The antibody of claim 29 wherein the antibody is a monoclonal antibody.
31. The antibody of claim 30 wherein the monoclonal antibody is a human or humanized monoclonal antibody.
32. The antibody of claim 31 wherein the antibody agonizes one or more DCL activities of the polypeptide of claim 17.
33. The polypeptide of claims 1 or 17, wherein the polypeptide has an activity selected from the group consisting of antigen binding, antigen internalization, antigen processing and antigen presentation; antigen presenting cell (APC) activation, APC

WO 03/031578

PCT/US02/31996

differentiation, APC maturation, APC homing and APC transmigration; cell to cell interactions including binding and modulation of intracellular signaling pathways in either an excitatory or inhibitory manner; extracellular communication through secretion of soluble factors; C-type lectin activity; carbohydrate recognition domain activity; aspartyl protease activity and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory-like motif (ITIM) activity.

34. A method for identifying compounds that modulate DCL polypeptide activity comprising

- (a) mixing a test compound with the polypeptide of claim 1 or claim 17; and
- (b) determining whether the test compound alters the DCL polypeptide activity of said polypeptide.

35. A method for identifying compounds that inhibit the binding activity of DCL polypeptides comprising

- (a) mixing a test compound with the polypeptide of claim 1 or claim 17 and a binding partner of said polypeptide; and
- (b) determining whether the test compound inhibits the binding activity of said polypeptide.

36. A method for increasing DCL activity comprising providing at least one compound selected from the group consisting of the polypeptide of any of claims 1 and 17 and agonists of said polypeptides.

37. The method of claim 36, wherein the agonists is selected from the group consisting of an antibody, a peptide, peptidomimetic, mimotope or a peptibody.

38. A method for decreasing one or more DCL activities comprising providing at least one antagonist of the polypeptide of any of claims 1 and 17.

39. The method of claim 38, wherein the antagonists is selected from the group consisting of an antibody, a peptide, peptidomimetic, mimotope or a peptibody.

40. A method for treating an infectious disease comprising administering one or more polypeptides according to any of claims 1 and 17 coupled to one or more antigens from infectious agents.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

41. A method of augmenting an immune response to an infectious agent comprising administering one or more polypeptides according to any of claims 1 and 17 coupled to one or more antigens from infectious agents.
42. A method for treating cancer comprising administering one or more polypeptides according to any of claims 1 and 17 coupled to one or more tumor antigens.
43. A method of augmenting an immune response to cancer comprising administering one or more polypeptides according to any of claims 1 and 17 coupled to one or more tumor antigens.
44. A method of inducing antigen-specific tolerance in cells of the immune system comprising administering one or more polypeptides according to any of claims 1 and 17 coupled to one or more antigens associated with autoimmunity or inflammation.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

FIG. 1

DCL 1.

```

ATGGCATTACCAACAACTTATCTGACGTGAACCTCAAAAATCAACCTGTTCTCCTCAGGC
M A L F N I Y T D V N F K N Q P V S S G
CTCATCTCAGACTCGTCTTCTCATGTACCGTCTCAGACTCGTCTCAGCTCTCCCAAAGAAG
L I S D S S S S C T V S D S S S A L P K K
ACCACATATTCACAAAAGTAACCCCTGGCTTTCCAGGCTGCTTCTTGCCCTTGTGGATATTT
T T I H K S N P G F P R L L L A L W I F
TTCCTGCTGTGCGCAATCTTATCTCTGTTGCTCTGATCATTTTATTTCAAAATGATTTCT
F L L L A I L F S V A L I I L F Q M Y S
GATCTCCTTGAAGAAAATATCTCTAGAACGACTGAATCAGCAAGATTGCATTGTGTA
D L L E E K Y T L E R L N H A R L H C V
AAAAACCACTCGTCTGTAGAACCAAACTCTGGAGCTGTTGTCCAAAGAATTGGAGCCA
K N H S S V E D K V W S C C P K N W K F
TTTGATTCCTGCTGCTACTTCACTTCCGCTGACACTGCATCCTGGAGTAAGAGTGAAGAG
F D S H C Y F T S R D T A S W S K S E E
AAGTGCTCCCTCAGGGGTGCTCATCTGCTGGTGATCCAGAGCCAGGAAGAGCAGGATTTT
K C S L R G A H L L V I Q S Q E E Q D F
ATCACCAACACTCTGAACCTCGTGTCTTATTTATGTGGGGCTGTCAGATCCAAAGGGC
I T N T L N P R A A Y Y V G L S D P K G
CATGGACAATGGCAGTGGGTGATCAGACACCATATGATCAAAATGCCACATCTCTGGCAC
H G Q W Q W V D Q T P Y D Q N A T S W H
TCAGATGAACCCAGTGGCAACACTGAATTTGTGTTGTGCTAAGTTATCATCCAAACGTT
S D E P S G N T E F C V V L S Y H P N V
AAAGGATGGGGCTGGAGTGTCCGCCCTTGTGATGGTGATCATAGGTTGATTGTGAGATG
K G W G W S V A P C D G D H R L I C E M
AGGCAGCTCTATGTATGA
R Q L Y V

```

```

MALPNTTVDVNFKNQFVSSGLISDSSCTVSDSSSALPKKTIHKSNPGFPRILLALWTF
FLLLAIFSVALLFQMSDLLEKYTLERLNHARLHCVNHSVDEKXWSCCPKNWKP
FDSHCYFTRDTASWSKSEKCSLRGAHLLVIQSQEEQDFTNTLNPRAAYYVGLSDPKG
HGQWQWVDQTPYDQNAATSWHSDEPSGNTFPCVVLSEHFNKKGMSVAPCDGDRILCEM
RQLYV

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

FIG. 2

DCL 2:

```

ATGTTTTCAGAAAACATTATGTTAACACGAACCTCAAAAATAAAGTTGACTCTCTCAGAC
M F S E N I Y V N T N F K N K V D S S D
      ||
ATCGACACAGACCTCTTGGCCAGCTCCCCAAAGGAAGAACACGCTCTCAGAAAAGTTGTAC
I D T D S W P A P Q R K N T S Q K S C H
      ||
AAATTCCTTAAGTCCCTCTTTACCTCCTCATAATCTATTTCTGCTGTGACAACTCTTA
K F S K V L P T S L I I Y F L L L T I L
      ||
TTCTCCGGTGTCTGATCCTTTGTTTACAAAATATTTCTCAGCTTCTTGAAGAAAAAATG
F S G A L I T L F T K Y S Q L L E E K M
ATTATAAAGAACTGAACCTACTGAAATGGAGTGTACAAAATGGGCTTCACTCTTGGAA
I I K E L N Y T E L E C T K W A S L L E
      ||
GACAAAGTCTGGAGCTGTTGCCCAAAGGATTGGAAGCCGTTTGGTCTCTACTGCTACTTC
D K V W S C C P K D W K P F G S Y C Y F
ACTTCAACTGACTGGTGGCATCTTGGAAATGAGAGTAAGGAGAACTGCTTCCACATGGGT
T S T D L V A S W N E S K E N C F H M G
      ||
GCTCATCTGGTGGTGTATCCACAGCCAGGAAGAACAGGATTTTCATCACTGGGATCCTGGAC
A H L V V I H S Q E E Q D F I T G I L D
ACTGGTACTGCTTATTTTATAGGACTTTCAAATCCAGGTGATCAACAATGGCAATGGATT
T G T A Y F I G L S N P G D Q Q W Q W I
      ||
GATCAGACACCGTACGATGATAATACACACTTCTGGCACAAAGGTGAGCCTAGCAGTGAC
D Q T P Y D D N T T F W H K G E P S S D
AATGAACAGTGTGTTATAATAAATCATCGTCAGAGTACTGGATGGGGCTGGAGTGATATC
N E Q C V I I N H R Q S T G W G W S D I
CCTTGAGTGATAAACAGAACTCAATTTGCCATGTGAAAAAATATACATTATGA
P C S D K Q N S I C H V K K I Y L

```

```

MFSENIYVNTNFKNKVDSSDIDTDSWPAFORKNTSQKSKHKFVKVLPFSLIIVFLLLTLL
FSGALITPTKYSQLLEBKMIILKELNYTFELCTKWASLLEKVNCCPKDKKPFCSYCYF
TSTDLVASWNESENKCNCFHMGAILVVIHSQEEQDFITGLDPTGTAYFGLSNPGDQQOWMI
DQTPYDNTTFWHKGEPSDNEQCVLIINHRQSTGKWSDIKPSDKONSTCHVKKIYL

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

FIG. 3

DCL 3

```

ATGGCTCAGAAATCACTTATGCAGAGTGAGGATCAGGAATGAATCCGACTCTCTGGAC
M A S E I T Y A E V R I T N E S D S L D
      ||
ACCTACTCAAAATGCTCTGCAGCTCCAGAGAGAAACCTATCCGTGATCTAAGAAAGCCT
T Y S K C P A A P R E K P I R D L R K P
      ||
GGTCCCCCTCACTGCTTCTTACATCCCTGATGCTACTTCTCCTGCTGGCAATCACA
G S P S L L L T S L M L L L L L L A I T
      ||
TTCTTAGTTGCTTTTATCATTTTATTTTCAAAAGTACTCTCAACTTCTTGAAGAAAAGAA
F L V A F I I Y F Q K Y S Q L L E E K E
      ||
GCTGCAAAAATATAATGTACAAGGAATGAAGTGCATAAAAATGTTTCACTCATGGAA
A A K N I M Y K E L N C I K N G S L M E
      ||
GACAAAGTCTGGAGCTGTGCCCCAAGGATTGAAACCATTTGTTTCCCACTGCTACTTC
D K V W S C C P K D W K P F V S H C Y F
      ||
ATTTTGAATGACTCGAAGGCATCTTGGAAAGAGAGTGAGGAGAAGTGTCCCATGSGGT
I L N D S K A S W N E S R E K C S H M G
      ||
GCTCATCTGGTGGTGATCCACAGCCAGGCAGAGCAGGATTTTCATCACCAGCAACCTGAAC
A H L V V I H S Q A E Q D F I T S N L N
      ||
ACAAGTCTGGTTATTTTATAGGACTTTTGGATGCTGCTCAAAGACAATGGCGATGGATT
T S A G Y F I G L L D A G Q R Q W R W I
      ||
GATCAGACACCATACAATAAGAGTGCTACGTTCTGGCACAAAGTGAAGCCCAACCAAGAT
D Q T P Y N K S A T F W H K G E P N Q D
      ||
TGGGAACGATGCTTTATAATAATCATAAAACAACCTGGATGGGGCTGGAATGATATCCCT
W E R C V I I N H K T T G W G W N D I P
      ||
TCGAAGATCAACACAAATTCAGTTTCTGCTAGCTGAAGAAAATATACTTATGA
C K D E H N S V C Q V K K I Y L

```

```

MASEITVAEVRITNESDSLDTYSKCPAAPREKPIRDLRKPGSPSLLLTSMLLLLLLAIT
FLVAFIIFYFQKYSOLLBEKEAAKNIMYKELNCTKNGSLMEDKWSCCPKDWKPFVSHCYF
ILNDSKASVNESEKCSHMGHLVVIHSQAEQDFITSNLNTSAGYFIGLLDAGQRQWRWI
DQTPYNKSATFWHKGEPNQDWERCVIINHKTGNGWNDLPCKDEHNSVCQVKIYL

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

FIG. 4

DCL 4:

```

      ||
ATGATGCAGGAAGACCAAGCCCAAGGCGAGGTAGTCTGCTGCTCCCTGAGACTCTGGATG
M M Q E R P A Q G Q V V C W S L R L W K
      ||
GCTGCTCTGATTTCATCTTACTCCTCAGCACCTGTTTCATTGCGAGTTGTGTAGTGACT
A A L I S I L L L S T C F I A S C V V T
      ||
TACCAGCTTATGATGAACAAGCCCAATAGAAGACTATCTGAAGTCCACACATACCATCC
Y Q L M M N K P N R R L S E L H T Y H S
      ||
AATCTCATCTGCTTTAGTGAAGGAAGTACGGTATCAGAAAAGSTCTGGAGCTGTGGCCA
N L I C F S E G T T V S E K V W S C C P
      ||
AAGGATTGGAAGCCATTGGTTCCTACTGCTACTTCACTCAACTGACTCTCGGGCATCC
K D W K P F G S Y C Y F T S T D S R A S
      ||
CAGAATAAGAGTGAAGAGAACTGCTCTCTCAGGGGTGCTCATCTGCTGGTGTATCCACAGC
Q N K S E E K C S L R G A H L V V I H S
      ||
CAGGAAGAGCAGGATTTTCATCACCAGAAATGCTAGACACTGCTGCTGGTTATTTTATGGA
Q E E Q D F I T R M L D T A A G Y F I G
      ||
CTTTCAGATGTTGGGAATAGTCAATGGCGATGGATTGATCAGACACCATAAATGATAGA
L S D V G N S Q W R W I D Q T F Y N D R
      ||
GCCCATTTCTGCCACAAAGGTGAGCCCAACAATGACTATGAAAAATGTTTATATTAAT
A T F W H K G E P N N D Y E K C V I L N
      ||
TATCGGAAACTATGTGGGGCTGGAATGATATTGACTGCAGTGATGAAGAGAAGTCAAGTT
Y R K T M W G W N D I D C S D E E N S V
      ||
TGTCAGATGAAGAAAATATATCTTATGA
C Q M K K I Y L

```

```

MMQERPAGQGVVCMWLSLRMMMAALISILLSTCFIASCVVTYQLMMNKPNNRRLSELHTYHS
NLICFSEGTIVSEKVMSCCPKDWKPGSYCYFTSTDSRASQNKSEKCSLRGAHLVVIHS
QEEQDFITRMLDTAAGYFIGHLSDVGN SQWRWLDQTPYNDRTFWHKGEPNNDYERKVILN
VRKTMWGWNDUDCSDEENSVQMKKIYL

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

FIG. 5

DCL 5

```

      ||
ATGGGGCTAGAAAAACCTCAAAGTAACTGGGAGGAGGCATGCCATCCCAAGCTGATACCT
M G L E K P Q S K L E G G M H P Q L I P

TCGGTTATTGCTGTAGTTTTCATCTTACTTCTCAGTGTCTGTTTATTGCAAGTTGTTTG
S V I A V V F I L L L S V C F I A S C L

      ||
GTGACTCATCACAACCTTTTCACGCTGTAAAGAGAGGCACAGGAGTGCACAAGTTAGAGCAC
V T H H N F S R C K R G T G V H K L E H

CATGCAAGCTCAAATGCATCAAAGAGAAATCAGAATGAAAAGTCTGAAGGGAGCACC
H A K L K C I K E K S E L K S A E G S T

TGGAACTGTGTCTTATTGACTGGAGAGCCITCCAGTCCAACTGCTATTTTCCTCTTACT
W N C C P I D W R A F Q S N C Y F P L T

GACAAACAAGACGTGGGCTGAGAGTGAAGGAACGTTCAGGGATGGGGGCCCATCTGATG
D N K T W A E S E R N C S G M G A H L M

      ||
ACCAICAGCAAGGAGCTGAGCAGAACTTTTATTATTCAGTTTCTGGATAGACGGCTTCC
T I S T E A E Q N F I I Q F L D R R L S

TATTTCTTTGGACTTAGAGATGAGAATGCCAAAGGTCACTGSCGTGGGTGGACCAAGC
Y F D G L R D E N A K G Q W R W V D Q T

      ||
CCATTAAACCCAGCAGATTTCTGGCATAAGAAATGAACCCGACAACTCTCAGGGAGAA
P F N P R R V F W H K N E P D N S Q G E

AACTGTGTGTCTTGTATTATAACCAAGATAAATGGGCTCGAATGATCTTCTCTGTAAAC
N C V V L V Y N Q D K W A W N D V P C N

TTTGAAGCAAGTAGGATTTGTAAAAATACCTGGAACAACATTCAACTAG
F E A S R I C K I P G T T L N

```

```

MGLEKPSKLBGGMHPQLIPSVIAVVFLLLSVCFIASCLVTHHNFSSRCKRGTGVHKLEH
HANLCTREKSELKSAEGSTWNCPCIDWRAFQSNCFPLTDNKTMAESERNCSGGMGAHLM
TISTEAEQNFIQFLDRRLSYFLGLRDENAKGWRWVDQTFFNPRRVFWHRNEPDNSQGE
NCVIVLYNQDKWAWNDVFCNFEASRICKIPGTTLN

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

SEQUENCE LISTING

<110> IMMUNEX CORPORATION
Butz, Eric A.
Anderson, Dirk M.

<120> MAMMALIAN C-TYPE LECTINS

<130> 3318-WO

<140> --to be assigned--

<141> 2002-10-04

<150> US 60/328,026

<151> 2001-10-09

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 738

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(738)

<223>

```

<400> 1
atg gca tta cca aac att tat act gac gtg aac ttc aaa aat caa cct      48
Met Ala Leu Pro Asn Ile Tyr Thr Asp Val Asn Phe Lys Asn Gln Pro
1          5          10          15

gtt tcc tca ggc ctc atc tca gac tcg tct tca tgt acc gtc tca gac      96
Val Ser Ser Gly Leu Ile Ser Asp Ser Ser Ser Cys Thr Val Ser Asp
          20          25          30

tcg tct tca gct ctc cca aag aag acc act att cac aaa agt aac cct     144
Ser Ser Ser Ala Leu Pro Lys Lys Thr Thr Ile His Lys Ser Asn Pro
          35          40          45

ggc ttt ccc agg ctg ctt ctt gcc ttg tgg ata ttt ttc ctg ctg ttg     192
Gly Phe Pro Arg Leu Leu Ala Leu Trp Ile Phe Phe Leu Leu Leu
          50          55          60

gca atc tta ttc tot gtt got ctg atc att tta ttt caa atg tat tot     240
Ala Ile Leu Phe Ser Val Ala Leu Ile Ile Leu Phe Gln Met Tyr Ser
          65          70          75          80

gat ctc ctt gaa gaa aaa tat act cta gaa cga ctg aat cac gca aga     288
Asp Leu Leu Glu Lys Lys Tyr Thr Leu Glu Arg Leu Asn His Ala Arg
          85          90          95

ttg cat tgt gta aaa aac cac tcg tot gta gaa gac aaa gtc tgg agc     336
Leu His Cys Val Lys Asn His Ser Ser Val Glu Asp Lys Val Trp Ser
          100          105          110

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

```

tgt tgt cca aag aat tgg aag cca ttt gat tcc cac tgc tac ttc act    384
Cys Cys Pro Lys Asn Trp Lys Pro Phe Asp Ser His Cys Tyr Phe Thr
      115                120                125

tcc cgt gac act gca tcc tgg agt aag agt gaa gag aag tgc tcc ctc    432
Ser Arg Asp Thr Ala Ser Trp Ser Lys Ser Glu Glu Lys Cys Ser Leu
      130                135                140

agg ggt gct cat ctg ctg gtg atc cag agc cag gaa gag cag gat ttc    480
Arg Gly Ala His Leu Leu Val Ile Gln Ser Gln Glu Glu Gln Asp Phe
      145                150                155                160

atc acc aac act ctg aac cct cgt gct gct tat tat gtg ggg ctg tca    528
Ile Thr Asn Thr Leu Asn Pro Arg Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Leu Ser
      165                170                175

gat cca aag ggc cat gga caa tgg cag tgg gtt gat cag aca cca tat    576
Asp Pro Lys Gly His Gly Gln Trp Gln Trp Val Asp Gln Thr Pro Tyr
      180                185                190

gat caa aat gcc aca tcc tgg cac tca gat gaa ccc agt ggc aac act    624
Asp Gln Asn Ala Thr Ser Trp His Ser Asp Glu Pro Ser Gly Asn Thr
      195                200                205

gaa ttt tgt gtt gtg cta agt tat cat cca aac gtt aaa gga tgg ggc    672
Glu Phe Cys Val Val Leu Ser Tyr His Pro Asn Val Lys Gly Trp Gly
      210                215                220

tgg agt gtc gcc cct tgt gat ggt gat cat agg ttg att tgt gag atg    720
Trp Ser Val Ala Pro Cys Asp Gly Asp His Arg Leu Ile Cys Glu Met
      225                230                235                240

agg cag ctc tat gta tga                                          738
Arg Gln Leu Tyr Val
      245

```

```

<210> 2
<211> 245
<212> PRT
<213> Mus sp.

```

```

<400> 2

```

```

Met Ala Leu Pro Asn Ile Tyr Thr Asp Val Asn Phe Lys Asn Gln Pro
1      5      10      15

```

```

Val Ser Ser Gly Leu Ile Ser Asp Ser Ser Ser Cys Thr Val Ser Asp
      20      25      30

```

```

Ser Ser Ser Ala Leu Pro Lys Lys Thr Thr Ile His Lys Ser Asn Pro
      35      40      45

```

```

Gly Phe Pro Arg Leu Leu Leu Ala Leu Trp Ile Phe Phe Leu Leu Leu
50      55      60

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Ala Ile Leu Phe Ser Val Ala Leu Ile Ile Leu Phe Gln Met Tyr Ser
65 70 75 80

Asp Leu Leu Glu Glu Lys Tyr Thr Leu Glu Arg Leu Asn His Ala Arg
85 90 95

Leu His Cys Val Lys Asn His Ser Ser Val Glu Asp Lys Val Trp Ser
100 105 110

Cys Cys Pro Lys Asn Trp Lys Pro Phe Asp Ser His Cys Tyr Phe Thr
115 120 125

Ser Arg Asp Thr Ala Ser Trp Ser Lys Ser Glu Glu Lys Cys Ser Leu
130 135 140

Arg Gly Ala His Leu Leu Val Ile Gln Ser Gln Glu Glu Gln Asp Phe
145 150 155 160

Ile Thr Asn Thr Leu Asn Pro Arg Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Leu Ser
165 170 175

Asp Pro Lys Gly His Gly Gln Trp Gln Trp Val Asp Gln Thr Pro Tyr
180 185 190

Asp Gln Asn Ala Thr Ser Trp His Ser Asp Glu Pro Ser Gly Asn Thr
195 200 205

Glu Phe Cys Val Val Leu Ser Tyr His Pro Asn Val Lys Gly Trp Gly
210 215 220

Trp Ser Val Ala Pro Cys Asp Gly Asp His Arg Leu Ile Cys Glu Met
225 230 235 240

Arg Gln Leu Tyr Val
245

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 3
atggcattac caaacattta tactgacgtg aac

33

<210> 4

WO 03/031578

PCT/US02/31996

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 4
 atgcttcggttcatacataga gctgcctcat c 31

<210> 5
 <211> 714
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(714)
 <223>

<400> 5
 atg ttt tca gaa aac att tat gtt aac acg aac ttc aaa aat aaa gtt 48
 Met Phe Ser Glu Asn Ile Tyr Val Asn Thr Asn Phe Lys Asn Lys Val
 1 5 10 15
 gac tcc tca gac atc gac aca gac tct tgg cca gct ccc caa agg aag 96
 Asp Ser Ser Asp Ile Asp Thr Asp Ser Trp Pro Ala Pro Gln Arg Lys
 20 25 30
 aac acg tct cag aaa agt tgt cac aaa ttc tct aag gtc ctc ttt acc 144
 Asn Thr Ser Ser Gln Lys Ser Cys His Lys Phe Ser Lys Val Leu Phe Thr
 35 40 45
 tca ctc ata atc tat ttc ctg ctg ttg aca atc tta ttc tcc ggt gct 192
 Ser Leu Ile Ile Tyr Phe Leu Leu Leu Thr Ile Leu Phe Ser Gly Ala
 50 55 60
 ctg atc act ttg ttt aca aaa tat tct cag ctt ctt gaa gaa aaa atg 240
 Leu Ile Thr Leu Phe Thr Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Glu Lys Met
 65 70 75 80
 att ata aaa gaa ctg aac tat act gaa ttg gag tgt aca aaa tgg gct 288
 Ile Ile Lys Glu Leu Asn Tyr Thr Glu Leu Glu Cys Thr Lys Trp Ala
 85 90 95
 tca ctc ttg gaa gac aaa gtc tgg agc tgt tgc cca aag gat tgg aag 336
 Ser Leu Leu Glu Asp Lys Val Trp Ser Cys Cys Pro Lys Asp Trp Lys
 100 105 110
 cag ttt ggt tcc tac tgc tac ttc act tca act gac ttg gtg gca tct 384
 Pro Phe Gly Ser Tyr Cys Tyr Phe Thr Ser Thr Asp Leu Val Ala Ser
 115 120 125
 tgg aat gag agt aag gag aac tgc ttc cac atg ggt gct cat ctg gtg 432
 Trp Asn Glu Ser Lys Glu Asn Cys Phe His Met Gly Ala His Leu Val
 130 135 140
 gtg atc cac agc cag gaa gaa cag gat ttc atc act ggg atc ctg gac 480
 Val Ile His Ser Gln Glu Glu Gln Asp Phe Ile Thr Gly Ile Leu Asp

WO 03/031578 PCT/US02/31996

145 150 155 160

act ggt act gct tat ttt ata gga ctt tca aat cca ggt gat caa caa 528
 Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Asn Pro Gly Asp Gln Gln
 165 170 175

tgg caa tgg att gat cag aca cgg tac gat gat aat acc aca ttc tgg 576
 Trp Gln Trp Ile Asp Gln Thr Pro Tyr Asp Asp Asn Thr Thr Phe Trp
 180 185 190

cac aaa ggt gag cct agc agt gac aat gaa cag tgt gtt ata ata aat 624
 His Lys Gly Glu Pro Ser Ser Asp Asn Glu Gln Cys Val Ile Ile Asn
 195 200 205

cat cgt cag agt act gga tgg ggc tgg agt gat atc cct tgc agt gat 672
 His Arg Gln Ser Thr Gly Trp Gly Trp Ser Asp Ile Pro Cys Ser Asp
 210 215 220

aaa cag aac tca att tgc cat gtg aaa aaa ata tac tta tga 714
 Lys Gln Asn Ser Ile Cys His Val Lys Lys Ile Tyr Leu
 225 230 235

<210> 6
 <211> 237
 <212> FRT
 <213> Mus sp.

<400> 6

Met Phe Ser Glu Asn Ile Tyr Val Asn Thr Asn Phe Lys Asn Lys Val
 1 5 10 15

Asp Ser Ser Asp Ile Asp Thr Asp Ser Trp Pro Ala Pro Gln Arg Lys
 20 25 30

Asn Thr Ser Gln Lys Ser Cys His Lys Phe Ser Lys Val Leu Phe Thr
 35 40 45

Ser Leu Ile Ile Tyr Phe Leu Leu Leu Thr Ile Leu Phe Ser Gly Ala
 50 55 60

Leu Ile Thr Leu Phe Thr Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Glu Lys Met
 65 70 75 80

Ile Ile Lys Glu Leu Asn Tyr Thr Glu Leu Glu Cys Thr Lys Trp Ala
 85 90 95

Ser Leu Leu Glu Asp Lys Val Trp Ser Cys Cys Pro Lys Asp Trp Lys
 100 105 110

Pro Phe Gly Ser Tyr Cys Tyr Phe Thr Ser Thr Asp Leu Val Ala Ser
 115 120 125

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Trp Asn Glu Ser Lys Glu Asn Cys Phe His Met Gly Ala His Leu Val
 130 135 140

Val Ile His Ser Gln Glu Glu Gln Asp Phe Ile Thr Gly Ile Leu Asp
 145 150 155 160

Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Asn Pro Gly Asp Gln Gln
 165 170 175

Trp Gln Trp Ile Asp Gln Thr Pro Tyr Asp Asp Asn Thr Thr Phe Trp
 180 185 190

His Lys Gly Glu Pro Ser Ser Asp Asn Glu Gln Cys Val Ile Ile Asn
 195 200 205

His Arg Gln Ser Thr Gly Trp Gly Trp Ser Asp Ile Pro Cys Ser Asp
 210 215 220

Lys Gln Asn Ser Ile Cys His Val Lys Lys Ile Tyr Leu
 225 230 235

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 7
 agttgactcc tcagacatcg acacagact 29

<210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 8
 tggcaaatg agttctgttt atcactgcaa g 31

<210> 9
 <211> 612
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(612)

WO 03/031578

PCT/US02/31996

<223>

<400> 9

atg ttt tca gaa aac att tat gtt aac acg aac ttc aaa aat aaa gtt 48
 Met Phe Ser Glu Asn Ile Tyr Val Asn Thr Asn Phe Lys Asn Lys Val
 1 5 10 15

gac tcc tca gac atc gac aca gac tct tgg cca gct ccc caa agg aag 96
 Asp Ser Ser Asp Ile Asp Thr Asp Ser Trp Pro Ala Pro Gln Arg Lys
 20 25 30

aac acg tct cag aaa agt tgt cac aaa ttc tct aag gtc ctc ttt acc 144
 Asn Thr Ser Gln Lys Ser Cys His Lys Phe Ser Lys Val Leu Phe Thr
 35 40 45

tca ctc ata atc tat ttc ctg ctg ttg aca atc tta ttc tcc ggt gct 192
 Ser Leu Ile Ile Tyr Phe Leu Leu Thr Thr Ile Leu Phe Ser Gly Ala
 50 55 60

ctg atc aac aaa gtc tgg agc tgt tgc cca aag gat tgg aag ccg ttt 240
 Leu Ile Asn Lys Val Trp Ser Cys Cys Pro Lys Asp Trp Lys Pro Phe
 65 70 75 80

ggt tcc tac tgc tac ttc act tca act gac ttg gtg gca tct tgg aat 288
 Gly Ser Tyr Cys Tyr Phe Thr Ser Thr Asp Leu Val Ala Ser Trp Asn
 85 90 95

gag agt aag gag aac tgc ttc cac atg ggt gct cat ctg gtg gtg atc 336
 Glu Ser Lys Glu Asn Cys Phe His Met Gly Ala His Leu Val Val Ile
 100 105 110

cac agc cag gaa gaa cag gat ttc atc act ggg atc ctg gac act ggt 384
 His Ser Gln Glu Glu Gln Asp Phe Ile Thr Gly Ile Leu Asp Thr Gly
 115 120 125

act gct tat ttt ata gga ctt tca aat cca ggt gat caa caa tgg caa 432
 Thr Ala Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Asn Pro Gly Asp Gln Gln Trp Gln
 130 135 140

tgg att gat cag aca ccg tac gat gat aat acc aca ttc tgg cac aaa 480
 Trp Ile Asp Gln Thr Pro Tyr Asp Asp Asn Thr Thr Phe Trp His Lys
 145 150 155 160

ggt gag cct agc agt gac aat gaa cag tgt gtt ata ata aat cat cgt 528
 Gly Glu Pro Ser Ser Asp Asn Glu Gln Cys Val Ile Ile Asn His Arg
 165 170 175

cag agt act gga tgg ggc tgg agt gat atc cct tgc agt gat aaa cag 576
 Gln Ser Thr Gly Trp Gly Trp Ser Asp Ile Pro Cys Ser Asp Lys Gln
 180 185 190

aac tca att tgc cat gtg aaa aaa ata tac tta tga 612
 Asn Ser Ile Cys His Val Lys Lys Ile Tyr Leu
 195 200

<210> 10

<211> 203

<212> PRT

<213> Mus sp.

WO 03/031578

PCT/US02/31996

<400> 10

Met Phe Ser Glu Asn Ile Tyr Val Asn Thr Asn Phe Lys Asn Lys Val
 1 5 10 15

Asp Ser Ser Asp Ile Asp Thr Asp Ser Trp Pro Ala Pro Gln Arg Lys
 20 25 30

Asn Thr Ser Gln Lys Ser Cys His Lys Phe Ser Lys Val Leu Phe Thr
 35 40 45

Ser Leu Ile Ile Tyr Phe Leu Leu Leu Thr Ile Leu Phe Ser Gly Ala
 50 55 60

Leu Ile Asn Lys Val Trp Ser Cys Cys Pro Lys Asp Trp Lys Pro Phe
 65 70 75 80

Gly Ser Tyr Cys Tyr Phe Thr Ser Thr Asp Leu Val Ala Ser Trp Asn
 85 90 95

Glu Ser Lys Glu Asn Cys Phe His Met Gly Ala His Leu Val Val Ile
 100 105 110

His Ser Gln Glu Glu Gln Asp Phe Ile Thr Gly Ile Leu Asp Thr Gly
 115 120 125

Thr Ala Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Asn Pro Gly Asp Gln Gln Trp Gln
 130 135 140

Trp Ile Asp Gln Thr Pro Tyr Asp Asp Asn Thr Thr Phe Trp His Lys
 145 150 155 160

Gly Glu Pro Ser Ser Asp Asn Glu Gln Cys Val Ile Ile Asn His Arg
 165 170 175

Gln Ser Thr Gly Trp Gly Trp Ser Asp Ile Pro Cys Ser Asp Lys Gln
 180 185 190

Asn Ser Ile Cys His Val Lys Lys Ile Tyr Leu
 195 200

<210> 11

<211> 711

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

WO 03/031578

PCT/US02/31996

<221> CDS
 <222> (1)..(711)
 <223>

```

<400> 11
atg gct tca gaa atc act tat gca gaa gtg agg atc acg aat gaa tcc      48
Met Ala Ser Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Val Arg Ile Thr Asn Glu Ser
1      5      10      15

gac tcc ttg gac acc tac tca aaa tgt cct gca gct ccc aga gag aaa      96
Asp Ser Leu Asp Thr Tyr Ser Lys Cys Pro Ala Ala Pro Arg Glu Lys
20     25     30

cct atc cgt gat cta aga aag cct ggt tcc ccc tca ctg ctt ctt aca     144
Pro Ile Arg Asp Leu Arg Lys Pro Gly Ser Pro Ser Leu Leu Leu Thr
35     40     45

tcc ctg atg cta ctt ctc ctg ctg ctg gca atc aca ttc tta gtt gct     192
Ser Leu Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ile Thr Phe Leu Val Ala
50     55     60

ttt atc att tat ttt caa aag tac tct caa ctt ctt gaa gaa aaa gaa     240
Phe Ile Ile Tyr Phe Gln Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Glu Lys Glu
65     70     75

gct gca aaa aat ata atg tac aag gaa ttg aac tgc ata aaa aat ggt     288
Ala Ala Lys Asn Ile Met Tyr Lys Glu Leu Asn Cys Ile Lys Asn Gly
85     90     95

tca ctc atg gaa gac aaa gtc tgg agc tgt tgc cca aag gat tgg aaa     336
Ser Leu Met Glu Asp Lys Val Trp Ser Cys Cys Pro Lys Asp Trp Lys
100    105    110

cca ttt gtt tcc cac tgc tac ttc att ttg aat gac tcg aag gca tct     384
Pro Phe Val Ser His Cys Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Ser Lys Ala Ser
115    120    125

tgg aat gag agt gag gag aag tgc tcc cac atg ggt gct cat ctg gtg     432
Trp Asn Glu Ser Glu Glu Lys Cys Ser His Met Gly Ala His Leu Val
130    135    140

gtg atc cac agc cag gca gag cag gat ttc atc acc agc aac ctg aac     480
Val Ile His Ser Gln Ala Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Asn Leu Asn
145    150    155    160

aca agt gct ggt tat ttt ata gga ctt ttg gat gct ggt caa aga caa     528
Thr Ser Ala Gly Tyr Phe Ile Gly Leu Leu Asp Ala Gly Gln Arg Gln
165    170    175

tgg cga tgg att gat cag aca cca tac aat aag agt gct acg ttc tgg     576
Trp Arg Trp Ile Asp Gln Thr Pro Tyr Asn Lys Ser Ala Thr Phe Trp
180    185    190

cac aaa ggt gag ccc aac caa gat tgg gaa cga tgt gtt ata ata aat     624
His Lys Gly Glu Pro Asn Gln Asp Trp Glu Arg Cys Val Ile Ile Asn
195    200    205

cat aaa aca act gga tgg ggc tgg aat gat atc cct tgc aaa gat gaa     672
His Lys Thr Thr Gly Trp Gly Trp Asn Asp Ile Pro Cys Lys Asp Glu
210    215    220

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

cac aat tca gtt tgt cag gtg aag aaa ata tac tta tga 711
 His Asn Ser Val Cys Gln Val Lys Lys Ile Tyr Leu
 225 230 235

<210> 12
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 12
 Met Ala Ser Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Val Arg Ile Thr Asn Glu Ser
 1 5 10 15
 Asp Ser Leu Asp Thr Tyr Ser Lys Cys Pro Ala Ala Pro Arg Glu Lys
 20 25 30
 Pro Ile Arg Asp Leu Arg Lys Pro Gly Ser Pro Ser Leu Leu Thr
 35 40 45
 Ser Leu Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ile Thr Phe Leu Val Ala
 50 55 60
 Phe Ile Ile Tyr Phe Gln Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Glu Lys Glu
 65 70 75 80
 Ala Ala Lys Asn Ile Met Tyr Lys Glu Leu Asn Cys Ile Lys Asn Gly
 85 90 95
 Ser Leu Met Glu Asp Lys Val Trp Ser Cys Cys Pro Lys Asp Trp Lys
 100 105 110
 Pro Phe Val Ser His Cys Tyr Phe Ile Leu Asn Asp Ser Lys Ala Ser
 115 120 125
 Trp Asn Glu Ser Glu Glu Lys Cys Ser His Met Gly Ala His Leu Val
 130 135 140
 Val Ile His Ser Gln Ala Glu Gln Asp Phe Ile Thr Ser Asn Leu Asn
 145 150 155 160
 Thr Ser Ala Gly Tyr Phe Ile Gly Leu Leu Asp Ala Gly Gln Arg Gln
 165 170 175
 Trp Arg Trp Ile Asp Gln Thr Pro Tyr Asn Lys Ser Ala Thr Phe Trp
 180 185 190

WO 03/031578

PCT/US02/31996

His Lys Gly Glu Pro Asn Gln Asp Trp Glu Arg Cys Val Ile Ile Asn
 195 200 205

His Lys Thr Thr Gly Trp Gly Trp Asn Asp Ile Pro Cys Lys Asp Glu
 210 215 220

His Asn Ser Val Cys Gln Val Lys Lys Ile Tyr Leu
 225 230 235

<210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 13
 agaagtgagg atcacgaatg aatccgactc 30

<210> 14
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 14
 ttcttcacct gacaaactga attgtgttca totttg 36

<210> 15
 <211> 443
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)
 <223>

<400> 15
 atg gct tca gaa atc act tat gca gaa gtg agg atc acg aat gaa tcc 48
 Met Ala Ser Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Val Arg Ile Thr Asn Glu Ser
 1 5 10 15

gac tcc ttg gac acc tac tca aaa tgt cct gca gct ccc aga gag aaa 96
 Asp Ser Leu Asp Thr Tyr Ser Lys Cys Pro Ala Ala Pro Arg Glu Lys
 20 25 30

cct atc cgt gat cta aga aag cct ggt tcc ccc tca ctg ctt ctt aca 144
 Pro Ile Arg Asp Leu Arg Lys Pro Gly Ser Pro Ser Leu Leu Leu Thr
 35 40 45

tcc ctg atg cta ctt ctc ctg ctg ctg goa atc aca ttc tta gtt gct 192

WO 03/031578

PCT/US02/31996

```

Ser Leu Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ile Thr Phe Leu Val Ala
50          55          60

ttt atc att tat ttt caa aag tac tct caa ctt ctt gaa gaa aaa gaa    240
Phe Ile Ile Tyr Phe Gln Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Glu Lys Glu
65          70          75          80

gct gca aaa aat ata atg tac aag gaa ttg aac tgc ata aaa aat ggt    288
Ala Ala Lys Asn Ile Met Tyr Lys Glu Leu Asn Cys Ile Lys Asn Gly
85          90          95

tca ctc atg gaa ggt tct ggc aca aag gtg agc cca acc aag att ggg    336
Ser Leu Met Glu Gly Ser Gly Thr Lys Val Ser Pro Thr Lys Ile Gly
100         105         110

aac gat gtg tta taataaatca taacaacaact ggaatgggct ggaatgatat    388
Asn Asp Val Leu
115

cccttgcaaa gatgaacaca attcagtttg tcaggtgaag aaaatatact tatga    443

<210> 16
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 16

Met Ala Ser Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Val Arg Ile Thr Asn Glu Ser
1          5          10          15

Asp Ser Leu Asp Thr Tyr Ser Lys Cys Pro Ala Ala Pro Arg Glu Lys
20         25         30

Pro Ile Arg Asp Leu Arg Lys Pro Gly Ser Pro Ser Leu Leu Leu Thr
35         40         45

Ser Leu Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ile Thr Phe Leu Val Ala
50          55          60

Phe Ile Ile Tyr Phe Gln Lys Tyr Ser Gln Leu Leu Glu Glu Lys Glu
65          70          75          80

Ala Ala Lys Asn Ile Met Tyr Lys Glu Leu Asn Cys Ile Lys Asn Gly
85          90          95

Ser Leu Met Glu Gly Ser Gly Thr Lys Val Ser Pro Thr Lys Ile Gly
100         105         110

Asn Asp Val Leu
115

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

<210> 17
 <211> 627
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(627)
 <223>

```

<400> 17
atg atg cag gaa aga cca gcc caa ggg cag gta gtc tgc tgg tcc ctg      48
Met Met Gln Glu Arg Pro Ala Gln Gly Gln Val Val Cys Trp Ser Leu
1      5      10      15

aga ctc tgg atg gct gct ctg att tcc atc tta ctc ctc agc acc tgt      96
Arg Leu Trp Met Ala Ala Leu Ile Ser Ile Leu Leu Leu Ser Thr Cys
20     25     30

ttc att gcg agt tgt gta gtg act tac cag ctt atg atg aac aag ccc     144
Phe Ile Ala Ser Cys Val Val Thr Tyr Gln Leu Met Met Asn Lys Pro
35     40     45

aat aga aga cta tct gaa ctc cac aca tac cat tcc aat ctc atc tgc     192
Asn Arg Arg Leu Ser Glu Leu His Thr Tyr His Ser Asn Leu Ile Cys
50     55     60

ttt agt gaa gga act acg gta tca gaa aag gtc tgg agc tgt tgc cca     240
Phe Ser Glu Gly Thr Thr Val Ser Glu Lys Val Trp Ser Cys Cys Pro
65     70     75     80

aag gat tgg aag cca ttt ggt tcc tac tgc tac ttc act tca act gac     288
Lys Asp Trp Lys Pro Phe Gly Ser Tyr Cys Tyr Phe Thr Ser Thr Asp
85     90     95

tct cgg gca tcc cag aat aag agt gag gag aag tgc tct ctc agg ggt     336
Ser Arg Ala Ser Gln Asn Lys Ser Glu Glu Lys Cys Ser Leu Arg Gly
100    105    110

gct cat ctg gtg gtg atc cac agc cag gaa gag cag gat ttc atc acc     384
Ala His Leu Val Val Ile His Ser Gln Glu Glu Gln Asp Phe Ile Thr
115    120    125

aga atg cta gac act gct gct ggt tat ttt att gga ctt tca gat gtt     432
Arg Met Leu Asp Thr Ala Ala Gly Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Asp Val
130    135    140

ggg aat agt caa tgg cga tgg att gat cag aca cca tac aat gat aga     480
Gly Asn Ser Gln Trp Arg Trp Ile Asp Gln Thr Pro Tyr Asn Asp Arg
145    150    155    160

gcc aca ttc tgg cac aaa ggt gag ccc aac aat gac tat gaa aaa tgt     528
Ala Thr Phe Trp His Lys Gly Glu Pro Asn Asn Asp Tyr Glu Lys Cys
165    170    175

gtt ata tta aat tat cgg aaa act atg tgg ggc tgg aat gat att gac     576
Val Ile Leu Asn Tyr Arg Lys Thr Met Trp Gly Trp Asn Asp Ile Asp
180    185    190

tgc agt gat gaa gag aac tca gtt tgt cag atg aag aaa ata tac tta     624

```

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Cys Ser Asp Glu Glu Asn Ser Val Cys Gln Met Lys Lys Ile Tyr Leu
 195 200 205

tga

627

<210> 18
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 18

Met Met Gln Glu Arg Pro Ala Gln Gly Gln Val Val Cys Trp Ser Leu
 1 5 10 15

Arg Leu Trp Met Ala Ala Leu Ile Ser Ile Leu Leu Leu Ser Thr Cys
 20 25 30

Phe Ile Ala Ser Cys Val Val Thr Tyr Gln Leu Met Met Asn Lys Pro
 35 40 45

Asn Arg Arg Leu Ser Glu Leu His Thr Tyr His Ser Asn Leu Ile Cys
 50 55 60

Phe Ser Glu Gly Thr Thr Val Ser Glu Lys Val Trp Ser Cys Cys Pro
 65 70 75 80

Lys Asp Trp Lys Pro Phe Gly Ser Tyr Cys Tyr Phe Thr Ser Thr Asp
 85 90 95

Ser Arg Ala Ser Gln Asn Lys Ser Glu Glu Lys Cys Ser Leu Arg Gly
 100 105 110

Ala His Leu Val Val Ile His Ser Gln Glu Glu Gln Asp Phe Ile Thr
 115 120 125

Arg Met Leu Asp Thr Ala Ala Gly Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Asp Val
 130 135 140

Gly Asn Ser Gln Trp Arg Trp Ile Asp Gln Thr Pro Tyr Asn Asp Arg
 145 150 155 160

Ala Thr Phe Trp His Lys Gly Glu Pro Asn Asn Asp Tyr Glu Lys Cys
 165 170 175

Val Ile Leu Asn Tyr Arg Lys Thr Met Trp Gly Trp Asn Asp Ile Asp
 180 185 190

WO 03/031578

PCT/US02/31996

Cys Ser Asp Glu Glu Asn Ser Val Cys Gln Met Lys Lys Ile Tyr Leu
 195 200 205

<210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 19
 tgagactctg gatggctgct ctga 24

<210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 20
 ttcttcctct gacaaactga gtcc 24

<210> 21
 <211> 472
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(285)
 <223>

<400> 21
 atg atg cag gaa aga cca gcc caa ggg cag gta gtc tgc tgg tcc ctg 48
 Met Met Gln Glu Arg Pro Ala Gln Gly Gln Val Val Cys Trp Ser Leu
 1 5 10 15
 aga ctc tgg atg gct gct ctg att tcc atc tta ctc ctc agc acc tgt 96
 Arg Leu Trp Met Ala Ala Leu Ile Ser Ile Leu Leu Leu Ser Thr Cys
 20 25 30
 ttc att ggc agt tgt gta gtg act tac cag ctt atg atg aac aag ccc 144
 Phe Ile Ala Ser Cys Val Val Thr Tyr Gln Leu Met Met Asn Lys Pro
 35 40 45
 aat aga aga cta tct gaa ctc cac aca tac cat tcc aat ctc atc tgc 192
 Asn Arg Arg Leu Ser Glu Leu His Thr Tyr His Ser Asn Leu Ile Cys
 50 55 60
 ttt agt gaa gga act acg gta tca gga ttt cat cac cag aat gct aga 240
 Phe Ser Glu Gly Thr Thr Val Ser Gly Phe His His Gln Asn Ala Arg
 65 70 75 80
 cac tgc tgc tgg tta ttt tat tgg act ttc aga tgt tgg gaa tag 285

WO 03/031578

PCT/US02/31996

His Cys Cys Trp Leu Phe Tyr Trp Thr Phe Arg Cys Trp Glu
 85 90
 tcaatggcga tggattgac agacaccata caatgataga gccacattct ggcacaaagg 345
 tgagcccaac aatgactatg aaaaatgtgt tatattaaat tatcggaata ctatgtgggg 405
 ctggaatgat attgactgca gtgatgaaga gaactcagtt tgtcagatga agaaaatata 465
 cttatga 472

 <210> 22
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

 <400> 22
 Met Met Gln Glu Arg Pro Ala Gln Gly Gln Val Val Cys Trp Ser Leu
 1 5 10 15
 Arg Leu Trp Met Ala Ala Leu Ile Ser Ile Leu Leu Leu Ser Thr Cys
 20 25 30
 Phe Ile Ala Ser Cys Val Val Thr Tyr Gln Leu Met Met Asn Lys Pro
 35 40 45
 Asn Arg Arg Leu Ser Glu Leu His Thr Tyr His Ser Asn Leu Ile Cys
 50 55 60
 Phe Ser Glu Gly Thr Thr Val Ser Gly Phe His His Gln Asn Ala Arg
 65 70 75 80
 His Cys Cys Trp Leu Phe Tyr Trp Thr Phe Arg Cys Trp Glu
 85 90

 <210> 23
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(648)
 <223>

 <400> 23
 atg ggg cta gaa aaa cct caa agt aaa ctg gaa gga ggc atg cat ccc 48
 Met Gly Leu Glu Lys Pro Gln Ser Lys Leu Glu Gly Gly Met His Pro
 1 5 10 15
 cag ctg ata cct tcc gtt att gct gta gtt ttc atc tta ctt ctc agt 96
 Gln Leu Ile Pro Ser Val Ile Ala Val Val Phe Ile Leu Leu Leu Ser

WO 03/031578	PCT/US02/31996
20	25 30
gtc tgt ttt att gca agt tgt ttg gtg act cat cac aac ttt tca cgc 144	
Val Cys Phe Ile Ala Ser Cys Leu Val Thr His His Asn Phe Ser Arg	
35 40 45	
tgt aag aga ggc aca gga gtg cac aag tta gag cac cat gca aag ctc 192	
Cys Lys Arg Gly Thr Gly Val His Lys Leu Glu His His Ala Lys Leu	
50 55 60	
aaa tgc atc aaa gag aaa tca gaa ctg aaa agt gct gaa ggg agc acc 240	
Lys Cys Ile Lys Glu Lys Ser Glu Leu Lys Ser Ala Glu Gly Ser Thr	
65 70 75 80	
tgg aac tgt tgt cct att gac tgg aga gcc ttc cag tcc aac tgc tat 288	
Trp Asn Cys Cys Pro Ile Asp Trp Arg Ala Phe Gln Ser Asn Cys Tyr	
85 90 95	
ttt cct ctt act gac aac aag acg tgg gct gag agt gaa agg aac tgt 336	
Phe Pro Leu Thr Asp Asn Lys Thr Trp Ala Glu Ser Glu Arg Asn Cys	
100 105 110	
tca ggg atg ggg gcc cat ctg atg acc atc agc acg gaa gct gag cag 384	
Ser Gly Met Gly Ala His Leu Met Thr Ile Ser Thr Glu Ala Glu Gln	
115 120 125	
aac ttt att att cag ttt ctg gat aga cgg ctt tcc tat ttc ctt gga 432	
Asn Phe Ile Ile Gln Phe Leu Asp Arg Arg Leu Ser Tyr Phe Leu Gly	
130 135 140	
ctt aga gat gag aat gcc aaa ggt cag tgg cgt tgg gtg gac cag acg 480	
Leu Arg Asp Glu Asn Ala Lys Gly Gln Trp Arg Trp Val Asp Gln Thr	
145 150 155 160	
cca ttt aac cca cgc aga gta ttc tgg cat aag aat gaa ccc gac aac 528	
Pro Phe Asn Pro Arg Arg Val Phe Trp His Lys Asn Glu Pro Asp Asn	
165 170 175	
tct cag gga gaa aac tgt gtt gtt ctt gtt tat aac caa gat aaa tgg 576	
Ser Gln Gly Glu Asn Cys Val Val Leu Val Tyr Asn Gln Asp Lys Trp	
180 185 190	
gcc tgg aat gat gtt cct tgt aac ttt gaa gca agt agg att tgt aaa 624	
Ala Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Phe Glu Ala Ser Arg Ile Cys Lys	
195 200 205	
ata cct gga aca aca ttg aac tag 648	
Ile Pro Gly Thr Thr Leu Asn	
210 215	
<210> 24	
<211> 215	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
Met Gly Leu Glu Lys Pro Gln Ser Lys Leu Glu Gly Gly Met His Pro	
1 5 10 15	

WO 03/031578

PCT/US02/31996

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

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide

WO 03/031578

PCT/US02/31996

<400> 25
tctgttttat tgcaagttgt ttgg

24

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 26
ttccaggccc atttatcttg gt

22

【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
17 April 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/031578 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 1/00. G01N 33/53, C12P 21/06
- (21) International Application Number: PCT/US02/31996
- (22) International Filing Date: 4 October 2002 (04.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/328,026 9 October 2001 (09.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNEX CORPORATION [US/US]; Law Department, 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): BUTZ, Eric, A. [US/US]; 1222 NE 105th Place, Seattle, WA 98125 (US). ANDERSON, Dirk, M. [US/US]; 3616 NW 64th Street, Seattle, WA 98107 (US).
- (74) Agent: KLANIECKI, James, E.; Law Department, 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 27 November 2003

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 03/031578 A3

(54) Title: MAMMALIAN C-TYPE LECTINS

(57) Abstract: The present invention provides novel mammalian C-type lectin polypeptides associated with antigen presenting cells. Designated as Dendritic Cell C-type Lectins (DCL), the following four novel genes have been discovered: DCL 1, DCL 2, DCL 3 and DCL 4, as well as splice variants svDCL 2, svDCL 3 and svDCL 4, and a human homologue herein designated DCL 5. The present invention provides polynucleotides encoding DCL polypeptides, recombinant expression vectors, host cells transfected with the recombinant expression vectors, methods of producing and isolating the inventive polypeptides and various screening assays. Therapeutic compositions and methods of treating various diseases are also provided.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/31996										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 1/00; G01N 33/53; C12P 21/06 US CL : 530/350; 435/7.1, 69.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350, 435/7.1, 69.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) West, Dialgon, Geneseq, GenEmbl, PIR 73, SwissProt 40, SPTREMBL 21, EST												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X ---	Database GenBank Accession No. BQ715169, National Institute of Health, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. STRAUSBERG, R. 'Mammalian Gene Collection, Mus musculus cDNA clone', 1999.	1 10, 12										
X ---	KAWAI, J. et al. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. Nature. 08 February 2001, Vol. 409, pages 685-690, see entire document.	7 26-28 and 33-35										
X	WO 99/02562 A1 (SCHERING CORPORATION) 21 January 1999, SEQ ID NO: 8 (amino acids 138-162).	17, 26-28, 33-35										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&" document number of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document number of the same patent family	"O" document referring 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	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document number of the same patent family											
"O" document referring 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												
Date of the actual completion of the international search 22 April 2003 (22.04.2003)		Date of mailing of the international search report 28 APR 2003										
Name and mailing address of the ISA/IUS Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized Signatory L. Marie Mayes Telephone No. 703-308-0196										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/31996
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	☒	Claim Nos.: 36-44 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☒	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 10, 12, 17, 26-28 and 33-35
Remark on Protest		☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31996

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1, 10, 12, 17, 26-28 and 33-35, drawn to a polypeptide, a method of making and using polypeptide and an apparatus for making or using a polypeptide.

Group II, claim(s) 2-9 and 18-25, drawn to a polynucleotide, vectors and transforming host cells.

Group III, claim(s) 13-16 and 29-32, drawn to an antibody.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The nucleotides in group II lack the peptides found, made and used in group I. Further, the peptides of group I may be used for different uses, namely, in assays while the nucleotides may be used in a vector to introduce a nucleic acid sequence, for example.

Groups I and III lack a common special technical feature because the antibodies of group III lack the peptides of Group I. Further, the antibodies could be used to bind to antigens or in vaccines to treat or prevent disease while the peptides in group I could be used in assays.

The nucleotides of group II lack unity of invention with the antibodies of group III because the nucleotides may be used to encode proteins or as vectors to introduce a nucleic acid sequence into a cell while the antibodies may be used to bind to proteins or may be used in vaccines.

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 37/02	A 6 1 P 37/02	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
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 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N,O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100092886

弁理士 村上 清

(72)発明者 バッツ, エリック・エイ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 2 5, シアトル, ノースイースト・ワンハンドレッドアンドフ
ィフス・プレース 1 2 2 2

(72)発明者 アンダーソン, ダーク・エム

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 0 7, シアトル, ノースウエスト・シックスティフォース・ス
トリート 3 6 1 6

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 GA11 HA20
4B064 AG27 AG28 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 BD14 CA24 CA25 CA44 CA46
4C085 AA03 AA38 BA01 BB01 BB16 DD62 DD86 EE01 EE06 FF13
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA80 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	哺乳动物C型凝集素		
公开(公告)号	JP2005505285A	公开(公告)日	2005-02-24
申请号	JP2003534549	申请日	2002-10-04
[标]申请(专利权)人(译)	CORP Immunex公司 株式会社Immunex公司		
申请(专利权)人(译)	NEX了Immunex公司		
[标]发明人	バツエリックエイ アンダーソンダークエム		
发明人	バツ,エリック・エイ アンダーソン,ダーク・エム		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/4726		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/39 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B C12N5/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA20 4B064/AG27 4B064/AG28 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BA01 4C085/BB01 4C085/BB16 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA80 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 村上 清		
优先权	60/328026 2001-10-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了与抗原呈递细胞相关的新型哺乳动物C型凝集素多肽。被指定为树突状细胞C型凝集素 (DCL) , 发现了以下四个新基因 : DCL 1 , DCL 2 , DCL 3和DCL 4 , 以及剪接变体svDCL 2 , svDCL 3和svDCL 4 , 以及一个人类 本发明提供了编码DCL 5的多核苷酸, 本发明提供了编码DCL多肽的多核苷酸, 重组表达载体, 用重组表达载体转染的宿主细胞, 产生和分离本发明多肽的方法以及各种筛选试验。 还提供了治疗组合物和治疗各种疾病的方法。

元来の残基	典型的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile