

(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2010-536388

(P2010-536388A)

(43) 公表日 平成22年12月2日(2010.12.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B 0 3 0
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-522134 (P2010-522134)	(71) 出願人	505098650
(86) (22) 出願日	平成20年8月29日 (2008. 8. 29)		ザ ウォルター アンド エリザ ホール
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月13日 (2010. 4. 13)		インスティテュート オブ メディカル
(86) 国際出願番号	PCT/AU2008/001294		リサーチ
(87) 国際公開番号	W02009/026660		オーストラリア国 ビクトリア州 パーク
(87) 国際公開日	平成21年3月5日 (2009. 3. 5)		ビル ロイヤル パレード 1 ジー
(31) 優先権主張番号	60/969, 118	(71) 出願人	510050203
(32) 優先日	平成19年8月30日 (2007. 8. 30)		ザ バーネット インスティテュート
(33) 優先権主張国	米国 (US)		オーストラリア国 プラーン シーエヌア
(31) 優先権主張番号	61/052, 865		ール パント アンド コマーシャル ロ
(32) 優先日	平成20年5月13日 (2008. 5. 13)		ード
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 樹状細胞マーカーおよびその使用法

## (57) 【要約】

本発明は、樹状細胞またはその前駆体、特に抗原を提示している樹状細胞の細胞表面に位置するタンパク質の同定に関する。特に、本発明は、これらのタンパク質と結合する抗体などの化合物に関する。これらの化合物は、樹状細胞またはその前駆体のサブセットを検出および/または濃縮するために用いることができる。これらの化合物はまた、抗原に対する体液性および/もしくはT細胞媒介性免疫応答を調節する目的で樹状細胞もしくはその前駆体に対して抗原をターゲティングさせるために用いること、または罹患状態に関与する樹状細胞もしくはその前駆体に対して細胞傷害性物質をターゲティングさせるために用いることができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

- i) SEQ ID NO : 1 ~ 8 のいずれか 1 つに提示されたアミノ酸配列 ;
- ii) SEQ ID NO : 1 ~ 8 のいずれか 1 つもしくは複数に対して少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列 ; ならびに / または
- iii) i) もしくは ii) の生物活性断片および / または抗原性断片を含むポリペプチドと結合する、化合物。

**【請求項 2】**

SEQ ID NO : 1 ~ 8 のいずれか 1 つまたは複数に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合する、請求項 1 記載の化合物。

10

**【請求項 3】**

ポリペプチドである、請求項 1 または請求項 2 記載の化合物。

**【請求項 4】**

抗体またはその抗原結合性断片である、請求項 3 記載の化合物。

**【請求項 5】**

前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体 ( triabody ) または四重特異性抗体 ( tetrabody ) である、請求項 4 記載の化合物。

**【請求項 6】**

前記抗体またはその抗原結合性断片が、SEQ ID NO : 44 ~ 46 または 49 ~ 51 のいずれか 1 つに対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの相補性決定領域 ( CDR ) を含む、請求項 4 または請求項 5 記載の化合物。

20

**【請求項 7】**

前記抗体またはその抗原結合性断片が、3 つの CDR を含む免疫グロブリン重鎖またはその断片を含み、

- i) CDR1 が SEQ ID NO : 44 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含み、
  - ii) CDR2 が SEQ ID NO : 45 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含み、かつ
  - iii) CDR3 が SEQ ID NO : 46 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む、
- 請求項 4 ~ 6 のいずれか一項記載の化合物。

**【請求項 8】**

前記抗体またはその抗原結合性断片が、3 つの CDR を含む免疫グロブリン軽鎖またはその断片を含み、かつ

30

- i) CDR1 が SEQ ID NO : 49 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含み、
  - ii) CDR2 が SEQ ID NO : 50 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含み、かつ
  - iii) CDR3 が SEQ ID NO : 51 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む、
- 請求項 4 ~ 7 のいずれか一項記載の化合物。

**【請求項 9】**

前記抗体またはその抗原結合性断片が、

- i) SEQ ID NO : 43 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン重鎖もしくはその断片、および / または

ii) SEQ ID NO : 48 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン軽鎖もしくはその断片を含む、請求項 4 ~ 8 のいずれか一項記載の化合物。

40

**【請求項 10】**

前記抗体またはその抗原結合性断片が、

- i) SEQ ID NO : 42 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖もしくはその断片、および / または

ii) SEQ ID NO : 47 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖またはその断片を含む、請求項 4 ~ 9 のいずれか一項記載の化合物。

**【請求項 11】**

50

前記抗体が、24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4もしくは23/05-4C6であるか、または24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4もしくは23/05-4C6の少なくとも1つの相補性決定領域を含む抗体である、請求項4または請求項5記載の化合物。

【請求項 1 2】

ポリペプチドの可溶性断片が、

i) SEQ ID NO: 1~8および58~61のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

ii) SEQ ID NO: 1~8および58~61のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含み、SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つの少なくとも約40個のN末端残基を含まない、ポリペプチドの可溶性断片である請求項3記載の化合物。

10

【請求項 1 3】

ポリペプチドに結合する抗体と競合して、該ポリペプチドと結合する化合物であって、SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記抗体が24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4および/または23/05-4C6である、請求項13記載の化合物。

【請求項 1 5】

治療物質と結合された、請求項1~14のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 1 6】

前記治療物質が抗原である、請求項15記載の化合物。

20

【請求項 1 7】

前記抗原が、癌抗原、自己抗原、アレルゲン、ならびに/または病原性および/もしくはは感染性生物由来の抗原である、請求項16記載の化合物。

【請求項 1 8】

病原性および/または感染性生物が、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) または三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) である、請求項17記載の化合物。

【請求項 1 9】

前記治療物質が細胞傷害性物質である、請求項15記載の化合物。

【請求項 2 0】

前記治療物質が薬物および/または薬理学的物質である、請求項15記載の化合物。

30

【請求項 2 1】

検出可能な程度に標識されている、請求項1~20のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 2 2】

請求項4記載の抗体を産生することができる、安定した抗体産生性の細胞株。

【請求項 2 3】

European Collection of Cell Cultures (ECACC) に2008年4月29日に寄託参照番号08042901の下で寄託された24/04-10B4、European Collection of Cell Cultures (ECACC) に2008年4月29日に寄託参照番号08041902の下で寄託された42/04-42D2、European Collection of Cell Cultures (ECACC) に2008年4月29日に寄託参照番号08042903の下で寄託された20/05-3A4、またはEuropean Collection of Cell Cultures (ECACC) に2008年4月29日に寄託参照番号08042904の下で寄託された23/05-4C6である、請求項22記載の細胞株。

40

【請求項 2 4】

請求項1~21のいずれか一項記載の化合物および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 2 5】

アジュバントをさらに含む、請求項24記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記化合物が、リボソーム中に封入されているか、またはその表面に露出されている、請求項24または請求項25記載の組成物。

【請求項 2 7】

50

請求項1～21のいずれか一項記載の化合物および／または請求項24～26のいずれか一項記載の組成物を対象に投与する段階を含む、対象における免疫応答を調節する方法。

【請求項28】

抗原に対する免疫応答が誘導および／または強化される、請求項27記載の方法。

【請求項29】

対象に請求項16～18のいずれか一項記載の化合物が投与される、請求項28記載の方法。

【請求項30】

自己抗原またはアレルゲンに対する免疫応答が低下する、請求項27記載の方法。

【請求項31】

樹状細胞またはその前駆体を、請求項1～21のいずれか一項記載の化合物および／または請求項24～26のいずれか一項記載の組成物に、インビトロで曝露させる段階、ならびに該細胞を対象に投与する段階を含む、対象における抗原に対する免疫応答を調節する方法。

【請求項32】

前記細胞が対象から単離されている、請求項31記載の方法。

【請求項33】

体液性および／またはT細胞媒介性応答を調節する段階を含む、請求項27～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

ナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞の活性化および／またはナイーブCD4<sup>+</sup> T細胞の活性化を調節する段階を含む、請求項33記載の方法。

【請求項35】

請求項1～21のいずれか一項記載の化合物および／または請求項24～26のいずれか一項記載の組成物を対象に投与する段階を含む、樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防する方法。

【請求項36】

請求項19または請求項20記載の化合物を投与する段階を含む、請求項35記載の方法。

【請求項37】

単離されたポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドをコードする構築物が、対象の細胞内に存在する場合に、

i) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

ii) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドの細胞内での活性のレベルを、該ポリヌクレオチドを欠く細胞と比較した際に調節する、

対象に単離された該ポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドをコードする構築物を投与する段階

を含む、樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防する方法。

【請求項38】

前記ポリヌクレオチドが前記細胞内でのポリペプチドの活性のレベルを下方制御し、かつ

該ポリヌクレオチドが、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNAおよび二本鎖RNAから選択される、請求項37記載の方法。

【請求項39】

樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患が、癌、感染症、自己免疫疾患またはアレルギーである、請求項35～38のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 40】

自己免疫疾患がエリテマトーデスである、請求項39記載の方法。

## 【請求項 41】

感染症がプラズモジウム属 (Plasmodium sp.) 感染症である、請求項39記載の方法。

## 【請求項 42】

対象における免疫応答を調節するための医薬の製造のための、請求項1～21のいずれか一項記載の化合物、および / または請求項24～26のいずれか一項記載の組成物の使用。

## 【請求項 43】

対象における抗原に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、請求項1～21のいずれか一項記載の化合物および / または請求項24～26のいずれか一項記載の組成物にインビトロで曝露された、樹状細胞またはその前駆体の使用。 10

## 【請求項 44】

対象における樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および / または予防するための医薬の製造のための、請求項1～21のいずれか一項記載の化合物および / または請求項24～26のいずれか一項記載の組成物の使用。

## 【請求項 45】

i) 樹状細胞またはその前駆体を含む試料を、請求項1～18、20または21のいずれか一項記載の化合物と接触させる段階、

ii) 該化合物と結合した細胞を単離する段階

を含む、樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を試料から濃縮 (enrich) する方法。 20

## 【請求項 46】

i) 検出可能な程度に標識された第1のポリヌクレオチドであって、

a) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列; および / または

b) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50% 同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、第1のポリヌクレオチドと、

樹状細胞またはその前駆体を含む試料を接触させる段階、ならびに

ii) 検出可能な程度に標識された該細胞を単離する段階 30

を含む、樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を試料から濃縮する方法。

## 【請求項 47】

段階ii) から得られた前記細胞が対象に投与される、請求項45または請求項46記載の方法。

## 【請求項 48】

前記細胞が、癌、感染症、自己免疫疾患またはアレルギーから選択される疾患を治療および / または予防するために投与される、請求項47記載の方法。

## 【請求項 49】

i) 樹状細胞またはその前駆体を含む試料を、請求項1～18、20または21のいずれか一項記載の化合物と接触させる段階、 40

ii) 該化合物と結合した細胞を検出する段階

を含む、試料中の樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法。

## 【請求項 50】

i) 検出可能な程度に標識された第1のポリヌクレオチドであって、

a) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列; および / または

b) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50% 同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、第1のポリヌクレオチドと、

樹状細胞またはその前駆体を含む試料を接触させる段階、ならびに 50

ii) 検出可能な程度に標識された該細胞を検出する段階を含む、試料中の樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法。

【請求項 5 1】

i) 対象に対して、請求項1～18、20または21のいずれか一項記載の化合物を投与する段階、

ii) 該化合物と結合した細胞を検出する段階

を含む、対象における樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法。

【請求項 5 2】

前記化合物が検出可能な程度に標識されている、請求項49または請求項51記載の方法。

【請求項 5 3】

i) 検出可能な程度に標識された第1のポリヌクレオチドであって、

a) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および / または

b) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、第1のポリヌクレオチドを、

対象に対して投与する段階、ならびに

ii) 検出可能な程度に標識された細胞を検出する段階

を含む、対象における樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法。

【請求項 5 4】

前記樹状細胞が、以下のマーカー、CD8、CD24、Nec1-2、CD11c、HLADRおよびBDCA3のうち1つまたは複数を発現する、請求項45～53のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 5】

i) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；ならびに / または

iii) i) もしくは ii) の生物活性断片および / または抗原性断片

を含む、実質的に精製されたポリペプチドならびに / または組換えポリペプチド。

【請求項 5 6】

樹状細胞またはその前駆体のマーカーである、請求項55記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つまたは複数に対して少なくとも90%同一なアミノ酸を含む、請求項55または請求項56記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

少なくとも1つのC型レクチン様ドメインを含む、請求項55～57のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 5 9】

膜貫通ドメインを欠く、請求項55～58のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 6 0】

生物活性断片および / または抗原性断片が、

i) SEQ ID NO: 58～61のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

ii) SEQ ID NO: 58～61のいずれか1つまたは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含む可溶性断片であり、

該可溶性断片が、SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つの少なくとも約40個のN末端残基を含まず、かつ

該可溶性断片が、SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合することができる、

請求項55～59のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項 6 1】

10

20

30

40

50

膜貫通ドメインを含む、請求項55～58のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項62】

少なくとも1つの他のポリペプチドと融合されている、請求項55～61のいずれか一項記載のポリペプチド。

【請求項63】

i) SEQ ID NO: 9～16のいずれか1つに提示されたヌクレオチド配列、

ii) SEQ ID NO: 9～16のいずれか1つまたは複数に対して少なくとも50%同一なヌクレオチド配列、

iii) 請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

iv) 請求項3～21のいずれか一項記載の化合物をコードするヌクレオチド配列、および/または

v) i)～iv) もしくはそれらの相補物のうちいずれか1つもしくは複数にハイブリダイズする配列ヌクレオチド

を含む、単離されたポリヌクレオチドおよび/または外因性ポリヌクレオチド。

【請求項64】

SEQ ID NO: 9～16のいずれか1つまたは複数に対して少なくとも90%同一なヌクレオチド配列を含む、請求項63記載のポリヌクレオチド。

【請求項65】

SEQ ID NO: 9～16のいずれか1つまたは複数にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、請求項63記載のポリヌクレオチド。

【請求項66】

細胞内でのポリヌクレオチドの発現を導くことができるプロモーターと機能的に連結されている、請求項63～65のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項67】

ポリヌクレオチドが、対象の細胞内に存在する場合に、細胞内での請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドの活性のレベルを、該ポリヌクレオチドを欠く細胞と比較した際に調節する、

単離されたポリヌクレオチド。

【請求項68】

動物の細胞内での前記ポリヌクレオチドの発現を導くことができるプロモーターと機能的に連結されている、請求項67記載のポリヌクレオチド。

【請求項69】

前記ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを下方制御する、請求項67または請求項68記載のポリヌクレオチド。

【請求項70】

アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNAおよび二本鎖RNA(dsRNA)から選択される、請求項67～69のいずれか一項記載のポリヌクレオチド。

【請求項71】

アンチセンスポリヌクレオチドが、生理的条件下でSEQ ID NO: 9～16に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズする、  
アンチセンスポリヌクレオチドである請求項70記載のポリヌクレオチド。

【請求項72】

触媒性ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO: 9～16に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチドを切断することができる、  
触媒性ポリヌクレオチドである請求項70記載のポリヌクレオチド。

【請求項73】

dsRNA分子が、SEQ ID NO: 9～16に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは

10

20

30

40

50

複数のうち少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含み、  
該オリゴヌクレオチドのTがUで置き換えられ、

二本鎖である該分子の部分が、少なくとも19塩基対の長さであり、かつ該オリゴヌクレオチドを含む、

dsRNA分子である請求項70記載のポリヌクレオチド。

【請求項74】

二本鎖部分の鎖が一本鎖部分によって連結されている、単一のプロモーターから発現される請求項73記載のポリヌクレオチド。

【請求項75】

請求項63～74のいずれか一項記載の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、ベクター。 10

【請求項76】

発現ベクターである、請求項75記載のベクター。

【請求項77】

請求項63～74のいずれか一項記載の少なくとも1つのポリヌクレオチドおよび/または請求項75もしくは請求項76記載の少なくとも1つのベクターを含む、宿主細胞。

【請求項78】

細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞または植物細胞である、請求項77記載の宿主細胞。

【請求項79】 20

請求項63～74のいずれか一項記載の外因性ポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック植物。

【請求項80】

ポリヌクレオチドが請求項16～18のいずれか一項記載の化合物をコードする、請求項79記載のトランスジェニック植物。

【請求項81】

請求項63～74のいずれか一項記載の外因性ポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項82】

抽出物が、請求項1～21のいずれか一項記載の化合物、請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドおよび/または請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、  
請求項77または請求項78記載の宿主細胞、請求項79または請求項80記載の植物ならび/または請求項81記載の動物の抽出物。 30

【請求項83】

請求項77または請求項78記載の宿主細胞、請求項75または請求項76記載のベクター、請求項79または請求項80記載の植物および/または請求項81記載の非ヒト動物を、化合物またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で育成(cultivate)する段階、ならびに

発現された該化合物または該ポリペプチドを回収する段階  
を含む、請求項3～21のいずれか一項記載の化合物または請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドを調製するための方法。 40

【請求項84】

請求項83記載の方法を用いて産生された化合物またはポリペプチド。

【請求項85】

請求項45～48のいずれか一項記載の方法によって得られた、樹状細胞および/またはその前駆体の濃縮された集団。

【請求項86】

i) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 1～8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ 50



酸配列；ならびに／または

iii) i) もしくはii) の生物活性断片および／または抗原性断片を含むポリペプチドを発現する、樹状細胞ならびに／またはその前駆体の濃縮された集団。

【請求項 87】

請求項85または請求項86記載の樹状細胞および／またはその前駆体の濃縮された集団を培養することによって得られた、拡大された (expanded) 樹状細胞集団および／またはその前駆体。

【請求項 88】

請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項75もしくは請求項76記載のベクター、請求項77もしくは請求項78記載の宿主細胞、請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物、請求項82記載の抽出物、および／または請求項85～87のいずれか一項記載の細胞集団、ならびに薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 89】

i) 請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドを候補化合物と接触させる段階、  
ii) 該化合物が該ポリペプチドと結合するか否かを決定する段階  
を含む、請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドと結合する分子を同定する方法。

【請求項 90】

a) 請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドを、該ポリペプチドと結合する結合パートナーおよび候補物質に曝露させる段階、ならびに  
b) 該候補物質が該ポリペプチドとの結合について該結合パートナーと競合する能力を評価する段階  
を含む、請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドと結合する分子を同定する方法。

【請求項 91】

前記結合パートナーが抗体である、請求項90記載の方法。

【請求項 92】

前記結合パートナーが検出可能な程度に標識されている、請求項90または請求項91記載の方法。

【請求項 93】

前記ポリペプチドが細胞内で発現される、請求項89～92のいずれか一項記載の方法。

【請求項 94】

ポリペプチドの結晶の構造座標を用いて、候補化合物を該ポリペプチドと結合するその能力に関してコンピュータ計算で評価する段階  
を含む、請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチドと結合する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 95】

請求項89～94のいずれか一項記載の方法を用いて同定された化合物。

【請求項 96】

請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項75もしくは請求項76記載のベクター、請求項77もしくは請求項78記載の宿主細胞、請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物、請求項82記載の抽出物、請求項85～87のいずれか一項記載の細胞集団、および／または請求項88記載の組成物を、対象に投与する段階  
を含む、対象における免疫応答を調節する方法。

【請求項 97】

請求項16～18のいずれか一項記載の化合物をコードするポリヌクレオチドを含むDNAワ

10

20

30

40

50

クチンが対象に投与され、

対象への投与後に該化合物が産生されて、前記抗原に対する免疫応答が生じる、  
請求項96記載の方法。

【請求項 9 8】

請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物またはその抽出物が対象に経口投与される、請求項96記載の方法。

【請求項 9 9】

トランスジェニック植物またはその抽出物が、請求項16～18のいずれか一項記載の化合物を含む、請求項98記載の方法。

【請求項 1 0 0】

樹状細胞またはその前駆体を、請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項75もしくは請求項76記載のベクター、請求項77もしくは請求項78記載の宿主細胞、請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物、請求項82記載の抽出物、請求項85～87のいずれか一項記載の細胞集団、および/または請求項88記載の組成物に、インビトロで曝露させる段階、ならびに該細胞を対象に投与する段階を含む、対象における抗原に対する免疫応答を調節する方法。

【請求項 1 0 1】

請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項75もしくは請求項76記載のベクター、請求項77もしくは請求項78記載の宿主細胞、請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物、請求項82記載の抽出物、請求項85～87のいずれか一項記載の細胞集団、および/または請求項88記載の組成物を対象に投与する段階を含む、樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および/または予防する方法。

【請求項 1 0 2】

対象における免疫応答を調節するための医薬の製造のための、請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項75もしくは請求項76記載のベクター、請求項77もしくは請求項78記載の宿主細胞、請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物、請求項82記載の抽出物、請求項85～87のいずれか一項記載の細胞集団、および/または請求項88記載の組成物の使用。

【請求項 1 0 3】

対象における抗原に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項75もしくは請求項76記載のベクター、請求項77もしくは請求項78記載の宿主細胞、請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物、請求項82記載の抽出物、請求項85～87のいずれか一項記載の細胞集団、および/または請求項88記載の組成物にインビトロで曝露された、樹状細胞またはその前駆体の使用。

【請求項 1 0 4】

対象における樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および/または予防するための医薬の製造のための、請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項75もしくは請求項76記載のベクター、請求項77もしくは請求項78記載の宿主細胞、請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物、請求項82記載の抽出物、請求項85～87のいずれか一項記載の細胞集団、および/または請求項88記載の組成物の使用。

【請求項 1 0 5】

請求項55～62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63～74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、または請求項75もしくは76記載のベクター、および/または請求項77もしくは78記載の宿主細胞を動物に投与する段階を含む、請求項4～10のいずれか一項記載の化合物を産生する方法。

【請求項 1 0 6】

10

20

30

40

50

前記ポリペプチドと結合する動物由来の抗体を単離する段階をさらに含む、請求項105記載の方法。

【請求項107】

前記ポリペプチドと結合する抗体を産生する動物由来の細胞を骨髄腫 (myeloma tumor) 細胞と融合させてハイブリドーマを作製する段階をさらに含む、請求項105記載の方法。

【請求項108】

請求項1~21のいずれか一項記載の化合物、請求項22もしくは請求項23記載の細胞株、請求項55~62のいずれか一項記載のポリペプチド、請求項63~74のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項75もしくは請求項76記載のベクター、請求項77もしくは請求項78記載の宿主細胞、請求項79もしくは請求項80記載のトランスジェニック植物、請求項82記載の抽出物、請求項85~87のいずれか一項記載の細胞集団、および/または請求項24~26もしくは88のいずれか一項記載の組成物を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、樹状細胞およびその前駆体、特に抗原を提示している樹状細胞の細胞表面に位置するタンパク質の同定に関する。特に、本発明は、これらのタンパク質と結合する抗体などの化合物に関する。これらの化合物は、樹状細胞またはその前駆体のサブセットを検出および/または濃縮 (enrich) するために用いることができる。これらの化合物はまた、抗原に対する体液性および/もしくはT細胞媒介性免疫応答を調節する目的で樹状細胞もしくはその前駆体に抗原をターゲティングさせるために用いること、または罹患状態に関与する樹状細胞もしくはその前駆体に細胞傷害性物質をターゲティングさせるために用いることもできる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

樹状細胞はリンパ器官、血液および末梢組織中にまばらに分布する骨髄由来細胞であり、免疫応答の開始および維持において決定的に重要である。DCは抗原 (Ag) プロセッシング、およびナイーブT細胞を活性化する能力といった共通の特性を有する。しかしながらDCは異種起源性であり、マウスでは少なくとも7種の明確に異なるサブタイプが検出されている (Shortman and Liu, 2002)。

【0003】

DCは、通常型DC (conventional DC) (cDC) および形質細胞様プレDC (plasmacytoid pre-DC) (pDC) に大きく分類することができる。pDCは高レベルのIFN を分泌することができ、活性化を受けて初めてDCとなる (O'Keeffe et al., 2002; Hochrein et al., 2001)。cDCを、末梢組織からリンパを經由してリンパ節 (LN) に遊走する古典的な「遊走性」または間質性DC (ランゲルハンス細胞など) と、このような様式では遊走せずに血行性前駆体から生じる「リンパ組織常在性」DC (脾臓、胸腺およびLNに認められる) とに分けることもできる。

【0004】

マウスのリンパ組織常在性DCはさらに、 $CD4^+8^-$  (DN)、 $CD4^+8^-$  ( $CD4^+$ ) および $CD4^+8^+$  ( $CD8^+$ ) cDCサブセットに分けることもでき、 $CD4$ およびDNは $CD8^-$  DCと総称される。加えて、感染または炎症の帰結として発生する炎症性DCもある (Shortman and Naik, 2007)。これらのDCサブタイプは多くの共通の機能を有し、これには特に、ナイーブT細胞を活性化するための抗原 (Ag) の取り込み、プロセッシングおよび提示がある。

【0005】

重要なこととして、DCはまた、サブセット特異的な役割も呈する。異なるDCサブタイプ

はToll様受容体 (TLR) を異なるパターンで発現し、その結果として、種々の感染に応答する能力がさまざまである (Proietto et al., 2004; Takdea et al., 2003)。ケモカイン産生が主としてCD8<sup>+</sup> DCによって行われる一方で、CD8<sup>+</sup> DCはTh1型T細胞応答を導くIL-12の主たる産生体 (producer) である。MHCクラスI分子を介して外因性Agを交差提示 (cross-present) する能力は、CD8<sup>+</sup> DCサブセットによって最も効率的に遂行される活性であり (Pooley et al., 2001; den Haan et al., 2000)、このためにこれらのDCはCD8<sup>+</sup> T細胞に対するウイルスAgの主たる提示体 (presenter) となっている (Belz et al., 2004; Smith et al., 2003)。対照的に、CD8<sup>+</sup> DCは、MHCクラスII拘束的な (restricted) 応答を開始させるのにより適切な装備を備えるようである (Dudziak et al., 2007; Sclnorre r et al., 2006)。

10

#### 【0006】

DCの表面上の分子は、DCの認識機能、情報交換機能および活性化機能において重要である。DCサブタイプ間で異なる分子は関心の対象となるが、これは、それらがこれらのサブタイプ間で観察される機能的な違いの基盤をなす可能性があるためである。さらに、DCサブタイプ間で異なっている表面分子は特に関心の対象となるが、これは、免疫応答を操作するために、それらがDCへのAgまたは治療物質の選択的送達のためのビーコンとなる可能性があるためである。

#### 【0007】

DC細胞表面分子に対する抗体 (Ab) は、DCにAgを送達するため、および寛容を誘導するために用いられてきた (Bonifaz et al., 2002; Finkelman et al., 1996)。ターゲティングさせたAgに対する免疫も誘導されているが、ほとんどの研究では、これは抗体-抗原複合体がDC成熟物質 (maturation agent) またはアジュバントと共投与された場合においてのみである (Bonifaz et al., 2002; Carter et al., 2006)。重要なこととして、細胞表面分子を用いてAgをターゲティングさせて免疫を生じさせる効率は、いくつかの要因に依存すると考えられる：(i) ターゲティングされるDCのサブセット；(ii) ターゲティングさせる分子の発現レベルに関する用量依存的効果；(iii) DC以外の細胞種上でのターゲティングさせた分子の発現、これはターゲティングの有効性を限定する可能性があり、またはことによるとこれらの非DCによる寄与を持ち込むことにもなりかねない；(iv) ターゲティングさせる分子の機能、これはAgプロセッシングに影響する可能性、またはDC成熟を誘導するかもしれない障害させるシグナルを送達する可能性がある；(v) ターゲ

20

30

#### 【0008】

ヒトは、マウスDCサブセットの等価物を含むと考えられる。cDCおよびpDCへの区分は、ランゲルハンス細胞の存在がそうであるように、十分に確立されている。同じ組織源 (胸腺) から抽出した場合のマウスDCとヒトDCとの間の高い類似性 (O'Keefe et al., 2003; Vandenabeele et al., 2001) は、高い類似性を示唆する。しかし、ほとんどのマウス「リンパ器官常在性」DCサブセットのヒト等価物は、種間を通じて保存された表面マーカーがないこと (すなわち、CD8マーカーはヒトDC上では発現されない) および分析用のヒトリンパ器官の試料の入手における困難さのために、不明なままである。マウスでの生物現象 (biology) のヒト臨床応用への移行のために求められるのは、マウス、ヒトおよび他の種の間で保存されているDCサブセット特異的マーカー分子の同定である。そのような表面分子は、明確に異なるDCサブタイプの特異的免疫機能を利用することにより、免疫応答の目的にあった調整 (tailoring) を行えるようにする可能性があると考えられる。

40

#### 【0009】

樹状細胞に対するワクチンなどの治療薬のターゲティングのために用いる樹状細胞マ

50

ーカーの同定が必要である。

【発明の概要】

【0010】

本発明者らは、マウスのpDC、CD8<sup>+</sup> cDC、ならびにヒトのDCサブタイプおよび樹状細胞前駆体によって優先的に発現される新規な表面C型レクチン様分子5B6を同定した。5B6分子を介したDCに対する抗原のターゲティングされた送達は、抗原に対する免疫応答を強化することが見いだされた。これはアジュバントを追加しなくても得られた。すなわち、本発明者らは、とりわけマウスCD8<sup>+</sup> DCおよびそれらのヒト対応物を同定するため、ならびに免疫応答を操作してワクチン有効性を強化する目的で抗原をDCまたはその前駆体に送達するためという双方に用いることができる新規表面マーカーを同定した。

10

【0011】

したがって、第1の局面において、本発明は、

i) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；ならび/または

iii) i) もしくは ii) の生物活性断片および/または抗原性断片を含むポリペプチドと結合する化合物を提供する。

【0012】

1つの態様において、化合物はポリペプチドである。

【0013】

1つの好ましい態様において、化合物は抗体またはその抗原結合性断片である。そのような抗体の例には、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体 (triabody) または四重特異性抗体 (tetrabody) が非限定的に含まれる。

20

【0014】

1つの態様において、抗体またはその抗原結合性断片は、SEQ ID NO: 44~46または49~51のいずれか1つに対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む少なくとも1つの相補性決定領域 (CDR) を含む。

【0015】

1つのさらなる態様において、抗体またはその抗原結合性断片は、3つのCDRを含む免疫グロブリン重鎖またはその断片を含み、

30

i) CDR1はSEQ ID NO: 44に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含み、

ii) CDR2はSEQ ID NO: 45に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含み、かつ

iii) CDR3はSEQ ID NO: 46に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む。

【0016】

もう1つの態様において、抗体またはその抗原結合性断片は、3つのCDRを含む免疫グロブリン軽鎖またはその断片を含み、

i) CDR1はSEQ ID NO: 49に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含み、

ii) CDR2はSEQ ID NO: 50に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含み、かつ

iii) CDR3はSEQ ID NO: 51に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む。

【0017】

1つのさらなる態様において、抗体またはその抗原結合性断片は、

i) SEQ ID NO: 43に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン重鎖もしくはその断片、および/または

ii) SEQ ID NO: 48に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む可変領域を含む免疫グロブリン軽鎖もしくはその断片を含む。

40

【0018】

もう1つのさらなる態様において、抗体またはその抗原結合性断片は、

i) SEQ ID NO: 42に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖もしくはその断片、および/または

50

ii) SEQ ID NO: 47に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖またはその断片を含む。

【0019】

1つの態様において、抗体は24/04-10B4（本明細書では10B4とも称される）、42/04-42D2（本明細書では42D2とも称される）、20/05-3A4（本明細書では3A4とも称される）もしくは23/05-4C6（本明細書では4C6とも称される）であるか、または24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4もしくは23/05-4C6の少なくとも1つの相補性決定領域を含む抗体である。抗体24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4および23/05-4C6は、2007年12月11日にEuropean Collection of Cell Cultures（ECACC）にそれぞれ寄託参照番号07121101、07121102、07121103および07121104の下で24/04-10B4-24-8、42/04-42D2-66-4-1、20/05-3A4-26-16、23/05-4C6-29-3として寄託されているハイブリドーマ細胞株によって産生される。これらのハイブリドーマのより抗体分泌性の高いサブクローン（24/04-10B4-24-8-FACS 9-5、42/04-42D2-66-4-1クローン4、20/05-3A4-26-16クローン5、23/05-4C6-29-3クローン5）は、2008年4月29日にECACCにそれぞれ寄託参照番号08042901、08041902、08042903および08042904の下で寄託されている。

【0020】

本発明者らはまた、5B6の可溶性断片が完全長膜結合型5B6と結合しうることも見いだした。したがって、1つの代替的な態様において、化合物は、

i) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

ii) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドの可溶性断片であり、可溶性断片はSEQ ID NO: 1~8のいずれか1つの少なくとも約40個、少なくとも約50個、少なくとも約55個または少なくとも約100個のN末端残基を含まない。

【0021】

好ましくは、可溶性断片は、

i) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

ii) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドのC型レクチン様ドメインを含む。

【0022】

1つのさらなる態様において、可溶性断片は、

i) SEQ ID NO: 58~61のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

ii) SEQ ID NO: 58~61のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

であり、可溶性断片はSEQ ID NO: 1~8のいずれか1つの少なくとも約40個のN末端残基を含まず、かつ可溶性断片はSEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合することができる。

【0023】

好ましくは、化合物はそのタンパク質と特異的に結合する。

【0024】

好ましくは、化合物は、SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つの少なくとも約40個、少なくとも約50個、少なくとも約55個または少なくとも約100個のN末端残基以外の、ポリペプチドの領域と結合する。

【0025】

もう1つの局面において、本発明は、ポリペプチドに結合する抗体と競合して、該ポリペプチドと結合する化合物を提供し、該ポリペプチドはSEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列を含む。

【0026】

10

20

30

40

50

1つの好ましい態様において、抗体は24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4および／または23/05-4C6である。

【0027】

本発明の化合物は、治療物質を、樹状細胞またはその前駆体、特に抗原を提示している樹状細胞に送達するために用いることができる。このため、1つのさらなる態様において、化合物は治療物質と結合されている。そのような物質の例には、抗原、細胞傷害性物質、薬物および／または薬理学的物質が非限定的に含まれる。

【0028】

抗原は、動物における免疫応答を誘導する任意の分子でありうる。その例には、癌抗原、自己抗原、アレルゲン、ならびに／または病原性および／もしくは感染性生物由来の抗原が非限定的に含まれる。

10

【0029】

1つの態様において、病原性および／または感染性生物由来の抗原は、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) または三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) からのものでありうるが、これらには限定されない。

【0030】

もう1つの態様において、化合物は検出可能な程度に標識される。

【0031】

1つの態様において、化合物は単離された化合物および／または組換え化合物である。

【0032】

本発明の抗体を産生することができる、安定した抗体産生性の細胞株も同じく提供される。そのような細胞株の例には、European Collection of Cell Cultures (ECACC) に2007年12月11日に寄託参照番号07121101の下で寄託された24/04-10B4、およびECACCに2008年4月29日に寄託参照番号08042901の下で寄託されたそのより産生性の高いサブクローン、2007年12月11日にECACCに寄託参照番号07121102の下で寄託された42/04-42D2、およびECACCに2008年4月29日に寄託参照番号08041902の下で寄託されたそのより産生性の高いサブクローン、European Collection of Cell Cultures (ECACC) に2007年12月11日に寄託参照番号07121103の下で寄託された20/05-3A4、およびECACCに2008年4月29日に寄託参照番号08042903の下で寄託されたそのより産生性の高いサブクローン、ならびにEuropean Collection of Cell Cultures (ECACC) に2007年12月11日に寄託参照番号07121104の下で寄託された23/05-4C6、およびECACCに2008年4月29日に寄託参照番号08042904の下で寄託されたそのより産生性の高いサブクローンがある。

20

30

【0033】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の化合物および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0034】

1つの態様において、組成物はさらにアジュバントを含む。

【0035】

もう1つの態様において、化合物はリボソーム中に封入されているか、またはその表面に露出されている。

40

【0036】

もう1つの局面において、本発明は、本発明の化合物および／または本発明の組成物を対象に投与する段階を含む、対象における免疫応答を調節する方法を提供する。

【0037】

1つの態様においては、抗原に対する免疫応答が誘導および／または強化される。

【0038】

1つの特に好ましい態様において、免疫応答はヘルパーT細胞応答を強化することによって調節される。

【0039】

1つのさらなる好ましい態様において、免疫応答はCD4+および／またはCD8+ T細胞の活

50

性化によって調節される。

【0040】

もう1つの特に好ましい態様において、免疫応答はB細胞抗体産生を強化することによって調節される。産生される抗体の例には、IgG1、IgG2b、IgG2cおよび / またはIgG3抗体アイソタイプが含まれるが、これらには必ずしも限定されない。

【0041】

1つのさらなる好ましい態様において、免疫応答は記憶応答を生じさせることによって調節される。

【0042】

1つの特に好ましい態様において、対象には抗原と結合された本発明の化合物を投与する。

【0043】

もう1つの態様においては、自己抗原またはアレルゲンに対する免疫応答が低下する。この態様においては、免疫応答が、T細胞応答および / またはB細胞抗体応答を抑制することによって調節されることが好ましい。

【0044】

1つのさらなる局面において、本発明は、樹状細胞またはその前駆体を本発明の化合物および / または本発明の組成物にインビトロで曝露させる段階、ならびに前記細胞を対象に投与する段階を含む、対象における抗原に対する免疫応答を調節する方法を提供する。

【0045】

1つの態様において、細胞は対象から単離されている。

【0046】

好ましくは、体液性および / またはT細胞媒介性応答が調節される。

【0047】

1つのさらなる態様においては、ナイーブCD8+ T細胞の活性化、および / またはナイーブCD4+ T細胞の活性化が調節される。

【0048】

さらにもう1つの態様において、体液性応答はIgG1、IgG2b、IgG2cおよび / またはIgG3抗体アイソタイプの産生を含む。もう1つの態様において、体液性応答はIgG1抗体アイソタイプの産生を少なくとも含む。

【0049】

好ましくは、樹状細胞は動物樹状細胞または動物樹状細胞の前駆体である。より好ましくは、樹状細胞はヒト樹状細胞である。さらにより好ましくは、ヒト樹状細胞はNec1-2+、HLA DR+および / またはBDCA-3+である。

【0050】

さらにもう1つの局面において、本発明は、本発明の化合物および / または本発明の組成物を対象に投与する段階を含む、樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および / または予防する方法を提供する。

【0051】

好ましくは、本方法は、細胞傷害性物質、薬物および / または薬理的物質と結合された化合物を投与する段階を含む。

【0052】

1つのさらなる局面において、本発明は、単離されたポリヌクレオチドおよび / またはポリヌクレオチドをコードする構築物が、対象の細胞内に存在する場合に、

i) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列; および / または

ii) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドの細胞内での活性のレベルを該ポリヌクレオチドを欠く細胞と比較した際に調節する、対象に単離された該ポリヌクレオチドおよび / または該ポリヌクレオチドをコードする構築物を投与する段階を含む、樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患

10

20

30

40

50



を治療および／または予防する方法を提供する。

【0053】

1つの態様において、ポリヌクレオチドは細胞内でのポリペプチドの活性のレベルを下方制御する。そのようなポリヌクレオチドの例には、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNAおよび二本鎖RNAが非限定的に含まれる。

【0054】

1つの代替的な態様において、ポリヌクレオチドはポリペプチドの活性のレベルを上方制御する。例えば、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

10

【0055】

樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患の例には、癌、感染症、自己免疫疾患またはアレルギーが非限定的に含まれる。

【0056】

1つの態様において、自己免疫疾患はエリテマトーデスである。

【0057】

もう1つの態様において、感染症は、熱帯熱マラリア原虫または三日熱マラリア原虫などのプラスモジウム属 (*Plasmodium* sp.) の感染症である。

【0058】

もう1つの局面において、本発明は、対象における免疫応答を調節するための医薬の製造のための、本発明の化合物および／または本発明の組成物の使用を提供する。

20

【0059】

1つのさらなる局面において、本発明は、対象における抗原に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、本発明の化合物および／または本発明の組成物にインビトロで曝露された樹状細胞またはその前駆体の使用を提供する。

【0060】

さらにもう1つの局面において、本発明は、対象における樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防するための医薬の製造のための、本発明の化合物および／または本発明の組成物の使用に関する。

【0061】

30

1つのさらなる局面において、本発明は、

i) 樹状細胞またはその前駆体を含む試料を本発明の化合物と接触させる段階、および

ii) 化合物と結合した細胞を単離する段階

を含む、樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を試料から濃縮する方法を提供する。

【0062】

もう1つの局面において、本発明は、

i) 検出可能な程度に検出可能な程度に標識された第1のポリヌクレオチドであって、

a) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

b) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

40

を含むポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、第1のポリヌクレオチドと、

樹状細胞またはその前駆体を含む試料を接触させる段階、ならびに

ii) 検出可能な程度に標識された細胞を単離する段階

を含む、樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を試料から濃縮する方法を提供する。

【0063】

1つの好ましい態様においては、上記の2つの方法の段階ii) から得られた細胞が対象に投与される。1つの態様において、細胞は、癌、感染症、自己免疫疾患またはアレルギー

50

から選択される疾患を治療および／または予防するために投与される。

【0064】

1つのさらなる局面において、本発明は、

- i) 樹状細胞またはその前駆体を含む試料を、本発明の化合物と接触させる段階、
- ii) 化合物と結合した細胞を検出する段階

を含む、試料中の樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法を提供する。

【0065】

さらにもう1つの局面において、本発明は、

- i) 検出可能な程度に標識された第1のポリヌクレオチドであって、

10

a) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

b) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、第1のポリヌクレオチドと、

樹状細胞またはその前駆体を含む試料を接触させる段階、ならびに

- ii) 検出可能な程度に標識された細胞を検出する段階

を含む、試料中の樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法を提供する。

【0066】

20

もう1つの局面において、本発明は、

- i) 対象に本発明の化合物を投与する段階、
- ii) 化合物と結合した細胞を検出する段階

を含む、対象における樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法を提供する。

【0067】

1つの態様において、化合物は検出可能な程度に標識される。しかし、当業者は理解すると考えられるが、例えば、化合物と結合する検出可能な程度に標識された二次抗体を用いるといった他の手順も用いうると考えられる。

【0068】

30

1つのさらなる局面において、本発明は、

- i) 検出可能な程度に標識された第1のポリヌクレオチドであって、

a) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

b) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、第1のポリヌクレオチドを、

対象に対して投与する段階、ならびに

- ii) 検出可能な程度に標識された細胞を検出する段階

を含む、対象における樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法を提供する。

40

【0069】

1つの好ましい態様において、樹状細胞は、以下のマーカー、CD8、CD24、Nec1-2、CD11c、HLADRおよびBDCA3のうち1つまたは複数を発現する。

【0070】

好ましくは、樹状細胞は、以下のマーカー、Nec1-2、HLADRおよびBDCA3のうち1つまたは複数を発現するヒト樹状細胞である。

【0071】

1つの代替的な態様において、樹状細胞は、以下のマーカー、CD24、Nec1-2、CD11cおよびCD8のうち1つまたは複数を発現するマウス樹状細胞である。

50

## 【0072】

好ましくは、前駆体樹状細胞は、培養下で、および／または照射を受けたレシピエントへの移入後に樹状細胞に分化することができる、中間型(intermediate)または後期前駆体樹状細胞である。

## 【0073】

好ましくは、対象は動物である。より好ましくは、対象はヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシまたはヒツジなどの哺乳動物である。最も好ましくは、対象はヒトである。

## 【0074】

本発明者らはまた、一部のB細胞が本発明のポリペプチドを発現することも同定した。そのような細胞は、CD19のような当技術分野で公知の任意のB細胞マーカーをターゲティングすることにより、樹状細胞またはその前駆体から識別および／または分離することができる。

10

## 【0075】

もう1つの局面において、本発明は、

i) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；ならびに／または

iii) i) もしくは ii) の生物活性断片および／または抗原性断片を含む、実質的に精製されたポリペプチドならび／または組換えポリペプチドを提供する。

20

## 【0076】

好ましくは、ポリペプチドは樹状細胞またはその前駆体のマーカーである。

## 【0077】

好ましくは、ポリペプチドは、少なくとも1つのC型レクチン様ドメインを含む。より好ましくは、ポリペプチドは単一のC型レクチン様ドメインを含む。

## 【0078】

1つの態様において、ポリペプチドは膜貫通ドメインを欠いている。そのような可溶性断片の例は本明細書に提示されている。1つの態様において、生物活性断片および／または抗原性断片は、

i) SEQ ID NO: 58~61のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

30

ii) SEQ ID NO: 58~61のいずれか1つまたは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む可溶性断片であり、可溶性断片はSEQ ID NO: 1~8のいずれか1つの少なくとも約40個のN末端残基を含まず、かつ可溶性断片はSEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合することができる。

## 【0079】

もう1つの態様において、ポリペプチドは膜貫通ドメインを含む。

## 【0080】

好ましくは、ポリペプチドは樹状細胞またはその前駆体から精製することができる。

## 【0081】

40

好ましくは、ポリペプチドは動物またはそれからの細胞から精製することができる。より好ましくは、ポリペプチドはヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシまたはヒツジなどの哺乳動物から精製することができる。最も好ましくは、ポリペプチドはヒトから精製することができる。

## 【0082】

もう1つの態様において、ポリペプチドは少なくとも1つの他のポリペプチドと融合される。この少なくとも1つの他のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの安定性を高めるポリペプチド、または融合タンパク質の精製もしくは検出を補助するポリペプチドであってよい。

## 【0083】

50

もう1つの局面において、本発明は、

i) SEQ ID NO: 9~16のいずれか1つに提示されたヌクレオチド配列、

ii) SEQ ID NO: 9~16のいずれか1つまたは複数に対して少なくとも50%同一なヌクレオチド配列、

iii) 本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

iv) 本発明の化合物をコードするヌクレオチド配列、および/または

v) i) ~ iv) もしくはそれらの相補物のうちいずれか1つもしくは複数にハイブリダイズする配列ヌクレオチド

を含む、単離されたポリヌクレオチドおよび/または外因性ポリヌクレオチドを提供する。

10

【0084】

1つの態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 9~16のいずれか1つまたは複数にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。

【0085】

好ましくは、ポリヌクレオチドは、細胞内でのポリヌクレオチドの発現を導くことができるプロモーターと機能的に連結される。

【0086】

1つのさらなる局面において、本発明は、ポリヌクレオチドが、対象の細胞内に存在する場合に、細胞内での本発明のポリペプチドの活性のレベルを該ポリヌクレオチドを欠く細胞と比較した際に調節する、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

20

【0087】

1つの態様において、ポリヌクレオチドは、動物の細胞内でのポリヌクレオチドの発現を導くことができるプロモーターと機能的に連結される。

【0088】

1つの好ましい態様において、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを下方制御する。そのようなポリヌクレオチドの例には、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNAおよび二本鎖RNA(dsRNA)が非限定的に含まれる。

【0089】

1つの態様において、アンチセンスポリヌクレオチドは、生理的条件下で、SEQ ID NO: 9~16に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズする。

30

【0090】

もう1つの態様において、触媒性ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 9~16に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチドを切断することができる。

【0091】

1つのさらなる態様において、dsRNA分子は、SEQ ID NO: 9~16に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数のうち少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドのTはUで置き換えられ、二本鎖である該分子の部分は、少なくとも19塩基対の長さでありかつ前記オリゴヌクレオチドを含む。

40

【0092】

もう1つのさらなる態様において、dsRNA分子は単一のプロモーターから発現され、二本鎖部分の鎖は一本鎖部分によって連結されている。

【0093】

1つの代替的な態様において、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを上方制御する。例えば、ポリヌクレオチドはポリペプチドをコードする。

【0094】

本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むベクターも同じく提供される。好ま

50

しくは、ベクターは発現ベクターである。

【0095】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチドおよび/または本発明の少なくとも1つのベクターを含む宿主細胞を、提供する。細胞は、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞などの、ただしこれらに限定されない、任意の細胞種でありうる。

【0096】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の外因性ポリヌクレオチドを含むトランスジェニック植物を提供する。

【0097】

好ましくは、外因性ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドまたは本発明の化合物をコードする。

【0098】

1つの態様において、ポリヌクレオチドは、抗原と結合された本発明の化合物をコードする。

【0099】

もう1つの局面において、本発明は、本発明の外因性ポリヌクレオチドを含むトランスジェニック非ヒト動物を提供する。

【0100】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の化合物、本発明のポリペプチドおよび/または本発明のポリヌクレオチドを含む、本発明の宿主細胞、本発明の植物および/または本発明の動物の抽出物を提供する。

【0101】

本発明の宿主細胞、本発明のベクター、本発明の植物および/または本発明の非ヒト動物を、化合物またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で育成(cultivate)する段階、ならびに発現された化合物またはポリペプチドを回収する段階を含む、本発明の化合物または本発明のポリペプチドを調製するための方法も同じく提供される。

【0102】

もう1つの局面において、本発明は、本発明の方法を用いて産生された化合物またはポリペプチドを提供する。

【0103】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の方法によって得られた樹状細胞および/またはその前駆体の濃縮された集団を提供する。

【0104】

1つのさらなる局面において、本発明は、

i) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列;

ii) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列;ならびに/または

iii) i)もしくはii)の生物活性断片および/または抗原性断片を含むポリペプチドを発現する、樹状細胞ならびに/またはその前駆体の濃縮された集団を提供する。

【0105】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の樹状細胞および/またはその前駆体の濃縮された集団を培養することによって得られた、拡大された(expanded)樹状細胞集団および/またはその前駆体を提供する。

【0106】

もう1つの局面において、本発明は、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明の抽出物および/または本発明の細胞集団、ならびに薬学的に許容される担体を含む組成物

10

20

30

40

50

を提供する。

【0107】

さらにもう1つの局面において、本発明は、

- i) 本発明のポリペプチドを候補化合物と接触させる段階、
- ii) 化合物がポリペプチドと結合するか否かを決定する段階

を含む、本発明のポリペプチドと結合する分子を同定する方法を提供する。

【0108】

1つのさらなる局面において、本発明は、

a) 本発明のポリペプチドを、そのポリペプチドと結合する結合パートナーおよび候補物質に曝露させる段階、ならびに

b) 候補物質がポリペプチドとの結合について結合パートナーと競合する能力を評価する段階

を含む、本発明のポリペプチドと結合する分子を同定する方法を提供する。

【0109】

1つの態様において、結合パートナーは抗体である。もう1つの態様において、結合パートナーは、

i) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

ii) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドの可溶性断片であり、可溶性断片はSEQ ID NO: 1~8のいずれか1つの少なくとも約40個、少なくとも約50個または少なくとも約55個のN末端残基を含まない。

【0110】

もう1つの態様において、結合パートナーは検出可能な程度に標識される。

【0111】

1つのさらなる態様において、ポリペプチドは細胞内で発現される。

【0112】

もう1つの局面において、本発明は、ポリペプチドの結晶の構造座標を用いて、候補化合物をポリペプチドと結合するその能力に関してコンピュータ計算で評価する段階を含む、本発明のポリペプチドと結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。

【0113】

本発明の方法を用いて同定された化合物も同じく提供される。

【0114】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明の抽出物、本発明の細胞集団および/または本発明の組成物を対象に投与する段階を含む、対象における免疫応答を調節する方法に関する。

【0115】

1つの態様においては、抗原と結合された本発明の化合物をコードするポリヌクレオチドを含むDNAワクチンが対象に投与され、対象への投与後に化合物が産生されて、抗原に対する免疫応答が生じる。

【0116】

もう1つの態様において、本発明のトランスジェニック植物またはその抽出物は対象に経口投与される。好ましくは、トランスジェニック植物またはその抽出物は、抗原と結合された本発明の化合物を含む。

【0117】

もう1つの局面において、本発明は、樹状細胞またはその前駆体を、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明の抽出物、本発明の細胞集団および/または本発明の組成物に、インビトロで曝露させる段階、ならびに前記細胞を対象に投与する段階を含む、対象における抗原に対する免疫応答を調節する方法を提供する。

## 【0118】

さらにもう1つの局面において、本発明は、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明の抽出物、本発明の細胞集団および／または本発明の組成物を対象に投与する段階を含む、樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防する方法を提供する。

## 【0119】

対象における免疫応答を調節するための医薬の製造のための、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明の抽出物、本発明の細胞集団および／または本発明の組成物の使用も同じく提供される。

10

## 【0120】

対象における抗原に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明の抽出物、本発明の細胞集団および／または本発明の組成物にインビトロで曝露された樹状細胞またはその前駆体の使用も同じく提供される。

## 【0121】

対象における樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防するための医薬の製造のための、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明の抽出物、本発明の細胞集団および／または本発明の組成物の使用も同じく提供される。

20

## 【0122】

もう1つの局面において、本発明は、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターおよび／または本発明の宿主細胞を動物に投与する段階を含む、本発明の化合物を産生する方法を提供する。

## 【0123】

好ましくは、本方法はさらに、ポリペプチドと結合する動物由来の抗体を単離する段階を含む。

## 【0124】

1つの態様において、本方法はさらに、ポリペプチドと結合する抗体を産生する動物由来の細胞を骨髄腫（myeloma tumor）細胞と融合させてハイブリドーマを作製する段階を含む。

30

## 【0125】

さらにもう1つの態様において、本発明は、本発明の化合物、本発明の細胞株、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明の抽出物、本発明の細胞集団および／または本発明の組成物を含むキットを提供する。

## 【0126】

明らかであるように、本発明の1つの局面の好ましい特徴および特性は、本発明の多くの他の局面にも適用可能である。

40

## 【0127】

本明細書の全体を通じて、「含む（comprise）」という用語、または「含む（comprises）」もしくは「含む（comprising）」などの変形物は、記載された要素、整数もしくは段階、または要素群、整数群もしくは段階群は含まれるものの、他の任意の要素、整数もしくは段階、または要素群、整数群もしくは段階群も排除しないことを意味すると解釈される。

## 【0128】

以下では、本発明を、以下の非限定的な実施例により、さらには添付の図面を参照しながら説明する。

## 【図面の簡単な説明】

50

## 【 0 1 2 9 】

【図 1】マウス (m) およびヒト (h) の 5B6 遺伝子のゲノム構造、およびそれらによってコードされる予想されるタンパク質構造。(A) マウス 5B6 および (B) ヒト 5B6 をコードする完全長 cDNA。(C) マウス 5B6 およびヒト 5B6 によってコードされる予想されるタンパク質配列のタンパク質配列アラインメント。配列同一性は濃いグレーで強調され、類似性は薄いグレーで示されている。矢尻はエクソン境界を表している。(D) C57BL/6J マウスのゲノム配列データベース (UCSC アセンブリ 2006 年 2 月) およびヒトデータベース (UCSC アセンブリ 2006 年 3 月) のそれぞれに対する cDNA のアラインメントによって決定されたマウス 5B6 およびヒト 5B6 の遺伝子構造を模式的に表している。5B6 遺伝子のコード領域をコードするエクソンは黒のボックスによって表され、エクソンおよびイントロンのサイズ (bp) が下に示されている。(E) マウス 5B6 およびヒト 5B6 のタンパク質の概略図。

【図 2】マウス 5B6 およびヒト 5B6 の CTLD (Clec9A) と、配列相同性を有するタンパク質とのアラインメント。ラットマンノース結合タンパク質 A (MBP-A) を、機能的糖質認識ドメインを有する古典的 C 型レクチンドメインとして比較のために含めている。グレーのボックスは保存された残基を指し示し、(+) はタンパク質ホモ二量体化に關与する可能性のあるシステイン残基の別の対を指し示している。(\*) は、ジスルフィド結合を形成すると予想される保存されたシステイン残基を表示している。MBP-A 中の  $\text{Ca}^{2+}$  を連結させる残基は 1 および 2 と命名されている。

【図 3】マウス 5B6 の遺伝子発現プロファイル。リアルタイム RT-PCR を用いて、(A) 脾臓 cDC サブセット; DN、 $\text{CD4}^+$  および  $\text{CD8}^+$ 、胸腺 cDC サブセット;  $\text{CD8}^-$  および  $\text{CD8}^+$ 、LN cDC サブセット;  $\text{CD8}^-$ 、 $\text{CD8}^+$ 、皮膚およびランゲルハンス細胞 (LC) ならびに胸腺および脾臓 pDC を含むリンパ器官定常状態 DC における Gapdh を基準として、5B6 遺伝子の発現プロファイルを調べた。(B) 胸腺細胞 (thym)、リンパ節 (LN) B および T 細胞、脾臓 (spl) B および T 細胞、NK 細胞、未熟マクロファージ (im mac)、成熟マクロファージ (mat mac)、脾臓 pDC および cDC を含む造血細胞。(C) 定常状態 (安静時) マウスから、ならびに LPS および CpG によるインビボ活性化から 3 時間後に単離した脾臓 cDC。

【図 4】DC および他の造血細胞上での m5B6 (Clec9A) タンパク質の表面発現。(A) DC を精製して、4 色免疫蛍光染色によって表面標識した。DC を、 $\text{CD11c}$  (N418-PeCy7)、 $\text{CD45RA}$  (14.8-APC)、 $\text{CD8}$  (53-6.7-APC-Cy7) および m5B6 (10B4-ビオチン) に対する mAb で染色した。脾臓 DC は  $\text{CD4}$  (GK1.5-FITC) でも染色し、胸腺 DC は Sirp (p84-FITC) でも、皮下 LN DC は  $\text{CD205}$  (NLDC-145-FITC) でも染色した。以前に記載された通りに (Lahoud et al., 2006)、脾臓 cDC は  $\text{CD4}^+\text{cDC}$  ( $\text{CD11}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^-\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ )、DN cDC ( $\text{CD11}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ ) および  $\text{CD8}^+\text{cDC}$  ( $\text{CD11}^{\text{hi}}\text{CD45RA}^-\text{CD8}^+\text{CD4}^-$ ) に分けた。胸腺 cDC は  $\text{CD8}^-\text{cDC}$  ( $\text{Sirp}^{\text{hi}}\text{CD8}^{\text{lo}}$ ) および  $\text{CD8}^+\text{cDC}$  ( $\text{Sirp}^{\text{lo}}\text{CD8}^+$ ) に分けた。LN cDC は  $\text{CD8}^-\text{cDC}$  ( $\text{CD11c}^+\text{CD205}^-\text{CD8}^-$ )、皮膚 cDC ( $\text{CD11c}^+\text{CD205}^{\text{int}}\text{CD8}^-$ )、ランゲルハンス細胞 ( $\text{CD11c}^+\text{CD205}^{\text{hi}}\text{CD8}^-$ ) および  $\text{CD8}^+\text{cDC}$  ( $\text{CD11c}^+\text{CD205}^{\text{hi}}\text{CD8}^+$ ) に分けた。pDC は  $\text{CD11c}^{\text{int}}\text{CD45RA}^+$  として同定した。脾細胞は、 $\text{CD3}$  (KT3-1.1-FITC)、 $\text{CD19}$  (1D3-PeCy7)、NK1.1 (PK136-PeCy7)、 $\text{CD49b}$  (Hm 2-APC) に対する mAb で染色して、B 細胞 ( $\text{CD19}^-\text{CD3}^-$ )、T 細胞 ( $\text{CD19}^-\text{CD3}^+$ ) および NK 細胞 ( $\text{NK1.1}^+\text{CD49b}^+\text{CD3}^-$ ) を同定した。脾臓マクロファージは材料および方法の項で指示した通りに濃縮し、 $\text{CD11b}$  (M1/70-Cy5) および F4/80-FITC で染色して  $\text{CD11b}^{\text{hi}}\text{F4/80}^+$  として同定した。骨髓細胞および脾細胞は  $\text{CD11b}$  (M1/70-Cy5) および Ly6C (5075-3.6-FITC) に対する mAb で染色し、単球は側方散乱  $^{\text{lo}}\text{Ly6C}^{\text{hi}}\text{CD11b}^{\text{hi}}$  として定義された。骨髓マクロファージは  $\text{Ly6C}^{\text{int}}\text{CD11b}^{\text{hi}}$  であった。細胞集団を SA-PE で対比染色し、m5B6 発現に関して分析した。実線はゲーティングを行った細胞上での m5B6 染色を表し、点線はアイソタイプを一致させた対照によるゲーティングを行った細胞の染色を表している。(B) 脾臓 DC の濃縮された調製物を m5B6 (10B4-ビオチン)、 $\text{CD11c}$  (N418-Quantum dot 655)、 $\text{CD8}$  (YTS-169-PerCPy 5.5 および  $\text{CD24}$  (M1/69-Alexa 633) に対する mAb ならびに 120G8-FITC で染色し、続いて SA-PE で対比染色した。pDC ( $\text{CD11c}^{\text{int}}\text{120G8}^+$ ) および cDC ( $\text{CD11c}^{\text{hi}}\text{120G8}^-$ ) を m5B6 の発現に関して分析した。cDC 上で、m5B6 発現は  $\text{CD8a}$  および  $\text{CD24}$  の発現と相関した。ほとんどの脾臓 pDC が m5B6 を発現した。(C) 血液 DC の濃縮された調製物を、同じ mAb を用いて脾臓 DC (B



）と並行して染色し、同一のゲーティング戦略を用いて分析した。血液DCはCD8 を発現しなかったが、CD24を発現した。脾臓DCと同様に、CD24を発現する血液DCは5B6を共発現し、血液由来のpDCは、それらの脾臓対応物と同じように、m5B6を発現した。

【図5】ヒトおよびマカクザルのDCおよび造血細胞上での5B6 (CLEC9A) の発現。(A) ヒトおよびマカクザルの末梢血単核細胞 (PBMC) を単離して、HLADR、BDCA3、5B6に対するmAb、ならびにPEを結合させたCD3 (T細胞)、CD14 (単球)、CD19 (B細胞) およびCD56 (ナチュラルキラー細胞) を含む系列カクテル (Lineage cocktail) で表面免疫蛍光標識した。血液DCをHLADR<sup>+</sup>系列 (PE)<sup>+</sup>としてゲーティングし、それらの5B6 (ヒトおよびマカクザル) およびBDCA3 (ヒト) の発現をさらに分析した。(B) ヒトPBMCを、必要な表面マーカーおよび5B6に対するmAbで表面免疫蛍光標識した。単球 (CD14<sup>+</sup>)、NK細胞 (NKp46<sup>+</sup>)、T細胞 (CD3<sup>+</sup>) およびB細胞 (CD19<sup>+</sup>) をゲーティングし、それらの5B6の発現に関して分析した (実線)。点線は、アイソタイプを一致させた対照によるゲーティングを行った細胞の染色を表している。(C) ヒト血液DC上での5B6の発現。ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を単離し、マウス抗ヒト抗体のカクテル (FMC17 (CD14)、FMC63およびB1 (CD19およびCD20) ならびにBC3 (CD3)) を用いて単球、B細胞およびT細胞を枯渇させて、その後抗マウス磁性ビーズ (Biomag) による除去を行った。細胞の濃縮された調製物を、HLADR (L243-APCCy7)、5B6 (10B4-APCまたは4C6-APC) およびBDCA-3 (AD5-14H12-FITC) に対するmAbによって表面免疫蛍光標識した。血液DCをHLADR<sup>+</sup>としてゲーティングし、それらのBDCA3 および5B6の発現に関してさらに分析した。点線はゲーティングを行った細胞のバックグラウンド染色を表している。

10

20

【図6】抗m5B6 mAb 10B4 (図中では抗Clec9Aと称している) を用いたDCのターゲティングは強力な体液性応答を誘導する (A、B)。マウスに対して、2  $\mu$ g (n=5)、0.4  $\mu$ g (n=5)、0.08  $\mu$ g (n=5) もしくは0.016  $\mu$ g (n=4) の抗m5B6 mAb (10B4) を、または50  $\mu$ g (n=5) および10  $\mu$ g (n=5) の非ターゲティング性アイソタイプ対照mAb-1 (eBioscience)、または50  $\mu$ g (n=2) の自家作製アイソタイプ対照mAb-2 (GL117) のいずれかを静脈内注射した。血清抗ラット反応性を (A) 第2週および (B) 第4週にELISAによって測定した。平均力価 $\pm$ SEMを描写している。力価判定実験は2回行い、1つの代表的な実験を示している。10  $\mu$ gの用量反応は、5回の実験の累積データを表している (第2週; n=20、第4週; n=19)。(C) マウス (n=5) に対して、10  $\mu$ gの抗m5B6 mAbまたは非ターゲティング性アイソタイプ対照mAb-1 (eBioscience) のいずれかを静脈内注射した。血清試料を第2週、第4週および第6週に収集し、その後マウスに対して10  $\mu$ gの非ターゲティング性アイソタイプ対照mAb-2 (GL117) を注射した。血清抗ラットIg反応性を第2週、第4週、第6週、第8週にELISAによって測定し、平均力価 $\pm$ SEMとして提示している。(D) マウスに対して、10  $\mu$ gの抗m5B6 mAb (n=7) または非ターゲティング性アイソタイプ対照mAb-2 (GL117; n=4) のいずれかを静脈内注射した。血清抗ラットIg反応性のアイソタイプを第4週にELISAによって測定した。棒グラフは平均力価 $\pm$ SEMを描写している。実験を2回ずつ行い、代表的なデータを提示している。

30

【図7】抗m5B6 mAb 10B4 (図中では抗Clec9Aと称している) を用いたDCのターゲティングによって誘導される体液性免疫の性質。C57BL/6または (A) C57BL/6 TRIF<sup>-/-</sup>MyD88<sup>-/-</sup>または (B) C57/BL6 FcR<sup>-/-</sup>または (C) C57/BL6 nu/nuマウスに対して、10  $\mu$ gの抗m5B6 mAb (10B4) またはターゲティングされていないアイソタイプ対照mAb-2 (GL117) を静脈内注射した。(D) C57BL/6マウスに対して、10  $\mu$ gの抗m5B6 mAbまたはアイソタイプ対照mAb-2 (GL117) を、LPS (10ng) とともに、または伴わずに静脈内注射した。(E) 10  $\mu$ gのOVA結合抗m5B6 mAbもしくはOVA結合アイソタイプ対照mAb-2 (GL117) または (F) 漸増用量の遊離OVAを、C57BL/6マウスに静脈内注射した。血清抗ラットIg Ab価を、第4週時点でELISAによって測定した。各丸印は個々のマウスを表し、群の幾何平均を線によって描写している。1回行った (C) および (E) を除き、実験は2~4回行い、同様の結果が得られた。

40

【図8】抗m5B6-OVA 10B4 (図中では抗Clec9A-OVAと称している) を用いたDCへのAgのターゲティングは、CD4およびCD8 T細胞増殖応答の両方を誘発する。OVA特異的なトランス

50

ジェニックCD8 (OT-I) またはCD4 (OT-II) T細胞 ( $10^6$ 個) を、ナイーブC57/BL6 Ly5.1マウスに養子移入した。1日後にマウスに対して、 $2.5 \mu\text{g}$ の抗m5B6-OVA ( $n=3$ ) もしくはターゲティングされていないアイソタイプ対照-OVA mAb-2 (GL117;  $n=3$ ) を静脈内注射するか、または免疫処置を行わずにおいた ( $n=2$ )。mAb注射から3日後にマウスを殺処理し、脾臓を採取した。細胞をLy5.2 (S.450-15.2-PE) およびCD4 (GK1.5-APC) またはCD8 (YTS169-APC) に対するmAbで染色し、増殖性のCFSE標識トランスジェニックT細胞、(A) OT-I ( $\text{Ly5.24}^+\text{CD8}^+$ ) または (B) OT-II ( $\text{Ly5.2}^+\text{CD4}^+$ ) をフローサイトメトリーによって計数した。OVA特異的なT細胞の増殖応答は、フローサイトメトリーによるCFSE蛍光の低下として認められた。脾臓1つ当たりの増殖性のOT-I細胞およびOT-II細胞の総数を材料および方法の項に記載した通りに算定し、データを $\pm$ -SEMとして提示している。実験は $2.5 \mu\text{g}$ のOVA結合mAbを用いて2回、 $5 \mu\text{g}$ を用いて1回を行い、同様の結果が得られた。

【図9】マウスへの抗m5B6-Ova (図中では10B4と称している) の注射。10B4-OVA結合物は、 $\text{CD8}^+$  DCおよびプライミングを受けたOVA特異的CD8 T細胞をAgに送達した。3匹のマウスに対して、 $10 \mu\text{g}$ のOVA結合10B4 (抗5B6 mAb) またはOVA結合アイソタイプ対照mAb (GL117) のいずれかを皮下に免疫処置した。1日後にマウスを殺処理し、DCを脾臓から単離して、フローサイトメトリーによって $\text{CD8}^+$ 、 $\text{CD4}^+$ または $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$  (DN) DCサブセットに選別した。段階的な用量のDCをCFSE標識OT-I細胞とともにインキュベートして、3日間培養した。増殖性のOT-I細胞をフローサイトメトリーによって計数した。有意なOT-I細胞増殖を誘導したのは、5B6特異的mAbによってターゲティングされた $\text{CD8}^+$  DCのみであった。データは2つの独立した実験の代表である。

【図10】抗5B6 Ab (10B4) は、アジュバントの存在下または非存在下における種々の投与経路を介した抗原送達に非常に有効である。(A) 10B4抗体は種々の投与経路を介して強い体液性応答を誘導する。C57/BL6マウスの群 ( $n=5$ ) に対して、 $10 \mu\text{g}$ の10B4 mAbまたはアイソタイプ対照mAb (GL117) を静脈内、皮下または腹腔内に注射した。血清試料を2週間収集し、血清抗ラットIg反応性をELISAによって定量した。(B) 10B4抗体は、アジュバントを伴って、または伴わずに強い体液性応答を誘導する。C57/BL6マウスの群 ( $n=5$ ) に対して、 $2 \mu\text{g}$ の10B4 mAbまたはアイソタイプ対照mAb (GL117) を、LPS ( $1 \mu\text{g}$ ) またはCpG ( $10 \mu\text{g}$ ) の存在下または非存在下で静脈内注射した。陽性対照マウスにはGL117およびアラム (Alum) を腹腔内注射した。血清試料を、初回注射から2週後、4週後および6週後に入手した。続いてマウスに $10 \mu\text{g}$ のアイソタイプ対照mAb (GL117) および血清試料の静脈内への追加投与を行い、血清試料を2週後に採取した。血清抗ラットIg反応性はELISAによって定量した。

【図11】5B6の可溶性断片は膜結合型5B6と結合する。(A) マウス5B6およびヒト5B6から作製した可溶性タンパク質のアミノ酸配列。マウス5B6およびヒト5B6のそれぞれに関して、ストーク (stalk) およびC型レクチン様ドメインの両方を含む元の構築物、ならびにC型レクチン様ドメインを含むがストーク領域は含まない可溶性タンパク質-2/3構築物という、2つの構築物を構築した。図中で、IL3リーダー配列はイタリック体で表記されて一重下線が施され、ビオチン化コンセンサス配列はイタリック体で表記されて二重下線が施され、FLAGタグはイタリック体で表記されて波線による下線が施されている。5B6配列は赤で示されている。(B) 可溶性5B6は、一過性にトランスフェクトされた293T細胞上の膜結合型5B6と結合する。293T細胞に対して、完全長の非タグ付加m5B6 (293T-m5B6)、h5B6 (293T-h5B6) または非DNA (293T) をコードする発現構築物を一過性にトランスフェクトして、膜結合型m5B6またはh5B6を発現するトランスフェクタント細胞を作製した。2日後に細胞を収集し、可溶性FLAGタグ付加m5B6およびh5B6 (元の構築物からのストークを備える) ならびに可溶性FLAGタグ付加シーレ (Cire) を用いて表面免疫蛍光した。結合はビオチン化抗Flag mAb 9H10およびストレプトアビジンPEを用いて検出した。生細胞を前方散乱およびヨウ化プロピジウム排除に対してゲーティングし、抗Flag Abおよびストレプトアビジン-PE (点線) による対照染色を基準として、それらの可溶性5B6 (実線) の表面結合に関して分析した。(C) 可溶性5B6と膜結合型5B6との結合はストークに依存しない。トランスフェクトしないか、または完全長非タグ標識膜結合型m5B6 (CHO-m5B6) をコード

する発現構築物によって安定的にトランスフェクトしたCHO細胞を、ビオチン化可溶性FLAGタグ付加m5B6およびh5B6（図示したようにストークを有するもの、または有しないもの）ならびにビオチン化可溶性FLAGタグ付加シーレを用いて表面免疫蛍光標識した。結合はストレプトアビジンPEを用いて検出した。生細胞を前方散乱に対してゲーティングし、ストレプトアビジン-PEによる対照染色（点線）を基準として、それらのビオチン化可溶性5B6（実線）の表面結合に関して分析した。

【図12】DC前駆体またはFlt3リガンド生成DC（FL DC）を記載の通りに単離した。多能性始原細胞（MPP）は、 $\text{lin}^{-}\text{CD117}^{+}\text{sca-1}^{+}\text{CD34}^{+}$ として定義された。インビトロで作製されたPre-DCは、培養物からのCFSE<sup>low</sup>  $\text{lin}^{-}\text{CD11c}^{+}$ 細胞として定義された。FL DCは以下の通りに定義された。pDCは $\text{CD11c}^{+}\text{CD45RA}^{+}$ として； $\text{Sirp}^{+}$  cDCは $\text{CD11c}^{+}\text{CD45RA}^{-}\text{Sirp}^{+}$ として、 $\text{Sirp}^{-}$  cDCは $\text{CD11c}^{+}\text{CD45RA}^{-}\text{Sirp}^{-}$ としてゲーティングされた。バックグラウンド染色（破線によって指示）のレベルは、細胞集団を定義するために必要な抗体で染色された細胞の蛍光強度によって決定された。5B6発現（実線によって指示）は、上述の抗体、ならびに5B6に対する抗体（10B4-APC）による染色によって決定した。

【図13】遺伝子融合を用いた組換え抗Clec9A-Ova（抗5B6-Ova）の作製。組換え抗Clec9A（5B6）であるAb 10B4を、Ovaと融合された10B4鎖および10B4-重鎖をコードするプラスミドの、freestyle 293 F細胞への一過性トランスフェクションによって作製した。48時間後に、その一過性トランスフェクション物から上清を収集し、抗5B6-Ova Abが5B6を認識する能力を、組換えAb（293Fの一過性トランスフェクト体から）によるCHO-5B6トランスフェクタント細胞の免疫蛍光標識およびフローサイトメトリー分析によって検討した。完全長膜結合型5B6を安定的に発現するCHO細胞をトランスフェクション上清（組換え抗Clec9A-OvaAbを含む）とともにインキュベートし、結合を、ビオチン化抗ova Abとストレプトアビジン-PE（上のパネル）または抗ラットIg PE（下のパネル）とを用いて検出した。実線は組換え抗Clec9A-Ova Ab（トランスフェクション上清）によるCHO-5B6細胞の染色を指し示し、点線は二次Ab（上のパネルについては抗Ova-ビオチンおよびストレプトアビジン-PE、下のパネルについては抗ラットIg PE）によるCHO-5B6細胞の染色を指し示している。

### 【0130】

#### 配列表の手引き

SEQ ID NO：1-ヒト5B6。

SEQ ID NO：2-マウス5B6。

SEQ ID NO：3-チンパンジー5B6。

SEQ ID NO：4-マカクザル5B6。

SEQ ID NO：5-イヌ5B6。

SEQ ID NO：6-ウシ5B6。

SEQ ID NO：7-ウマ5B6。

SEQ ID NO：8-ラット5B6。

SEQ ID NO：9-ヒト5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：10-マウス5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：11-チンパンジー5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：12-マカクザル5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：13-イヌ5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：14-ウシ5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：15-ウマ5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：16-ラット5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：17~28-オリゴヌクレオチドプライマー。

SEQ ID NO：29-マウス5B6の抗原性断片。

SEQ ID NO：30-ヒト5B6の抗原性断片。

SEQ ID NO：31-ビオチン化コンセンサス配列。

SEQ ID NO：32-マウスClec12aの部分配列。

SEQ ID NO : 33- マウスデクチン-1の部分配列。  
SEQ ID NO : 34- マウスClec8aの部分配列。  
SEQ ID NO : 35- マウスNKG2Dの部分配列。  
SEQ ID NO : 36- ヒトNKG2Dの部分配列。  
SEQ ID NO : 37- ラットMBP-Aの部分配列。  
SEQ ID NO : 38- ストックを含む可溶性flagタグ付加マウス5B6。  
SEQ ID NO : 39- ストックを含む可溶性flagタグ付加ヒト5B6。  
SEQ ID NO : 40- ストックを有しない可溶性flagタグ付加マウス5B6。  
SEQ ID NO : 41- ストックを有しない可溶性flagタグ付加ヒト5B6。  
SEQ ID NO : 42-10B4抗5B6抗体の重鎖のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 43-10B4抗5B6抗体の重鎖の可変領域のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 44-10B4抗5B6抗体の重鎖のCDR1のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 45-10B4抗5B6抗体の重鎖のCDR2のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 46-10B4抗5B6抗体の重鎖のCDR3のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 47-10B4抗5B6抗体の軽鎖のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 48-10B4抗5B6抗体の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 49-10B4抗5B6抗体の軽鎖のCDR1のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 50-10B4抗5B6抗体の軽鎖のCDR2のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 51-10B4抗5B6抗体の軽鎖のCDR3のアミノ酸配列。  
SEQ ID NO : 52~57-オリゴヌクレオチドプライマー。  
SEQ ID NO : 58- ストックを含む可溶性マウス5B6。  
SEQ ID NO : 59- ストックを含む可溶性ヒト5B6。  
SEQ ID NO : 60- ストックを有しない可溶性マウス5B6。  
SEQ ID NO : 61- ストックを有しない可溶性ヒト5B6。

10

20

【発明を実施するための形態】

【0131】

#### 発明の詳細な説明

##### 一般的な手法および定義

別に明確に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、当業者（例えば、細胞培養、分子遺伝学、分子生物学、樹状細胞生物学、免疫学、免疫細胞化学、タンパク質化学および生化学）が一般に理解しているものと同じ意味を持つものとする。

30

【0132】

別に指示する場合を除き、本発明で利用する組換えタンパク質、細胞培養および免疫学の手法は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような手法は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T.A. Brown (編), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D.M. Glover and B.D. Hames (編), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)、およびF.M. Ausubel et al. (編), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現時点までのすべての改訂を含む)、Ed Harlow and David Lane (編) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、およびJ.E. Coligan et al. (編) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現時点までのすべての改訂を含む)といった文献中に記載および説明されている。

40

【0133】

本明細書で用いる場合、「5B6」という用語は、SEQ ID NO : 1~8のいずれか1つまたは複数に提示されたアミノ酸配列、他の種からのオルソログ、それらの機能的な変異体または突然変異体、ならびにそれらの生物活性断片および/または抗原性断片を含む、ポリペプチドのことを指す。「5B6」および「CLEC9A」という用語は、本明細書中で互換的に用

50

いられる。

【0134】

本明細書で用いる場合、「C型レクチン様ドメイン」または「CTLD」という用語は、多くの動物種から単離されたさまざまなタンパク質中で同定されているタンパク質ドメインファミリーのことを指し、これについては例えば、Drickamer (1999) による総説を参照されたい。CTLDドメインは最初、いわゆるC型レクチン（カルシウム依存性糖質結合タンパク質）に共通するドメインとして同定され、「糖質認識ドメイン」（「CRD」）と命名された。さらに最近では、このドメインが多くの真核生物タンパク質に共通し、そのうちいくつかは糖部分とは結合しないことが明らかになっており、それ故にこのカノニカル（canonical）ドメインはCTLDと命名されている。CTLDは、糖質、脂質およびタンパク質を含む非常に多様な化合物と結合することが報告されている。CTLDはおよそ120個のアミノ酸残基からなり、特徴的なこととして、2つまたは3つの鎖内ジスルフィド架橋を有する。異なるタンパク質由来のCTLD間のアミノ酸配列レベルでの類似性は比較的低いものの、さまざまなCTLDの3D構造は高度に保存されていて、構造的な変異性はいわゆるループ領域に本質的に限られ、多くの場合は最大5つのループによって規定されることが見いだされている。本発明のポリペプチドのCTLDの一例は図1C中に強調表示されている。

10

【0135】

本明細書で用いる場合、「治療すること（treating）」、「治療する（treat）」または「治療（treatment）」という用語は、特定された病状の少なくとも1つの症状を低下または消失させるのに十分な、本発明の化合物、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチドその他の治療的有効量を投与することを含む。

20

【0136】

本明細書で用いる場合、「予防すること（preventing）」、「予防する（prevent）」または「予防（prevention）」という用語は、特定された病状の少なくとも1つの症状を停止または妨害するのに十分な、本発明の化合物、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチドその他の治療的有効量を投与することを含む。

【0137】

本明細書で用いる場合、「試料」は、樹状細胞またはその前駆体を含むことが疑われる任意の生物材料でありうる。その例には、血液、例えば、全末梢（whole peripheral）血、臍帯血、胎児血液、骨髓、血漿、血清など、尿、培養細胞、唾液または尿道拭き取り検体（urethral swab）、リンパ組織、例えば扁桃、パリエル板、虫垂、胸腺、脾臓およびリンパ節が非限定的に含まれる。試料は直接検査してもよく、または検査の前に何らかの形の処置を必要としてもよい。例えば、生検試料は、検査の前に細胞懸濁液を生成するための均質化を必要とすることがある。さらに、生物試料が液体形態でない範囲において（例えば、それは固体、半固体または脱水した液体試料であってよい）、それが試料を流動化（mobilizing）するための緩衝剤などの試薬の添加を必要としてもよい。流動化試薬は、試料を例えば本発明の化合物との接触下に置く前に、試料と混合することができる。

30

【0138】

本明細書で用いる場合、「免疫応答」という用語は、抗原に応答しての、対象における免疫系の反応性の変更のことを指し、これには、抗体産生、細胞媒介性免疫の誘導、補体活性化および/または免疫寛容の発生が含まれうる。

40

【0139】

本明細書で用いる場合、「結合させる（conjugate）」、「結合された（conjugated）」という用語、またはそれらの変形物は、本発明の化合物と治療物質との間の任意の形態の共有的または非共有的な結合のこと、または本発明の化合物および治療物質をリボソーム中などで互いに近接させて配置することを指して幅広く用いられる。1つの態様において、結合された本発明の化合物は、結合された化合物をコードする単一のオープンリーディングフレーム、例えば、C末端および/またはN末端で抗原と融合された抗体の重鎖または軽鎖をコードする単一のオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドの発現によって産生される。

50

## 【0140】

本明細書で用いる場合、「抽出物」という用語は、本発明の宿主細胞、植物または非ヒトトランスジェニック動物の任意の部分のことを指す。その部分は、植物の種子のような実体の全体であってもよく、または少なくとも部分的な均質化および／もしくは精製によって得られてもよい。この用語は宿主細胞から分泌された部分を含み、それ故に培養上清を範囲に含む。

## 【0141】

化合物

本発明者らは、5B6（当技術分野ではCLEC9AおよびHEEE9341とも呼ばれる）が、樹状細胞および／またはその前駆体のサブセットにおいて発現されることを初めて示した。このことは、5B6と結合する化合物を多種多様な診断的および治療的な手順に用いることを可能にする。例えば、抗体-抗原結合物（conjugate）を、樹状細胞および／またはその前駆体に抗原を送達して免疫応答を誘導させるために用いることができる。別の例では、検出可能な程度に標識した化合物を、試料中の樹状細胞またはその前駆体を検出するために用いることができる。1つのさらなる例では、抗体-細胞傷害性物質結合物を、有害な樹状細胞またはその前駆体へのターゲティングのために用いることができる。

10

## 【0142】

本発明の化合物は、5B6と結合する、好ましくは特異的に結合する、任意の種類の分子でありうる。化合物は、例えば、精製されたおよび／または組換え型の、天然に存在するリガンドまたは合成リガンドであってよい。化合物と5B6との間の結合は、共有的または非共有的な相互作用、または共有的および非共有的な相互作用の組み合わせによって媒介されうる。化合物と5B6との相互作用が非共有的に結合した複合体を生成させる場合には、生じる結合は、典型的には静電結合、水素結合、または親水性／親油性相互作用の結果である。1つの好ましい態様において、化合物は、精製されたポリペプチドおよび／または組換えポリペプチドである。特に好ましい5B6結合化合物は、精製されたおよび／または組換え型の、抗5B6抗体またはそれらの抗原結合性断片である。

20

## 【0143】

必須ではないものの、化合物は5B6と特異的に結合してもよい。「特異的に結合する」という語句は、特定の条件下で、化合物が5B6とは結合するが、その他の、例えばタンパク質または糖質とは意味のある量では結合しないことを意味する。好ましくは、化合物は、5B6とは特異的に結合するが、樹状細胞またはその前駆体を含む、対象から得られた試料中の他の分子に対してはそうでない。そのような条件下での5B6と特異的結合は、その特異性に関して選択された抗体が必要と考えられる。もう1つの態様において、化合物は、別のタンパク質、特にCTLDを含むタンパク質と比較して、5B6に対する化合物の結合との間に10倍を上回る違い、好ましくは25倍、50倍または100倍を上回る違いがあれば、5B6と「特異的に結合する」とみなされる。

30

## 【0144】

抗体

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、1対の低分子量の軽（L）鎖および1対の重（H）鎖という2対のポリペプチド鎖からなり、その4つすべてがジスルフィド結合によって相互に連結している、構造的に関連のある糖タンパク質のクラスのことを指す。免疫グロブリンの構造は詳細に特徴づけられており、例えば、Fundamental Immunology Ch. 7（Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)）を参照されたい。手短に述べると、各重鎖は典型的には、1つの重鎖可変領域（本明細書では $V_H$ と略記）および1つの重鎖定常領域（本明細書では $C_H$ と略記）で構成される。重鎖定常領域は典型的には、 $C_H1$ 、 $C_H2$ および $C_H3$ という3つのドメインで構成される。各軽鎖は典型的には、1つの軽鎖可変領域（本明細書では $V_L$ と略記）および1つの軽鎖定常領域（本明細書では $C_L$ と略記）で構成される。軽鎖定常領域は典型的には、1つのドメイン $C_L$ で構成される。 $V_H$ 領域および $V_L$ 領域はさらに、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる、超可変性を有する領域（または構造的に規定されたループの配列および／または形態の点で超可变的でありうる超可変

40

50

領域)が、より保存性の高いフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域の間に散在するものとして細分することもできる。

【0145】

各V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は典型的には、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって次の順序に並んだ3つのCDRおよび4つのFRで構成される:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(Chothia and Lesk, 1987も参照のこと)。典型的には、この領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)に記載された方法によって行われる(本明細書における、KabatにおけるようなまたはKabatに従った可変ドメイン残基の番号付けなどの語句は、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに対するこの番号付け方式のことを指す)。この番号付け方式を用いると、ペプチドの実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはCDRの短縮またはその中への挿入に対応して、より少数のまたは追加のアミノ酸を含むことがある。

10

【0146】

「ヒト化抗体」という用語は、本明細書で用いる場合、親抗体の抗原結合特性を保っているか実質的に保っているが、ヒトにおける免疫原性がより低い、非ヒト抗体、典型的にはマウスのものに由来する抗体のことを指す。

【0147】

相補性決定領域(CDR)という用語は、本明細書で用いる場合、免疫グロブリン結合部位の可変断片(Fv)領域の結合親和性および特異性を相伴って規定するアミノ酸配列のことを指す。

20

【0148】

フレームワーク領域(FR)という用語は、本明細書で用いる場合、CDRの間に介在するアミノ酸配列のことを指す。抗体のこれらの部分は、CDRを適切な向きに保持する(CDRが抗原に結合することを可能にする)のに役立つ。可変領域は、軽鎖または重鎖のいずれにしても、1つのフレームワークおよび典型的には3つのCDRを含む。

【0149】

定常領域(CR)という用語は、本明細書で用いる場合、エフェクター機能を付与する抗体分子の部分のことを指す。主題ヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する。重鎖定常領域は、 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ または $\mu$ という5種のアイソタイプのいずれかから選択することができる。さらに、種々のサブクラスの重鎖(IgGサブクラスの重鎖など)は異なるエフェクター機能を担っており、それ故に、所望の重鎖定常領域を選択することにより、所望のエフェクター機能を備える抗体を作製することができる。好ましい重鎖定常領域は 1(IgG1)、2(IgG2)、3(IgG3)および 4(IgG4)であり、より好ましくは 4(IgG4)である。軽鎖定常領域は  $\kappa$  型または  $\lambda$  型のものであることができ、好ましくは  $\lambda$  型のものである。

30

【0150】

抗体は、完全な状態(intact)の免疫グロブリンとして、または、VHもしくはVLドメインのいずれかを含むドメイン抗体、重鎖可変領域の二量体(VHH、ラクダ科動物に関して記載されているようなもの)、軽鎖可変領域の二量体(VLL)、軽鎖および重鎖の可変領域のみを含むFv断片、または重鎖可変領域およびCH1ドメインを含むFd断片を非限定的に含む種々の形態にある修飾物として存在することができる。重鎖および軽鎖の可変領域が一つに連結されて一本鎖抗体を形成したものからなるscFv(Bird et al., 1988; Huston et al., 1988)、ならびに二重特異性抗体および三重特異性抗体といったscFvのオリゴマーもまた、「抗体」という用語の範囲に含まれる。可変領域と定常領域の一部とを含む、Fab、(Fab')<sub>2</sub>およびFabFc<sub>2</sub>断片といった抗体の断片も、同じく範囲に含まれる。CDRグラフト化抗体断片および抗体断片のオリゴマーも同じく範囲に含まれる。Fvの重鎖成分および軽鎖成分は同じ抗体に由来してもよく、または異なる抗体に由来し、その結果キメラ性Fv領域を生じてよい。抗体は動物(例えばマウス、ウサギまたはラット)もしくはヒト由来のものであってもよく、またはキメラ性(Morrison et al., 1984)であるか、もし

40

50

くはヒト化 (Jones et al, 1986) およびUK 8707252) されていてよい。本明細書で用いる場合、「抗体」という用語は、これらのさまざまな形態を含む。本明細書中に提示した指針、ならびに上記に引用した参考文献中およびHarlowおよびLane (前記) などの刊行物中に記載されている当業者に周知のそのような方法を用いて、本発明の方法に用いるための抗体を容易に作ることができる。

#### 【0151】

天然供給源からのものではない本発明の抗体または抗原結合性断片、例えばヒト化抗体などは、好ましくは、親抗体の、例えば24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4および/または23/05-4C6の、結合特性のかなりの割合を保っている。特に、本発明のそのような抗体または断片は、ヒト化抗体などの抗体または断片を作製するために用いられる親抗体によって認識される抗原と特異的に結合する能力を保っている。好ましくは、抗体または断片は、親抗体と同じまたは実質的に同じ抗原結合親和性およびアビディティを呈する。理想的には、抗体または断片の親和性は親抗体の親和性の10%未満ではないと考えられ、より好ましくは約30%未満ではなく、最も好ましくは親和性は親抗体の50%未満ではないと考えられる。抗原結合親和性をアッセイするための方法は当技術分野で周知であり、これには最大半量 (half-maximal) 結合アッセイ、競合アッセイおよびスキャッチャード分析が含まれる。

10

#### 【0152】

種々のイムノアッセイ形式を、5B6に対して特異的に免疫反応性である抗体または断片を選択するために用いることができる。例えば、あるタンパク質または糖質に対して特異的に免疫反応性である抗体を選択するためには、表面標識およびフローサイトメトリー分析または固相ELISAイムノアッセイがルーチンのように用いられる。特異的な免疫反応性の決定に用いるイムノアッセイの形式および条件に関する説明については、HarlowおよびLane (前記) を参照されたい。

20

#### 【0153】

5B6結合性抗体は、1つの可変軽 ( $V_L$ ) 鎖および1つの可変重 ( $V_H$ ) 鎖を含むFv領域であってもよい。軽鎖および重鎖は直接連結されてもよく、またはリンカーを経由して連結されてもよい。本明細書で用いる場合、リンカーとは、軽鎖および重鎖と共有的に連結されて、それらが対象とするエピトープと特異的に結合しうるコンフォメーションをそれらが実現しうるように、その2つの鎖の間に十分な間隔および柔軟性を与える分子のことを指す。タンパク質リンカーが特に好ましいが、それはそれらが融合ポリペプチドのIg部分に内在する成分として発現されうるためである。

30

#### 【0154】

もう1つの態様においては、組換え的に作製された一本鎖scFv抗体、好ましくはヒト化scFvを本発明の方法に用いる。

#### 【0155】

##### モノクローナル抗体

5B6エピトープを対象とするモノクローナル抗体は当業者によって容易に作製可能である。そのような抗体を、5B6エピトープ  
RWLWQDGSSPSPGLLPAERSQSANQVC-OH) (SEQ ID NO:30)  
を用いて作製するための方法の一例は、実施例の項に提示されている。

40

#### 【0156】

ハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を作るための一般的な方法は周知である。抗体産生性の不死細胞株は、細胞融合によって作り出すことができ、発癌性DNAによるBリンパ球の直接的な形質転換またはエプスタイン-バーウイルスによるトランスフェクションといった他の手法によって作り出すこともできる。5B6エピトープに対して作製された一団のモノクローナル抗体は、さまざまな特性、すなわちアイソタイプおよびエピトープ親和性に関してスクリーニングすることができる。

#### 【0157】

動物由来のモノクローナル抗体は、直接的インビボ免疫療法および体外免疫療法の両方

50



のために用いることができる。しかし、例えば、マウス由来のモノクローナル抗体をヒトにおいて治療物質として用いた場合には、患者がヒト抗マウス抗体を産生することが観察されている。このため、動物由来のモノクローナル抗体は、治療法には、特に長期的使用には好ましくない。しかし、確立された遺伝子工学の手法を用いることで、動物由来の部分およびヒト由来の部分を有するキメラ抗体またはヒト化抗体を作り出すことができる。動物は例えば、マウス、またはラットなどの他の齧歯動物でありうる。

【0158】

キメラ抗体の可変領域が例えばマウス由来であり、一方、定常領域がヒト由来である場合には、そのキメラ抗体は「純粋な」マウス由来のモノクローナル抗体よりも一般に免疫原性が低いと考えられる。これらのキメラ抗体は、「純粋な」マウス由来の抗体が不適であることが判明した場合には、治療的使用のためにより適している可能性が高いと考えられる。

10

【0159】

キメラ抗体を作製するための方法は当業者にとって利用可能である。例えば、軽鎖および重鎖を、例えば別々のプラスミド中にある免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖を用いて、別々に発現させることができる。続いてこれらを精製し、インビトロで集合させて完全な抗体にすることができる。そのような集合を実現するための方法は記載されている（例えば、Sun et al, 1986を参照）。そのようなDNA構築物は、抗5B6抗体の軽鎖または重鎖の可変領域に関する機能的に再配列化された遺伝子をコードするDNAが、ヒト定常領域をコードするDNAと連結されたものを含みうる。軽鎖および重鎖に関するDNA構築物がトランスフェクトされた骨髓腫またはハイブリドーマなどのリンパ系細胞は、抗体鎖を発現して集合させることができる。

20

【0160】

縮小され単離された軽鎖および重鎖からのIgG抗体の形成のためのインビトロ反応のパラメーターも記載されている。完全なH2L2 IgG抗体としての重鎖および軽鎖の細胞内会合および連結を実現するための、同じ細胞内での軽鎖および重鎖の共発現も可能である。そのような共発現は、同じ宿主細胞内で同じまたは異なるプラスミドのいずれかをを用いて達成することができる。

【0161】

本発明のもう1つの好ましい態様において、抗5B6抗体は、ヒト化されており、すなわち、抗体のヒト含量を最大にすると同時に、例えばラット、ウサギまたはネズミ親抗体などの可変領域に起因する結合親和性の損失がほとんどまたは全くないような分子モデリング法によって作製される抗体である。

30

【0162】

以下に記載する方法は、抗5B6抗体のヒト化に適用可能である。

【0163】

ヒト化に際しては、どのヒト抗体配列を使用すべきかを決定する上で検討すべきいくつかの要因がある。軽鎖および重鎖のヒト化は互いに独立して検討されるが、その論法はそれぞれについて基本的に同様である。

【0164】

この選択過程は以下の原理に基づく。所与の抗体の抗原特異性および親和性は、主として可変領域CDRのアミノ酸配列によって決まる。可変ドメインフレームワーク残基には直接的な寄与はほとんどまたは全くない。フレームワーク領域の主な機能は、抗原を認識するようにCDRをその適正な空間定位に保持することにある。このため、動物の、例えば齧歯動物のCDRのヒト可変ドメインフレームワークへの置換は、ヒト可変ドメインフレームワークがその元になった動物可変ドメインに対して高度に相長的であるならば、それらの正しい空間定位の保持をもたらす可能性が極めて高い。このため、ヒト可変ドメインは、好ましくは、動物可変ドメインに対して高度に相長的であるものを選択すべきである。適したヒト抗体可変ドメイン配列は、以下のように選択することができる。

40

【0165】

50

## 段階1.

コンピュータプログラムを用いて、動物由来の抗体の可変ドメインに対して最も相長的であるヒト抗体可変ドメインの配列に関して、利用可能なすべてのタンパク質（およびDNA）データベースを検索する。適したプログラムの出力は、動物由来の抗体に対して最も相長的な配列のリスト、各配列に対する相同率（percent homology）、および動物由来の配列に対する各配列のアラインメントである。これは重鎖および軽鎖の可変ドメイン配列の両方について独立して行われる。上記の分析は、ヒト免疫グロブリン配列のみが含まれる場合には、より容易に達成される。

【0166】

## 段階2.

ヒト抗体可変ドメイン配列をリスト化し、相同性を比較する。主として、比較は、極めて可变的である重鎖のCDR3を除外したCDRの長さにならって行われる。ヒト重鎖ならびにおよび軽鎖は、3つの重鎖サブグループ、4つの鎖サブグループおよび6つの鎖サブグループというサブグループに分類される。各サブグループ内でのCDRサイズは類似しているが、サブグループ間では異なる。通常、相同性の最初の近似として、動物由来抗体のCDRをヒトサブグループのうちの1つと合致させることが可能である。続いて、同様の長さのCDRを有する抗体を、特にアミノ酸配列について、特にCDR内のアミノ鎖配列について比較し、同じく周囲のフレームワーク領域中のアミノ酸配列についても比較する。最も相長的であるヒト可変ドメインを、ヒト化のためのフレームワークとして選択する。

【0167】

## 実際のヒト化方法 / 手法

抗体は、EP-A-0239400に従って所望のCDRをヒトフレームワークにグラフト化することによってヒト化する。したがって、そのCDRを再形成（reshape）することが望まれるヒトDNAから出発して、所望の再形成された抗体をコードするDNA配列を作製することができる。所望のCDRを含む動物由来可変ドメインのアミノ酸配列を、選択したヒト抗体可変ドメイン配列のアミノ酸配列と比較する。ヒト可変領域に動物由来CDRを組み入れるために動物中の対応する残基に変更する必要があるヒト可変ドメイン中の残基を明らかにする。また、ヒト配列を置換する、ヒト配列に付加する、またはヒト配列から欠失させる必要のある残基が存在する場合もある。

【0168】

所望の残基を含むようにヒト可変ドメインのフレームワークに突然変異を誘発させるために用いるオリゴヌクレオチドを合成する。それらのオリゴヌクレオチドは、任意の都合のよいサイズのものであってよい。通常は、利用する特定の合成装置の性能によってのみ、長さが限定される。オリゴヌクレオチド指定インビトロ突然変異誘発法は周知である。

【0169】

または、ヒト化を、WO 92/07075の組換えポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて達成することもできる。この方法を用いて、CDRをヒト抗体のフレームワーク領域間に接合することができる。一般に、WO 92/07075の手法は、2つのヒトフレームワーク領域ABおよびCD、ならびにそれらの間にある、ドナーCDRによって置換させようとするCDRを含むテンプレートを用いて行うことができる。プライマーAおよびBはフレームワーク領域ABを増幅するために用いられ、プライマーCおよびDはフレームワーク領域CDを増幅するために用いられる。しかし、プライマーBおよびCはそれぞれその5'末端に、ドナーCDR配列のすべてまたは少なくとも一部に対応する別の配列も含む。プライマーBおよびCは、PCRを行おうとする条件下で互いにその5'末端のアニーリングを可能にするのに十分な長さだけ重複している。このため、増幅された領域ABおよびCDは重複伸長によって遺伝子スプライシングを行って、単一の反応でヒト化産物を生成することができる。

【0170】

抗体を再形成するための突然変異誘発反応の後に、突然変異を誘発したDNAを、軽鎖または重鎖定常領域をコードする適切なDNAと連結し、発現ベクター中にクローニングして

10

20

30

40

50

、宿主細胞、好ましくは哺乳動物細胞にトランスフェクトすることができる。これらの段階はルーチ的な様式で行うことができる。したがって、再形成された抗体は、以下の段階を含む方法によって調製することができる：

(a) 可変ドメインがヒト抗体に由来するフレームワーク領域および本発明のヒト化抗体のために必要とされるCDRを含んでいる、Ig重鎖または軽鎖の少なくとも該可変ドメインをコードするDNA配列と機能的に連結された適したプロモーターを含む第1の複製可能な発現ベクターを調製する段階；

(b) 相補的なIg軽鎖または重鎖それぞれの少なくとも可変ドメインをコードするDNA配列と機能的に連結された適したプロモーターを含む第2の複製可能な発現ベクターを調製する段階；

(c) 第1の、または両方の調製したベクターによって細胞株を形質転換する段階；および

(d) 形質転換された細胞株を培養して改変抗体を産生させる段階。

#### 【0171】

好ましくは、段階(a)におけるDNA配列は、ヒト抗体鎖の可変ドメインおよび各定常ドメインの両方をコードしている。ヒト化抗体は、任意の適した組換え発現系を用いて調製することができる。改変抗体を産生するように形質転換される細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、または不死化哺乳動物細胞株であってよく、これは骨髓腫、ハイブリドーマ、トリオーマもしくはクアドローマ(quadroma)細胞株などのリンパ系起源のものが有利である。細胞株には、エプスタイン-バーウイルスなどのウイルスによる形質転換によって不死化されたB細胞などの正常なリンパ系細胞も含まれうる。最も好ましくは、不死化細胞株は骨髓腫細胞株またはその派生物である。

#### 【0172】

抗体の発現のために用いられるCHO細胞は、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)欠損性であり、それ故に増殖のためにチミジンおよびヒポキサンチンに依存するものでもよい。親のdhfr- CHO細胞株に対して、抗体をコードするDNA、およびdhfr陽性表現型のCHO細胞形質転換体の選択を可能にするdhfr遺伝子をトランスフェクトする。選択は、チミジンおよびヒポキサンチンを欠く培地上でコロニーを培養することによって行うが、これらが存在しないことにより、非形質転換細胞が増殖すること、および形質転換細胞が葉酸経路を再利用してそれ故に選択系を回避することが妨げられる。これらの形質転換体は通常、トランスフェクトされた関心対象のDNAおよびdhfrをコードするDNAの共組込み(co-integration)により、関心対象のDNAを低レベルで発現する。抗体をコードするDNAの発現レベルは、メトトレキサート(MTX)を用いた増幅によって高めることができる。この薬物は酵素dhfrの直接阻害薬であり、これらの条件下で生存するのに十分な程度にdhfr遺伝子コピー数を増幅する耐性コロニーの単離を可能にする。dhfrおよび抗体をコードするDNA配列は元の形質転換体において密に連結しているため、通常、同時に増幅が起こり、それ故に所望の抗体の発現が増加する。

#### 【0173】

CHOまたは骨髓腫細胞とともに用いるのに好ましい別の発現系は、WO 87/04462に記載されたグルタミンシンテターゼ(GS)増幅系である。この系は、酵素GSをコードするDNAおよび所望の抗体をコードするDNAによる細胞のトランスフェクションを含む。続いて、グルタミン非含有培地中で増殖し、それ故にGSをコードするDNAが組み込まれたと推測しうる細胞を選択する。続いて、これらの選択されたクローンを、メチオニンスルホキシミン(Msx)を用いた酵素GSの阻害に供する。細胞は、生存するために、GSをコードするDNAを増幅し、それに伴って抗体をコードするDNAの同時増幅が起こると考えられる。

#### 【0174】

ヒト化抗体を産生させるために用いられる細胞株は好ましくは哺乳動物細胞株であるが、細菌細胞株または酵母細胞株などの任意の他の適切な細胞株を用いることも可能である。特に、大腸菌(E.coli)由来の細菌株が用いられうると想定される。得られた抗体を機能に関して確かめる。機能が失われている場合には、段階(2)に戻って、抗体のフレー

10

20

30

40

50

ムワークを改変することが必要である。

【 0 1 7 5 】

ひとたび発現されると、硫酸アンモニウム沈降、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、当技術分野の標準的な手順に従って、本発明の抗体全体、その二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を回収および精製することができる（概論については、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.(1982)を参照）。薬学的用途には、均質度が少なくとも約90～95%の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98～99%またはそれ以上の均質度が最も好ましい。ひとたび部分的にまたは所望の均質度になるまで精製すると、続いてヒト化抗体を、治療的に、またはアッセイ手順、免疫蛍光染色などの開発および実施に用いることができる（概論については、Lefkovits and Pernis (編), Immunological Methods, Vols. I and II, Academic Press (1979 and 1981)を参照）。

10

【 0 1 7 6 】

Greenwoodら（1993）によって行われた研究により、ヒトエフェクター細胞による抗体のFc領域の認識を、免疫グロブリン分子の定常領域を人工的に操作することによって最適化できることが実証されている。これは、所望の特異性を有する抗体の可変領域遺伝子を、ヒト対象における有効な抗原依存性細胞傷害（ADCC）が実証されている免疫グロブリンアイソタイプ、例えばIgG1およびIgG3アイソタイプをコードするヒト定常領域遺伝子と融合させることによって達成しうると考えられる（Greenwood and Clark, Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man. Mike Clark (編), Academic Titles, Section II, p.85-113, (1993)）。その結果得られる、5B6に対するキメラ抗体またはヒト化抗体は、体液性免疫および/またはT細胞媒介性免疫を調節するのに特に有効であるはずである。

20

【 0 1 7 7 】

5B6に対する完全なヒト可変領域を有する抗体は、抗原負荷に応答してそのような抗体を産生するが、その内因性座位は能力を失っているように改変されたトランスジェニック動物に抗原を投与することによって調製されることもできる。抗体自体またはその類似体のいずれかを得るために、その後さまざまな操作を行うことができる（例えば、米国特許第6,075,181号を参照）。

【 0 1 7 8 】

抗体またはその断片をコードする遺伝子の調製

抗体、軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子の両方またはそれらの部分、例えば一本鎖Fv領域をコードする遺伝子は、ハイブリドーマ細胞株からクローニングすることができる。それらはすべて、例えばClontechによって製造されているような市販のキットを用いるRACEなどの同じ一般的戦略を用いてクローニングしうる。典型的には、例えば、ハイブリドーマ細胞から抽出したポリ(A)+ mRNAを、プライマーとしてランダムヘキサマーを用いて逆転写させる。Fv領域に関しては、V<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを、2つのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって別々に増幅する。重鎖配列は、抗5B6重鎖それぞれのアミノ末端タンパク質配列に従って設計された5'末端プライマー、およびコンセンサス免疫グロブリン定常領域配列に従った3'末端プライマーを用いて増幅しうる（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。軽鎖Fv領域は、抗5B6軽鎖のアミノ末端タンパク質配列に従って設計された5'末端プライマーをプライマーC- と組み合わせて用いて増幅する。当業者は、Fv領域を得るために多くの適したプライマーを用いることを理解すると考えられる。

30

40

【 0 1 7 9 】

PCR産物を適したクローニングベクター中にサブクローニングする。DNA制限による正確な大きさのインサートを含むクローンを同定する。続いて、クローニング部位に隣接した配列決定プライマーを用いて、二本鎖プラスミドDNAから重鎖または軽鎖のコード領域のヌクレオチド配列を決定することができる。DNAのシーケンシングを容易にするために

50

、市販のキット（例えば、Sequenase（商標）キット、United States Biochemical Corp.、Cleveland, Ohio, USA）を用いてもよい。Fv領域をコードするDNAを、例えば、PCRおよびLCRなどの増幅手法を含む、任意の適した方法によって調製することもできる。

【0180】

化学合成によって一本鎖オリゴヌクレオチドを生成させる。これを、相補的配列とのハイブリダイゼーションによって、または一本鎖をテンプレートとして用いるDNAポリメラーゼを用いる重合によって、二本鎖DNAに変換することができる。一本鎖Fv領域全体を化学合成することも可能であるが、多数の短い配列（約100～150塩基）を合成して、その後これらを連結することが好ましい。

【0181】

または、部分配列をクローニングして、適切な制限酵素を用いて適切な部分配列を切断することもできる。続いて、断片を連結して所望のDNA配列を生成させることができる。

【0182】

Fvの可変軽鎖および可変重鎖のDNAが得られると、それらの配列を、当業者に周知の手法を用いて、直接的にまたはペプチドリンカーをコードするDNA配列を介して、互いに連結することができる。1つの態様において、重鎖領域および軽鎖領域は、重鎖Fvドメインのカルボキシ末端から始まって軽鎖Fvドメインのアミノ末端で終わる可動性のペプチドリンカー（例えば、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ ）によって連結される。この配列全体は、一本鎖抗原結合タンパク質の形態にあるFvドメインをコードする。

【0183】

治療物質

5B6と結合する本発明の化合物は、治療物質を送達するために用いることができる。治療物質の例には、抗原、細胞傷害性物質、薬物および/または薬理学的物質が非限定的に含まれる。

【0184】

いくつかの態様において、治療物質は、5B6と結合する化合物と融合されたポリペプチドであってよい。5B6と結合する化合物を含む融合ポリペプチドは、当業者に公知の方法によって調製することができる。例えば、Fv領域をコードする遺伝子を、治療物質をコードする遺伝子と融合させる。任意で、Fv遺伝子はペプチドコネクターをコードするセグメントと連結される。ペプチドコネクターは、5B6と結合する化合物と治療物質との間に単に間隔を与えるために、またはこれらの領域間の可動性を助長してそれらがそれぞれその最適なコンフォメーションを達成することを可能にするために存在することができる。コネクターを含むDNA配列がまた、クローニングを容易にする配列（プライマー部位または制限部位など）を与えてもよく、または結合部分をコードする配列と治療物質をコードする配列との間でリーディングフレームを保たせてもよい。そのようなコネクターペプチドの設計は当業者に周知である。

【0185】

一般に、融合ポリペプチドの作製は、例えば、Fv軽鎖および重鎖ならびにそれらと融合させる任意の他のタンパク質をコードするDNAを別々に調製する段階、ならびにDNA配列をプラスミドまたは他のベクター中で組み換えて特定の所望の融合ポリペプチドをコードする構築物を形成する段階を含む。しかし、より簡単な1つのアプローチは、特定のFv領域をコードするDNAを、所望の第2のポリペプチドを既にコードしている構築物中に挿入する段階を含む。Fv領域をコードするDNA配列は、当業者に周知の手法を用いて構築物中に挿入される。

【0186】

5B6またはその断片と結合する化合物、例えば、Ab組換え一本鎖抗体の重鎖は、当業者に周知でありかつ利用可能な任意の方法によって、治療物質と融合させること、または別の様式で結合させることができる。2つの成分は、さまざまな周知の化学的手順のいずれかによって互いに化学結合させることができる。例えば、結合はヘテロ二官能性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなどによるものであってよい。さまざま

10

20

30

40

50

まな免疫毒素の製造、ならびに化学的結合 (conjugation) の方法は、当技術分野において周知である (例えば、"Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpe et al., Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, p. 168-190 (1982); Waldmann, 1991; Vitetta et al., 1987; Pastan et al., 1986; およびThorpe et al., 1987を参照)。

#### 【0187】

薬物および/または薬理学的物質の例には、DC活性化を促進する物質 (例えば、TLRリガンド)、DCの活性化または機能を抑制する物質 (例えば、キナーゼおよびホスファターゼなどのDCシグナル伝達分子の特異的な阻害物質または促進物質)、およびDCの死滅を調節する物質 (例えば、アポトーシスの促進物質または抑制物質) が非限定的に含まれる。そのような薬物および/または薬理学的物質は当業者に周知である。

10

#### 【0188】

当業者は、本発明の方法において細胞傷害性物質として用いるのに適した細菌性または植物性のポリペプチド毒素が数多くあることを認識していると考えられる。これらのポリペプチドには、天然型または改変型のシュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、リシン、アブリン、ゲロニン、モモルジンII、志賀毒素および志賀毒素様毒素のa鎖などの細菌RIP、ルフィン、アトリコサンチン (atrichosanthin)、モモルジンI、オシロイバナ属 (Mirabilis) 抗ウイルスタンパク質、ポークウィード抗ウイルスタンパク質、プリオジン2 (byodin 2) (米国特許第5,597,569号)、ガポリン (gaporin)、ならびに遺伝子操作されたそれらの変異体などのポリペプチドが非限定的に含まれる。天然型のシュードモナス外毒素およびジフテリア毒素は非常に毒性の強い化合物であり、典型的には肝臓毒性を介して死に到らしめる。好ましくは、シュードモナス外毒素およびジフテリア毒素は、毒素の天然のターゲティング成分、例えばシュードモナス外毒素のドメインIaおよびジフテリア毒素のB鎖が除去された形態に改変される。当業者は、本発明が特定の細胞傷害性物質に限定されないことを理解していると考えられる。

20

#### 【0189】

本発明における使用に適したその他の細胞傷害性物質には、細菌性または植物性の毒素、薬物などの物質、例えば、シクロホスファミド (CTX; サイトキサン)、クロランブシル (CHL; リューケラン)、シスプラチン (CisP; CDDP; プラチノール)、ブスルファン (ミレラン)、メルファラン、カルムスチン (BCNU)、ストレプトゾトシン、トリエチレンメラミン (TEM)、マイトマイシンC、およびその他のアルキル化剤; メトトレキサート (MTX)、エトポシド (VP-16; ベプシド)、6-メルカプトプリン (6MP)、6-チオグアニン (6TG)、シラタピン (Ara-C)、5-フルオロウラシル (5FU)、ダカルバジン (DTIC)、2-クロロデオキシアデノシン (2-CdA)、およびその他の代謝拮抗剤; アクチノマイシンD、ドキソルピシン (DXR; アドリアマイシン)、ダウノルピシン (ダウノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシンならびに他の抗生物質を含む抗生物質; ビンクリスチン (VCR)、ビンブラスチンなどのアルカロイド; ならびに、細胞分裂阻害薬、デキサメタゾン (DEX; デカドロン) などのグルココルチコイド、およびプレドニゾンなどのコルチコステロイド、ヒドロキシ尿素などのヌクレオチド酵素阻害薬を含むその他の抗癌剤などが非限定的に含まれる。

30

40

#### 【0190】

当業者は、5B6と結合する化合物と周知の手法によって結合させて、樹状細胞またはその前駆体の特異的に破壊するために送達することができる他の放射性同位体および化学的細胞傷害性物質が数多くあることを認識していると考えられる (例えば、米国特許第4,542,225号を参照)。光活性化毒素の例には、ジヒドロピリジン-コノトキシンおよび -コノトキシンが含まれる。用いる細胞傷害性試薬の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^9\text{mTc}$ および $^{32}\text{P}$ が含まれる。抗体は、当技術分野で周知の手法を用いて、そのような試薬で標識することができる。例えば、抗体の放射標識に関する手法については、Wenzel and Meares, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983)を参照されたい (Colcher et al., 1986; "Order, Analysis, Results and Future Prospective

50

of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (編), Academic Press, p. 303-16, (1985)も参照されたい)。

【0191】

1つの例では、インジウム-111またはイットリウム-90に対する高親和性キレート部位を与えるために、安定なチオ尿素共有結合によって、リンカー-キレーターチウキセタンを、5B6と結合する化合物と結合させる。

【0192】

抗原

「抗原」という用語はさらに、上記のものなどの公知の抗原または野生型抗原のペプチド類似体またはタンパク質類似体も範囲に含むことを意図している。類似体は野生型抗原よりも可溶性であるかまたはより安定的であってよく、また、抗原の免疫学的活性をより高める突然変異または修飾も含んでよい。本発明において同じく有用であるのは、所望の抗原のアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列を有するペプチドまたはタンパク質であり、この相同抗原は各々の腫瘍または生物に対する免疫応答を誘導する。

【0193】

「癌抗原」とは、本明細書で用いる場合、腫瘍細胞または癌細胞に随伴し、MHC分子の状況下で抗原提示細胞の表面上に発現された時に免疫応答を誘発することができる、分子または化合物（例えば、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、脂質、糖脂質、糖質および/またはDNA）のことである。癌抗原には、自己抗原のほか、癌に特異的に随伴しない可能性もあるが、にもかかわらず動物に対して投与された場合に腫瘍細胞もしくは癌細胞に対する免疫応答を誘導および/もしくは強化する、および/または腫瘍細胞もしくは癌細胞の増殖を低下させる他の抗原も含まれる。

【0194】

「病源性および/または感染性生物由来の抗原」とは、本明細書で用いる場合、任意の生物の抗原のことであり、これには感染性ウイルス、感染性細菌、原生動物（シュードモナス属など）および蠕虫類を含む感染性寄生生物ならびに感染性真菌が非限定的に含まれる。典型的には、本発明における使用のためには、抗原は、生物由来のタンパク質もしくはその抗原性断片、または、対応する生物に対して特異的な免疫応答を誘導する、天然に存在する抗原と同一であるか類似している合成化合物である。天然に存在する生物抗原に類似している化合物または抗原は、当業者に周知である。天然に存在する生物抗原に類似している化合物の非限定的な例は、多糖抗原のペプチド模倣物である。

【0195】

癌抗原の具体的な態様には、例えば、Ras p21原癌遺伝子、腫瘍抑制因子p53およびHER-2/neuおよびBCR-abl癌遺伝子のタンパク質産物、ならびにCDK4、MUM1、カスパーゼ8およびカテニンといった突然変異抗原；ガレクチン4、ガレクチン9、炭酸脱水酵素、アルドラーゼA、PRAME、Her2/neu、ErbB-2およびKSA、フェトプロテイン（AFP）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）などの癌胎児性抗原といった過剰発現性抗原；胎児性癌抗原（CEA）などの自己抗原、ならびにMart 1/Melan A、gp100、gp75、チロシナーゼ、TRP1およびTRP2などのメラノサイト分化抗原；PSA、PAP、PSMA、PSM-P1およびPSM-P2などの前立腺関連抗原；MAGE 1、MAGE 3、MAGE 4、GAGE 1、GAGE 2、BAGE、RAGEなどの再活性化された胎児性遺伝子産物、ならびにNY-ESO1、SSX2およびSCP1などの他の癌精巢抗原；Muc-1およびMuc-2などのムチン；GM2、GD2およびGD3などのガングリオシド、中性糖脂質ならびにルイス（y）およびグロボH（globo-H）などの糖タンパク質；ならびにTn、トンプソン-フライデンライヒ（Thompson-Freidenreich）抗原（TF）およびsTnなどの糖タンパク質。

【0196】

癌抗原およびそれらの各々の腫瘍細胞標的には、例えば、癌に関する抗原としてのサイトケラチン、特にサイトケラチン8、18および19が含まれる。上皮膜抗原（EMA）、ヒト胎児性抗原（HEA-125）、ヒト乳脂肪球、MBr1、MBr8、Ber-EP4、17-1A、C26およびT16も公知の癌抗原である。デスミンおよび筋特異的アクチンは筋原性肉腫の抗原である。胎盤性

10

20

30

40

50

アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ヒト絨毛性ゴナドトロピンおよび $\alpha$ -フェトプロテインは、栄養膜細胞および生殖細胞腫瘍の抗原である。前立腺特異的抗原は前立腺癌の抗原であり、胎児性癌抗原は結腸腺癌のものである。HMB-45は黒色腫の抗原である。子宮頸癌では有用な抗原はヒトパピローマウイルスによってコードされている可能性が考えられる。クロモグラニン-A (Chromagranin-A) およびシナプトフィジンは、神経内分泌腫瘍および神経外胚葉性腫瘍の抗原である。特に関心の対象であるのは、壊死領域を有する固形腫瘍塊を形成する悪性度の高い腫瘍である。

#### 【0197】

ある種の癌の素因となることが知られている病原体に由来する抗原も、本発明において有利に用いることができる。本明細書で提供する癌ワクチンにおける使用に関して特に関心の対象となる病原体には、B型肝炎ウイルス（肝細胞癌）、C型肝炎ウイルス（ヘパトーマ）、エプスタイン-バーウイルス（EBV）（バーキットリンパ腫、鼻咽頭癌、免疫抑制状態にある個体におけるPTLD）、HTLV（成人T細胞白血病）、発癌性ヒトパピローマウイルス16型、18型、33型、45型（成人子宮頸癌）およびヘリコバクター-ピロリ菌（*Helicobacter pylori*）（B細胞性胃リンパ腫）が含まれる。哺乳動物、より具体的にはヒトにおいて抗原として役立つ可能性のあるその他の医学的な重要性のある微生物は、文献中に、例えばC. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, (1983)に広範に記載されている。

#### 【0198】

例示的なウイルス病原体には、哺乳動物、より具体的にはヒトを感染させる感染性ウイルスが非限定的に含まれる。感染性ウイルスの例には、以下が非限定的に含まれる：レトロウイルス科（Retroviridae）（例えば、ヒト免疫不全ウイルス、HIV-1（HTLV-III、LAVまたはHTLV-III / LAVまたはHIV-IIIとも呼ばれる；およびHIV-LPなどの他の分離株；ピコルナウイルス科（Picornaviridae）（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（Caliciviridae）（例えば、胃腸炎を引き起こす系統）；トガウイルス科（Togaviridae）（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（Flaviviridae）（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（Coronaviridae）（例えば、SARSコロナウイルスなどのコロナウイルス）；ラブドウイルス科（Rhabdoviridae）（例えば、水疱性口炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（Filoviridae）（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（Paramyxoviridae）（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（Orthomyxoviridae）（例えば、インフルエンザウイルス）；ブンガウイルス科（Bunyaviridae）（例えば、ハンタンウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス）；アレナウイルス科（Arenaviridae）（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（Reoviridae）（例えば、レオウイルス、オルビウイルス（orbivirus）およびロタウイルス）；ビルナウイルス科（Birnaviridae）；ヘパドナウイルス科（Hepadnaviridae）（B型肝炎ウイルス）；バルボウイルス科（Parvoviridae）（パルボウイルス）；パポバウイルス科（Papovaviridae）（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（Adenoviridae）（ほとんどのアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（Herpesviridae）単純ヘルペスウイルス（HSV）1および2、水痘ウイルス、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（Poxviridae）（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（Iridoviridae）（例えば、アフリカブタ熱ウイルス）；および未分類ウイルス（例えば、海綿状脳症の病原性因子、デルタ型肝炎の病因（B型肝炎ウイルスの欠損性従位物（defective satellite）と考えられる）、非A非B型肝炎の病因（クラス1=内部的に伝染；クラス2=非経口的に伝染（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、ならびにアストロウイルス）。

#### 【0199】

また、グラム陰性菌およびグラム陰性菌を、脊椎動物における主題組成物および方法に



よる標的とすることもできる。そのようなグラム陽性菌には、パストツレラ属 (*Pasteurella* sp.)、ブドウ球菌属 (*Staphylococci* sp.) および連鎖球菌属 (*Streptococcus* sp.) が非限定的に含まれる。グラム陰性菌には、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) およびサルモネラ属 (*Salmonella* sp.) が非限定的に含まれる。感染性細菌の具体的な例には、以下が非限定的に含まれる：ヘリコバクター-ピロリ (*Helicobacter pylori*)、ライム病ボレリア (*Borella burgdorferi*)、レジオネラ菌 (*Legionella pneumophila*)、マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium* sp.) (例えば、結核菌 (*M. tuberculosis*)、マイコバクテリウム-アビウム (*M. avium*)、マイコバクテリウム-イントラセルラーレ (*M. intracellulare*)、マイコバクテリウム-カンサイイ (*M. kansaii*)、マイコバクテリウム-ゴルドナエ (*M. gordonae*) など)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス-アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、連鎖球菌 (ピリダンス群)、糞便連鎖球菌 (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス-ボビス (*Streptococcus bovis*)、連鎖球菌 (嫌気性属)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター属 (*Campylobacter* sp.)、腸球菌属 (*Enterococcus* sp.)、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 (*Corynebacterium* sp.)、ブタ丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、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*)、パストツレラ-ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides* sp.)、フソバクテリウム-ヌクレアツム (*Fusobacterium nucleatum*)、ストレプトバシラス-モニリフォルミス (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、トレポネーマ-ペルテヌエ (*Treponema pertenuis*)、レプトスピラ属 (*Leptospira*)、リケッチア属 (*Rickettsia*) およびアクチノマイセス-イスラエリ (*Actinomyces israelii*)。

10

20

30

40

50

#### 【0200】

主題組成物における抗原の供給源としての使い道がある可能性のある細菌性病原体のポリペプチドには、以下が非限定的に含まれる：フルンケル症の原因となるエロモナス-サルモニシダ (*Aeromonis salmonicida*) の鉄調節外膜タンパク質 (「IROMP」)、外膜タンパク質 (「OMP」) およびAタンパク質、細菌性腎臓病 (BKD) の原因となるレニバクテリウム-サーモニナラム (*Renibacterium salmoninarum*) のp57タンパク質、エルシニア症 (*Yersiniosis*) の主要表面関連抗原 (「msa」)、表面発現細胞毒素 (「mpr」)、表面発現溶血素 (「ish」) および鞭毛抗原；パストツレラ症 (*Pasteurellosis*) の細胞外タンパク質 (「ECP」)、鉄調節外膜タンパク質 (「IROMP」) および構造タンパク質；ビブリオ-アングイラルム (*Vibrios anguillarum*) およびビブリオ-オルダリイ (*V. ordalii*) のOMPおよび鞭毛タンパク質；エドワジエラ-イクタルリ (*Edwardsiella ictaluri*) およびエドワジエラ-タルダ (*E. tarda*) の鞭毛タンパク質、OMPタンパク質、aroAおよびpurA；ならびにイクチオフチリウス属 (*Ichthyophthirius*) の表面抗原；ならびにサイトファーマ-カラムナリ (*Cytophaga columnari*) の構造タンパク質および調節タンパク質；ならびにリケッチアの構造タンパク質および調節タンパク質。この種の抗原は、組換え的に、または当技術分野で公知の任意の他の手段によって単離または調製することができる。

#### 【0201】

病原体の例にはさらに、哺乳動物、より具体的にはヒトを感染させる感染性真菌および寄生生物が非限定的に含まれる。感染性真菌の例には、以下が非限定的に含まれる：クリプトコッカス-ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラスマ-カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、コクシジオイデス-イミティス (*Coccidioides immitis*)、ブラストミセス-デルマティティディス (*Blastomyces dermatitidis*)、クラミジア-トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) およびカンジダ-アルビカンズ (*Candida a*

lbicans)。

【0202】

寄生生物の例には、細胞内寄生生物および偏性細胞内寄生生物が含まれる。寄生生物の例には、以下が非限定的に含まれる：熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、卵形マラリア原虫 (*Plasmodium ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、二日熱マラリア原虫 (*Plasmodium knowlesi*)、ネズミバベシア (*Babesia microti*)、バベシア原虫 (*Babesia divergens*)、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*)、トキソプラズマ-ゴンディ (*Toxoplasma gondii*)、旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)、森林型熱帯リーシュマニア (*Leishmania major*)、ドノバン-リーシュマニア (*Leishmania donovani*)、ブラジル-リーシュマニア (*Leishmania braziliensis*)、皮膚リーシュマニア (*Leishmania tropica*)、ガンビアトリパノソーマ (*Trypanosoma gambiense*)、ローデシアトリパノソーマ (*Trypanosoma rhodesiense*)、バンクロフト系状虫 (*Wuchereria bancrofti*)、マレー系状虫 (*Brugia malayi*)、チモール系状虫 (*Brugia timori*)、回虫 (*Ascaris lumbricoides*)、回旋系状虫 (*Onchocerca volvulus*) およびマンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)。

10

20

30

【0203】

哺乳動物、より具体的にはヒトにおいて抗原として役立つ可能性のあるその他の医学的な重要性のある微生物は、文献中に広範に記載されており、例えば、C. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, (1983)を参照されたい。ヒトの感染症およびヒト病原体の治療に加えて、本発明の組成物および方法は、非ヒト哺乳動物の感染を治療するためにも有用である。例示的な非ヒト病原体には、以下が含まれる：マウス乳腺癌ウイルス (「MMTV」)、ラウス肉腫ウイルス (「RSV」)、トリ白血病ウイルス (「ALV」)、トリ骨髄芽球症ウイルス (「AMV」)、マウス白血病ウイルス (「MLV」)、ネコ白血病ウイルス (「FeLV」)、マウス肉腫ウイルス (「MSV」)、テナガザル白血病ウイルス (「GALV」)、脾臓壊死ウイルス (「SNV」)、細網内皮症ウイルス (「RV」)、サル肉腫ウイルス (「SSV」)、メーソン-ファイザーサルウイルス (「MPMV」)、サルレトロウイルス1型 (「SRV-1」)、HIV-1、HIV-2、SIV、ビスナウイルス、ネコ免疫不全ウイルス (「FIV」) およびウマ伝染性貧血ウイルス (「EIAV」) などのレンチウイルス、HTLV-1、HTLV-II、サルT細胞白血病ウイルス (「STLV」) およびウシ白血病ウイルス (「BLV」) などのT細胞白血病ウイルス、ならびにヒト泡沫状ウイルス (「HFV」)、サル泡沫状ウイルス (「SFV」) およびウシ泡沫状ウイルス (「BFV」) などの泡沫状ウイルス。

【0204】

検出可能な標識

5B6と結合する化合物は、広範囲にわたる検出系に用いることができる。例えば、化合物を、対象の内部領域を画像化するため、および/または対象における疾患の有無を診断するために用いることができる。例えば、5B6と結合する化合物は、5B6を発現する細胞が役割を果たしている疾患の診断のために用いることができる。

【0205】

本発明の診断的または予後判定的な方法が、患者試料中に存在する5B6のレベルまたは5B6のレベルを発現する細胞のレベルを決定するためのある程度の定量を含むことは、当業者には明らかであると考えられる。そのような定量は、適切な対照試料を含めることによって容易に与えられる。

40

【0206】

好ましくは、内部対照を本発明の方法に含める。好ましい内部対照は、1例または複数の健常個体から採取した1つまたは複数の試料である。

【0207】

5B6と結合する化合物は、診断的に用いる場合、インビトロまたはインビボでの結合イベントの容易な検出を可能にするための検出可能な標識などの診断的試薬と連結させることができる。適した標識には、ビオチン、酵素、化学発光分子、発蛍光団、色素マーカー、または標的分子の検出および/もしくは位置決定のための他の画像化試薬といった放射

50

性同位体または非放射性標識が含まれる。または、化合物と結合する第2の標識抗体またはアビジン（例えば）を検出のために用いることもできる。

【0208】

酵素イムノアッセイの場合には、酵素を、一般的にはグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸によって第2の抗体と結合させる。しかし、容易に理解され则认为られるが、当業者にとって容易に利用可能な、多種多様にわたる結合（conjugation）手法が存在する。よく用いられる酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼが特に含まれる。特定の酵素とともに用いることになる基質は、一般に、対応する酵素によって加水分解を受けると検出可能な色の変化を生じるように選択される。適した酵素の例には、アルカリホスファターゼおよびペルオキシダーゼが含まれる。また、上述したような発色基質ではなくて蛍光産物を生じる、蛍光発生基質を用いることも可能である。

10

【0209】

別の例では、フルオレセインおよびローダミンなどの、ただしこれらには限定されない蛍光化合物を、例えば抗体と、それらの結合能力を変化させることなしに化学的に結合させることができる。特定の波長の光による照射で活性化されると、蛍光色素で標識された抗体が光エネルギーを吸収して、分子における励起状態を誘導し、光学顕微鏡で視覚的に検出可能な特徴的な色の光を発する。

【0210】

さらに別の非限定的な例として、5B6と結合する化合物を造影剤と結合させたものを、組織化学的な組織切片における5B6発現の検出に用いることもできる。化合物は、適した超磁性（supermagnetic）標識、常磁性標識、高電子密度標識、エコー源性標識、放射性標識、またはビオチンもしくはアビジンのような非放射性標識と共有的または非共有的に結合させることができる。

20

【0211】

標識された樹状細胞またはその前駆体の検出および単離

本明細書で用いる場合、「濃縮すること（enriching）」および「濃縮された（enriched）」という用語は、処置された試料中での非樹状細胞またはその前駆体に対する樹状細胞またはその前駆体の相対濃度が同等な非処置試料よりも大きくなるような樹状細胞またはその前駆体の単離を範囲に含むように、それらの最も広い意味で用いられる。好ましくは、濃縮された樹状細胞および/またはその前駆体は、元の試料から得られた試料中の非樹状細胞またはその前駆体の少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%から分離されている。最も好ましくは、濃縮された細胞集団は、非樹状細胞またはその前駆体を全く含まない（つまり、純粋である）。「濃縮する（enrich）」という用語および変形物は、本明細書中で、「単離する（isolate）」という用語およびその変形物と互換的に用いられる。さらに、本発明の方法を用いて濃縮された細胞の集団が、単一の樹状細胞またはその前駆体のみを含んでもよい。加えて、本発明の濃縮方法を、単一の樹状細胞またはその前駆体を単離するために用いることもできる。

30

40

【0212】

樹状細胞またはその前駆体は、細胞選別、特に蛍光活性化細胞選別（FACS）を含む当技術分野で周知の種々の手法によって、基体（例えば、パニングにおけるようなプラスチック表面）に結合させた親和性試薬を用いることによって、または、ビーズ（例えば、着色されたラテックスビーズまたは磁性粒子）の特性に基づいて単離しうる固相粒子に結合させた親和性試薬を用いることによって、試料から濃縮することができる。当然ながら、樹状細胞および/またはその前駆体を濃縮するために用いられる手順は、細胞がいかにして標識されているかに依存すると考えられる。

50

## 【0213】

1つの例では、細胞選別装置にとって適切な特徴（例えば、蛍光色素の場合には、選別装置の光源によって励起されうる色素、および細胞選別装置の検出器によって検出されうる発光スペクトル）を有する任意の検出可能な物質を用いることができる。フローサイトメトリーでは、細胞または他の粒子を含む液体流にレーザー光のビームを透過させて投射し、それらが集束光に当たって信号を生じた時にそれらを検出器によって拾い上げる。続いて、これらの信号はコンピュータ記憶およびデータ解析のために変換されて、さまざまな細胞特性に関する情報を提供することができる。適した色素によって標識された細胞はレーザービームによって励起され、特徴的な波長の光を発する。この発せられた光を検出器によって拾い上げ、これらのアナログ信号をデジタル信号に変換することで、それらの記憶、解析および表示が可能になる。

10

## 【0214】

蛍光活性化細胞選別装置（FACS）などの多くのより大型のフローサイトメーターも同じく「細胞選別装置」であり、細胞を特定の集団からチューブ内または他の収集容器内に選択的に回収させる能力を有する装置も同様である。1つの特に好ましい態様において、細胞はFACSを用いて単離される。この手順は当技術分野で周知であり、例えば、Melamed et al., Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss, Inc., (1990); Shapiro, Practical Flow Cytometry, 4th Edition, Wiley-Liss, Inc., (2003); およびRobinson et al., Handbook of Flow Cytometry Methods, Wiley-Liss, Inc. (1993)に記載されている。

## 【0215】

20

細胞を選別するために、装置の電子機器は、レーザービームによって調べられた各細胞について収集された信号を解釈し、その信号をコンピュータ上に設定された選別基準と比較する。細胞が必要な基準を満たすならば、電荷が液体流に加えられ、それは細胞を含む液滴へと正確に分けられる。この電荷は、関心対象の細胞が流れから離脱しようとするまさにその瞬間に流れに対して加えられ、荷電した液滴が流れから分かれた後は取り除かれる。液滴が降下するのに伴って、それらは強く正または負に荷電した2枚の金属プレートの間を通過する。荷電した液滴は反対の極性を有する金属プレートの方に引き寄せられて、さらなる検査のために、収集容器内に、または顕微鏡スライド上に回収される。

## 【0216】

細胞は、例えば、レーザー、例えばアルゴンレーザー（488nm）などを用いて、および例えばAutocloneユニット（Coulter EPICS Altra, Beckman-Coulter, Miami, Fla., USA）が装着されたフローサイトメーターにより、単一の細胞として、または複数の細胞として、収集容器内に自動的に回収させることができる。本発明の方法のために有用な適したFACS機器のその他の例には、MoFlo（商標）High-speed cell sorter（Dako-Cytomation Ltd）、FACS Aria（商標）（Becton Dickinson）、FACS Diva（Becton Dickinson）、ALTRA（商標）Hyper sort（Beckman Coulter）およびCyFlow（商標）sorting system（Partec GmbH）が非限定的に含まれる。

30

## 【0217】

固相粒子を用いた、試料からの樹状細胞および/またはその前駆体の濃縮には、所望の特性を備えた任意の粒子を利用することができる。例えば、沈殿が容易になるように、大きな粒子（例えば、直径が約90~100 μmを上回る）を用いてもよい。好ましくは、粒子は「磁性粒子」（すなわち、磁場を用いて収集することができる粒子）である。標識された細胞はカラム中に保たれる（磁場によって保持される）が、非標識細胞はそのまま通過してもう一方の端から溶出する。磁性粒子は現在、Dynal Biotech（Oslo, Norway）およびMilteni Biotech GmbH（Germany）を含む種々の製造元から販売されている。磁性細胞選別（MACS）の一例は、Al-Mufti et al.（1999）によって提示されている。

40

## 【0218】

また、レーザー捕捉マイクロダイセクションを、本発明の方法を用いて、標識された樹状細胞またはその前駆体をスライド上に選択的に濃縮するために用いることもできる。レーザー捕捉マイクロダイセクションを用いる方法は、当技術分野で公知である（例えば、

50

米国特許第20030227611号およびBauer et al, 2002を参照)。

【0219】

濃縮の後には、細胞を直ちに用いること、または樹状細胞および/もしくはその前駆体の数を増やすために当技術分野で公知の手法を用いてインピトロで培養することができる。さらに、成熟樹状細胞を生じさせるために樹状細胞前駆体を培養することもできる。

【0220】

5B6と結合する化合物の同定

5B6と結合し、それ故に例えば治療物質との会合用のターゲティング物質(targeting agent)として有用な化合物、および/または5B6と結合してその生物活性を直接的に阻害するか拮抗させる化合物を同定することができる、被験化合物のスクリーニングの方法は記載されている。 10

【0221】

5B6活性の阻害物質は、5B6ポリペプチドと結合することができ、その結果として樹状細胞またはその前駆体におけるその生物活性を阻害することができる薬物を同定する上で有用なアッセイおよび手法の行使によってスクリーニングされる。そのようなアッセイには、5B6ポリペプチドを発現させるためのファージディスプレイのための哺乳動物細胞株(例えば、CHO細胞または293T細胞)の使用、および、見込みのある結合性化合物の結合試験のためのタンパク質を産生させるために、初代細胞もしくは親細胞株またはトランスフェクトされた哺乳動物細胞または大腸菌もしくは他の微生物を用いることが含まれる。

【0222】

その他の従来の薬物スクリーニング手法は、本発明のタンパク質、抗体またはポリヌクレオチド配列を用いて行われる。一例として、本発明の5B6ポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するための1つの方法は、被験化合物と5B6との結合が可能になるように、5B6を発現する選択された細胞を被験化合物と接触させる段階、および、5B6と結合する被験化合物がもしあればその量を決定する段階を単に含む。そのような方法は、被験化合物と固体支持体上に固定化された5B6ポリペプチドとのインキュベーションを伴う。典型的には、固定化された化合物を含む表面を、タンパク質を含む溶液と接触するようにさせ、適切な任意の適切な検出システムを用いて結合を測定する。適した検出システムは当技術分野で公知であり、そのいくつかは本明細書に記載されている。 20

【0223】

5B6と結合する抗体またはその断片を作製するための方法は上述している。 30

【0224】

コンピュータモデリングおよび検索の技術は、本発明のポリペプチドと結合しうる化合物の同定を可能にする。5B6またはその活性部位の三次元幾何構造を決定することができる。これは、完全な分子構造を決定することができる、X線結晶学を含む公知の方法によって行うことができる。

【0225】

コンピュータ利用による数値モデリングの方法は、構造(例えば、不完全な、または正確さが十分でない構造が決定される態様において)を完成させるため、またはその精度を向上させるために用いることができる。タンパク質もしくは核酸などの特定の生体高分子に対して特異的なパラメーター化モデル、分子の動きの計算に基づく分子動態モデル、熱アンサンブルに基づく統計力学モデル、または複合モデルを非限定的に含む、当技術分野で認知されている任意の方法を用いることができる。 40

【0226】

5B6の三次元構造は、GRAM、DOCKまたはAUTODOCK(Dunbrack et al, 1997)などのドッキングプログラムを用いたコンピュータモデリングの使用を通じて、アンタゴニストまたはアゴニストを同定するために用いることができる。また、コンピュータプログラムを、候補化合物とポリペプチドとの引力、斥力および立体障害を予測するために用いることもできる。一般に、適合が強固である(例えば、立体障害がより少ない、および/または引力がより大きい)ほど、これらの特性はより強固な結合定数に一致することから、見込み 50

のあるアゴニストまたはアンタゴニストはより効力が大きいと考えられる。さらに、見込みのあるアゴニストまたはアンタゴニストの設計における特異性がより高いほど、それが他のタンパク質と干渉する可能性はより低いと考えられる。

【0227】

最初に、見込みのある化合物を、例えば、組換えバクテリオファージによって作製されるランダムペプチドライブラリーまたは化学ライブラリーのスクリーニングなどによる本発明の方法を用いて入手することが可能と考えられる。続いて、このようにして選択された化合物を、1つまたは複数の有望な見込みのある化合物が同定されるまで、コンピュータモデリングプログラムによって系統的に修飾する。

【0228】

そのようなコンピュータモデリングは、作り出しうると考えられる無数の本質的にランダムな化学修飾とは反対に、有限数の合理的化学修飾の選択を可能にし、その中の任意のものが有用なアゴニストまたはアンタゴニストを導きうる可能性があると考えられる。それぞれの化学修飾は、追加の化学的段階を必要とし、それは有限数の化合物の合成については妥当であるが、見込みのあるすべての修飾物を合成する必要があるならば直ちに手に負えなくなる。このため、三次元構造モデリングおよびコンピュータモデリングの使用により、これらの多数の化合物をコンピュータのモニタスクリーン上で迅速にスクリーニングすることができ、無数の化合物を労力をかけて合成することなしに、可能性のある少数の候補化合物を決定することができる。

【0229】

ほとんどの型のモデルについては、構成原子および原子団の間の力を表す標準的な分子力場が必要であり、物理化学で公知な力場から選択することができる。当技術分野で公知であり、そのような方法に用いることができる例示的な力場には、定原子価 (Constant Valence) 力場 (CVFF)、AMBER力場およびCHARM力場が非限定的に含まれる。不完全な、またはより正確でない試行的構造は、これらのモデリング方法によって計算される完全でより正確な構造に対する拘束条件として役立てることができる。

【0230】

分子モデリングシステムのさらなる例には、CHARMmプログラムおよびQUANTAプログラム (Polygen Corporation, Waltham, MA) がある。CHARMmはエネルギー最小化および分子動態学の機能を実行する。QUANTAは分子構造の構築、グラフィックモデリングおよび解析を実行する。QUANTAは分子相互の挙動の対話型構築、修飾、可視化および解析を可能にする。

【0231】

微生物の寄託の詳細

ハイブリドーマ20/05-3A4-26-16-クローン5およびハイブリドーマ23/05-4C6-29-3-クローンは、ヒトC型レクチンクローン5B6に対するモノクローナルAbを分泌するハイブリドーマである。

【0232】

ハイブリドーマ24/04-10B4-24-8-FACS 9-5およびハイブリドーマ42/04-42D2-66-4-1-クローン4は、マウスC型レクチンクローン5B6に対するモノクローナルAbを分泌するハイブリドーマである。ハイブリドーマ24/04-10B4-24-8-FACS 9-5も、ヒトC型レクチン (lectin) クローン5B6に対するモノクローナル抗体を分泌する。

【0233】

抗体24/04-10B4、42/04-42D2、20/05-3A4および23/05-4C6は、2007年12月11日にEuropean Collection of Cell Cultures (ECACC) にそれぞれ寄託参照番号07121101、07121102、07121103および07121104の下で24/04-10B4-24-8、42/04-42D2-66-4-1、20/05-3A4-26-16、23/05-4C6-29-3として寄託されているハイブリドーマ細胞株によって産生される。

【0234】

上記のハイブリドーマの抗体分泌性のより高いサブクローン (24/04-10B4-24-8-FACS 9-5、42/04-42D266-4-1-クローン4、20/05-3A4-26-16-クローン5、23/05-4C6-29-3-クロー

10

20

30

40

50

ン5)は、2008年4月29日にECACCに寄託されており、以下の番号が指定されている。

- ・ハイブリドーマ24/04-10B4-24-8-FACS 9-5 アクセッション番号08042901、
- ・ハイブリドーマ42/04-42D2-66-4-1クローン4 アクセッション番号08041902、
- ・ハイブリドーマ20/05-3A4-26-16-クローン5 アクセッション番号08042903、および
- ・ハイブリドーマ23/05-4C6-29-3-クローン5 アクセッション番号08042904。

#### 【0235】

これらの寄託は、特許手続きのための微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約およびその下での規約の条項に基づいて行われた。これは、寄託日から30年間にわたり、生存可能な培養物が維持されることを保証するものである。生物はブダペスト条約の規定に従い、ECACCによって提供されるものとする。

10

#### 【0236】

本出願の譲受人は、寄託された培養物が、適した条件下で育成されていた場合に死滅または損失または破壊を受けた場合には、通知後直ちに、それを同じ培養物の生存可能な標本と取り替えることに同意している。寄託された系統の入手可能性は、特許法に従ってあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施することの認可であるとみなされるべきではない。

#### 【0237】

#### ポリペプチド

「実質的に精製された」または「精製された」により、本発明者らは、その天然の状態にあるポリペプチドに付随する、1つまたは複数の脂質、核酸、他のポリペプチドまたは他の混入性分子から分離されたポリペプチドを意味する。好ましくは、実質的に精製されたポリペプチドは、それに天然で付随する他の成分の少なくとも60%を含まず、より好ましくは少なくとも75%を含まず、より好ましくは少なくとも90%を含まない。

20

#### 【0238】

ポリペプチドの文脈における「組換え」という用語は、細胞によって、または無細胞発現系において、その天然の状態と比較して変化した量または変化した速度で産生されるポリペプチドのことを指す。1つの態様において、細胞は、そのポリペプチドを天然では産生しない細胞である。しかし、細胞が、変化したまたは好ましくは増加した量のポリペプチドを産生させる原因となる非内因性遺伝子を含む細胞であってもよい。本発明の組換えポリペプチドには、それが産生されるトランスジェニック（組換え）細胞または無細胞発現系の他の成分から分離されていないポリペプチド、および、その後少なくとも一部の他の成分から精製される、そのような細胞または無細胞系で産生されたポリペプチドが含まれる。

30

#### 【0239】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は一般に互換的に用いられ、単一のポリペプチド鎖のことを指すが、それは非アミノ酸基の付加によって修飾されてもよく、修飾されていなくてもよい。そのようなポリペプチド鎖は、他のポリペプチドもしくはタンパク質、または補因子などの他の分子と会合してもよい。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書で用いる場合、本明細書に記載したポリペプチドの変異体、突然変異体、生物活性断片、修飾物、類似体および/または誘導体も含む。

40

#### 【0240】

ポリペプチドの一致率(%identity)は、GAP(Needleman and Wunsch, 1970)分析(GCGプログラム)によって、ギャップクリエーションペナルティ(gap creation penalty)=5およびギャップ伸長ペナルティ=0.3を用いて決定される。クエリー配列は少なくとも25アミノ酸長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも25アミノ酸の領域にわたって整列化する。より好ましくは、クエリー配列は少なくとも50アミノ酸長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも50アミノ酸の領域にわたって整列化する。より好ましくは、クエリー配列は少なくとも100アミノ酸長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも100アミノ酸の領域にわたって整列化する。さらにより好ましくは、クエリー配列は少なくとも200アミノ酸長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも200アミノ酸の領域にわたって整列化する。

50

る。さらにより好ましくは、GAP分析は2つの配列をその全長にわたって整列化する。

【0241】

本明細書で用いる場合、「生物活性断片」とは、完全長ポリペプチドの規定された活性を維持している、本明細書に記載したようなポリペプチドの一部である。生物活性断片は、それらが規定された活性を維持している限り、任意のサイズであってよい。好ましくは、生物活性断片は、少なくとも100アミノ酸長である。1つの好ましい態様において、生物活性断片は、樹状細胞などの細胞によって発現される完全長5B6タンパク質と結合することができる。1つの特に好ましい態様において、生物活性断片は、樹状細胞などの細胞によって発現される完全長5B6タンパク質と結合することができる可溶性断片である。そのような可溶性生物活性断片の例には、5B6のCTLD領域を含むものの、SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つの少なくとも約40個、少なくとも約50個または少なくとも約55個または少なくとも約100個のN末端残基を欠くものが含まれる。加えて、本発明のポリペプチドの可溶性生物活性断片の例は、SEQ ID NO: 58~61にも提示されている。さらに、本発明のポリペプチドの可溶性生物活性断片を含む融合タンパク質の例は、図11A (SEQ ID NO: 38~41) にも提示されている。

10

【0242】

本明細書で用いる場合、「抗原性断片」とは、完全長の天然のポリペプチドと結合すると考えられる抗体の産生を誘導するために、動物、例えばマウス、ウサギまたはヒトに対して投与することができる、本明細書に記載したようなポリペプチドのタンパク質のことである。

20

【0243】

本明細書で用いる場合、「抗原結合断片」とは、完全長分子と同じ抗原と結合することができる、本明細書で定義した抗体の一部のことを指す。

【0244】

定義したポリペプチドに関して、以上に提示したものを上回る数値を示す一致率が、好ましい態様の範囲に含まれることは理解され则认为られる。したがって、適用可能な場合には、最小限の一致率の数値に照らし合わせて、ポリペプチドは、関連する指定したSEQ ID NOに対して少なくとも50%、より好ましくは少なくとも55%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.1%、より好ましくは少なくとも99.2%、より好ましくは少なくとも99.3%、より好ましくは少なくとも99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%、より好ましくは少なくとも99.6%、より好ましくは少なくとも99.7%、より好ましくは少なくとも99.8%、さらにより好ましくは少なくとも99.9%同一なアミノ酸配列を含むことが好ましい。

30

【0245】

本発明のポリペプチドには、5B6ならびにその断片および変異体のほかに、5B6と結合するポリペプチド、例えば抗体、天然型または組換え型のリガンド/結合パートナーなども含まれ、それらは検出可能な標識、または抗原もしくはタンパク質毒素といった他のポリペプチドと結合/融合されていてもいなくてもよい。

40

【0246】

本明細書に記載したポリペプチドのアミノ酸配列突然変異体は、本明細書で定義した核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、または所望のポリペプチドのインピットロ合成によって調製することができる。そのような突然変異体は、アミノ酸配列内部の残基の欠失、挿入または置換を含む。最終的なタンパク質産物が所望の特徴を有することを条件として、最終構築物に達するために欠失、挿入および置換の組み合わせを実施することができる。

50



## 【 0 2 4 7 】

突然変異体（改変）ポリペプチドは、当技術分野で公知の任意の手法を用いて調製することができる。例えば、本明細書に記載したポリヌクレオチドを、インビトロ突然変異誘発にかけることができる。そのようなインビトロ突然変異誘発法は、ポリヌクレオチドに適したベクター中にサブクローニングする段階、ベクターを大腸菌XL-1 red (Stratagene)などの「突然変異誘発物 (mutator)」系統に形質転換導入する段階、および形質転換された細菌に適した世代数だけ増殖させる段階を含みうる。別の例では、本発明のポリヌクレオチドを、Harayama (1998)によって広く記載されているDNAシャフリング法にかける。突然変異した / 改変されたDNAに由来する産物を、それらが所望の表現型を付与するか否かを判定するために、本明細書に記載した手法を用いて直ちにスクリーニングすることができる。

10

## 【 0 2 4 8 】

アミノ酸配列突然変異体の設計において、突然変異部位の位置および突然変異の性質は、改変しようとする特徴に依存すると考えられる。突然変異のための部位は、例えば(1)まず保存的アミノ酸選択範囲での置換、続いて達成された結果に応じたより根本的な選択部での置換、(2)標的残基の欠失、または(3)位置特定された部位に隣接させての他の残基の挿入によって、個別的にまたは連続して改変することができる。

## 【 0 2 4 9 】

アミノ酸配列の欠失は一般に、約1~15残基、より好ましくは約1~10残基、典型的に約1~5個の連続した残基の範囲にわたる。

20

## 【 0 2 5 0 】

置換突然変異体は、ポリペプチド分子中に、除去された少なくとも1つのアミノ酸残基、およびその場所に挿入された異なる残基を有する。置換突然変異誘発に関して最大の関心対象となる部位には、機能に関して重要であると同定された部位が含まれる。関心対象の他の部位には、さまざまな系統もしくは種から得られる特定の残基が同一であるもの(例えば、図1参照)、および / または関連タンパク質から得られる特定の残基が同一であるもの(例えば、図2参照)が含まれる。これらの位置は生物活性にとって重要な可能性がある。これらの部位、特に少なくとも3つの他の同一に保存された部位のある配列中に含まれるものを、好ましくは、比較的保存的な様式で置換する。そのような保存的置換は表1に示されている。

30

## 【 0 2 5 1 】

(表1) 例示的な置換

元の残基	例示的な置換
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

10

20

30

40

## 【 0 2 5 2 】

1つの好ましい態様において、突然変異体 / 変異体ポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドと比較して、1つまたは2つまたは3つまたは4つの保存的アミノ酸変化を有する。保存的アミノ酸変化の詳細は表1に提示されている。1つの好ましい態様において、変化は、本明細書とともに提示された異なるポリペプチド間で高度に保存されているモチーフの1つまたは複数におけるものではない。当業者には周知であると考えられるが、そのようなわずかな変化は、組換え細胞内で発現された場合にポリペプチドの活性を変化させないと合理的に予想することができる。

50

## 【0253】

さらに、必要であれば、非天然アミノ酸または化学的アミノ酸類似体を、本明細書に記載したポリペプチドに置換または付加として導入することもできる。そのようなアミノ酸には、一般的アミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 $\beta$ -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、6-アミノヘキサ酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 $t$ -ブチルグリシン、 $t$ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 $\gamma$ -アラニン、フルオロ-アミノ酸、遺伝子工学により改造された (designer) アミノ酸、例えば  $\beta$ -メチルアミノ酸、 $\epsilon$ -メチルアミノ酸、 $N$ -メチルアミノ酸およびアミノ酸類似体全般などが非限定的に含まれる。

10

## 【0254】

同じく本発明の範囲に含まれるものには、合成中または合成後に、例えば、ビオチン化、ベンジル化、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護/遮断基による誘導体化、タンパク質加水分解切断、抗体分子または他の細胞リガンドとの連結などによって、異なるように修飾された本発明のポリペプチドがある。これらの修飾は、ポリペプチドの安定性および/または生物活性を高めるために役立つ可能性がある。

## 【0255】

本明細書に記載したポリペプチドは、天然ポリペプチドの産生および回収、組換えポリペプチドの産生および回収、ならびにポリペプチドの化学合成を含む、種々のやり方で産生することができる。1つの態様において、単離された本発明のポリペプチドは、ポリペプチドを産生させるのに有効な条件下でポリペプチドを発現しうる細胞を培養して、ポリペプチドを回収することによって産生される。培養のために好ましい細胞は、本発明の組換え細胞である。有効な培養条件には、ポリペプチド産生を可能にする有効な培地、バイオリアクター、温度、pHおよび酸素の条件が非限定的に含まれる。有効な培地とは、細胞が培養されて本発明のポリペプチドを産生するような任意の培地のことを指す。そのような培地は、典型的には、同化しうる炭素、窒素およびリンの供給源、ならびに適切な塩、ミネラル、金属および他の栄養分、例えばビタミンなどを有する水性培地を含む。本発明の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、組織培養フラスコ、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュおよびペトリ皿などの中で培養することができる。培養は、組換え細胞にとって適切な温度、pHおよび酸素含量で行うことができる。そのような培養条件は当業者の専門技術の範囲内にある。

20

30

## 【0256】

ポリヌクレオチド

一本鎖または二本鎖で、センスまたはアンチセンスの向きまたは両方の組み合わせにあり、dsRNAまたは他の様式にある、DNA、RNAまたはこれらの組み合わせを含む「単離されたポリヌクレオチド」により、本発明者らは、その天然の状態でそれに付随または連結しているポリヌクレオチド配列から少なくとも部分的に分離されているポリヌクレオチドを意味する。好ましくは、単離されたポリヌクレオチドは、それらに天然で付随する他の成分の少なくとも60%を含まず、好ましくは少なくとも75%を含まず、最も好ましくは少なくとも90%を含まない。さらに、「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において、「核酸」という用語と互換的に用いられる。

40

## 【0257】

ポリヌクレオチドの文脈における「外因性」という用語は、細胞または無細胞発現系において、その天然の状態と比較して変化した量で存在するポリヌクレオチドのことを指す。1つの態様において、細胞は、そのポリヌクレオチドを天然では含まない細胞である。しかし、細胞が、コードされたポリペプチドの、変化した、または好ましくは増加した量の産生をもたらす非内因性ポリヌクレオチドを含む細胞であってもよい。本発明の外因性ポリヌクレオチドには、それが存在するトランスジェニック (組換え) 細胞または無細胞発現系の他の成分から分離されていないポリヌクレオチド、および、その後少なくとも一部の他の成分から精製される、そのような細胞または無細胞系で産生されたポリヌクレ

50

オチドが含まれる。

【0258】

ポリヌクレオチドの一致率は、GAP (Needleman and Wunsch, 1970) 分析 (GCGプログラム) により、ギャップクリエーションペナルティ = 5およびギャップ伸長ペナルティ = 0.3を用いて決定される。別に指定する場合を除き、クエリー配列は少なくとも45ヌクレオチド長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも45ヌクレオチドの領域にわたって整列化する。好ましくは、クエリー配列は少なくとも150ヌクレオチド長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも150ヌクレオチドの領域にわたって整列化する。より好ましくは、クエリー配列は少なくとも250ヌクレオチド長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも250ヌクレオチド長の領域にわたって整列化する。さらにより好ましくは、GAP分析は2つの配列をその全長にわたって整列化する。

10

【0259】

定義したポリヌクレオチドに関して、以上に提示したものを上回る数値を示す一致率が、好ましい態様の範囲に含まれることは理解されることが考えられる。したがって、適用可能な場合には、最小限の一致率の数値に照らし合わせて、本発明のポリヌクレオチドは、関連する指定したSEQ ID NOに対して少なくとも50%、より好ましくは少なくとも55%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.1%、より好ましくは少なくとも99.2%、より好ましくは少なくとも99.3%、より好ましくは少なくとも99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%、より好ましくは少なくとも99.6%、より好ましくは少なくとも99.7%、より好ましくは少なくとも99.8%、さらにより好ましくは少なくとも99.9%同一な配列を含むことが好ましい。

20

【0260】

本明細書で用いる場合、「ハイブリダイズする」という用語は、2つの一本鎖核酸分子が、少なくとも部分的に二本鎖である核酸を水素結合を通じて形成しうることを指す。

30

【0261】

本明細書で用いる場合、「ストリンジェントな条件」という語句は、ポリヌクレオチド、プローブ、プライマーおよび/またはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしないと考えられる条件のことを指す。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、環境が異なれば異なると考えられる。長い配列は短い配列よりも高い温度で特異的にハイブリダイズすると考えられる。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHでの特定の配列の熱融点 ( $T_m$ ) よりも約5%低くなるように選択する。 $T_m$ は、標的に対して相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度 (規定のイオン強度、pHおよび核酸濃度の下で) である。標的配列は一般に過剰に存在するため、 $T_m$ では平衡状態でプローブの50%が占有される。典型的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度がナトリウムイオン濃度で約1.0M未満、典型的にはナトリウムイオン (または他の塩の) 濃度で約0.01~1.0M、pH7.0~8.3であり、温度は短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド (例えば、10~50ヌクレオチド) に関しては少なくとも約30°Cであり、より長いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドに関しては少なくとも約60°Cであると考えられる。ストリンジェントな条件を、ホルムアミドなどの脱安定剤の添加によって達成することもできる。

40

【0262】

ストリンジェントな条件は当業者に公知であり、Ausubel et al. (前記)、6.3.1-6.3.6、ならびに本明細書に記載した実施例に記載がある。好ましくは、条件は、互いに少なくとも約65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%または99%相同な配列が、典型的に

50

は互いにハイブリダイズしたままに保たれるようなものである。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な一例は、6×SSC、50mM Tris-HCl (PH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSAおよび500mg/mlの変性サケ精子DNAを含む高塩濃度緩衝液中、65℃でのハイブリダイゼーションに続く、0.2×SSC、0.01% BSA中、50℃での1回または複数回の洗浄である。もう1つの態様においては、中等度ストリンジェンシーの条件下で、SEQ ID NO: 9~16のヌクレオチド配列を含む核酸分子の1つまたは複数にハイブリダイズしうる核酸配列が提供される。中等度ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の非限定的な一例は、6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100mg/mlの変性サケ精子DNA中、55℃でのハイブリダイゼーションに続く、1×SSC、0.1% SDS中、37℃での1回または複数回の洗浄である。用いうる中等度ストリンジェンシーの他の条件は当技術分野で周知であり、例えば、Ausubel et al. (前記) およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, (1990)を参照されたい。さらにもう1つの態様においては、SEQ ID NO: 9~16のヌクレオチド配列のいずれか1つまたは複数を含む核酸分子にハイブリダイズしうる核酸が提供される。低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の非限定的な一例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/mlの変性サケ精子DNA、10% (wt/vol) デキストラン硫酸中、40℃でのハイブリダイゼーションに続く、2×SSC、25mM Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDS中、50℃での1回または複数回の洗浄である。用いうる低ストリンジェンシーの他の条件は当技術分野で周知であり、例えば、Ausubel et al. (前記) およびKriegler (前記) を参照されたい。

10

20

#### 【0263】

本発明のポリヌクレオチドは、天然に存在する分子と比較して、ヌクレオチド残基の欠失、挿入または置換である1つまたは複数の突然変異を有してもよい。突然変異体は天然に存在する(すなわち、天然供給源から単離された)ものでもよく、または合成性でもよい(例えば、核酸に対する部位指定突然変異誘発による)。

#### 【0264】

通常は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのモノマーをホスホジエステル結合またはその類似体によって連結して、サイズが比較的短いモノマー単位、例えば12~18個から数百個のモノマー単位までの範囲にわたるオリゴヌクレオチドを形成させる。ホスホジエステル結合の類似体には以下が含まれる: ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデートおよびホスホルアミデート。

30

#### 【0265】

##### アンチセンスポリヌクレオチド

「アンチセンスポリヌクレオチド」という用語は、本発明のポリペプチドをコードする特定のmRNA分子の少なくとも一部分に対して相補的であり、mRNA翻訳などの転写後イベントに干渉することができる、DNAまたはRNAまたはそれらの組み合わせの分子を意味すると解釈されるものとする。アンチセンス方法の使用は当技術分野で周知である(例えば、G. Hartmann and S. Endres, Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999)を参照)。植物におけるアンチセンス手法の使用は、Bourque, 1995およびSenior, 1998によって総説されている。Bourque, 1995は、アンチセンス配列が遺伝子不活性化の方法としてどのように利用されてきたかという例を数多く挙げている。また、任意の酵素活性の100%阻害を達成することは必ずしも必要でなく、部分的阻害でも系における測定可能な変化をもたらす可能性がかなり高いという記述も参照されたい。Senior (1998) は、現在ではアンチセンス方法が遺伝子発現を操作するための極めて十分に確立された手法であると述べている。

40

#### 【0266】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドに生理的条件下でハイブリダイズすると考えられる。本明細書で用いる場合、「生理的条件下でハイブリダイ

50

ズするアンチセンスポリヌクレオチド」という用語は、ポリヌクレオチド（完全または部分的に一本鎖である）が、細胞内、好ましくはヒト細胞内で通常の条件下で、SEQ ID NO：1～8のいずれか1つに提示されたものなどのタンパク質をコードするmRNAと二本鎖ポリヌクレオチドを形成することが少なくとも可能であることを意味する。

【0267】

アンチセンス分子は、構造遺伝子に対応する配列、または遺伝子発現もしくはスプライシングイベントに対する制御をもたらす配列を含むことができる。例えば、アンチセンス配列は、本発明の遺伝子のターゲティングされたコード領域、または5'-非翻訳領域（UTR）もしくは3'-UTR、またはこれらの組み合わせに対応してもよい。それは一部には、転写中または転写後にスプライシングで除去されると思われるイントロン配列に対して相補的であってよいが、好ましくは標的遺伝子のエクソン配列のみに対して相補的である。UTRの多様性が一般に大きいことに鑑みれば、これらの領域を標的とすることで遺伝子阻害のより大きな特異性が得られる。

10

【0268】

アンチセンス配列の長さは、少なくとも19個の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも100、200、500または1000ヌクレオチドであるべきである。遺伝子転写物の全体に対して相補的な完全長配列を用いることもできる。その長さは最も好ましくは100～2000ヌクレオチドである。ターゲティングされる転写物に対するアンチセンス配列の同一性の度合いは、少なくとも90%、より好ましくは95～100%であるべきである。アンチセンスRNA分子は当然ながら、分子を安定化するために機能しうる無関係な配列を含んでもよい。

20

【0269】

触媒性ポリヌクレオチド

触媒性ポリヌクレオチド/核酸という用語は、異なる基質を特異的に認識してこの基質の化学修飾を触媒する、DNA分子もしくはDNA含有分子（当技術分野では「デオキシリボザイム」としても知られる）またはRNA分子もしくはRNA含有分子（「リボザイム」としても知られる）のことを指す。触媒性核酸中の核酸塩基は、塩基A、C、G、T（およびRNAの場合はU）でありうる。

【0270】

典型的には、触媒性核酸は、標的核酸の特異的認識のためのアンチセンス配列、および核酸を切断する酵素活性（本明細書では「触媒ドメイン」とも称する）を含む。本発明において特に有用なリボザイムの型は、ハンマーヘッド型リボザイム（Haseloff and Gerlach, 1988; Perriman et al., 1992）およびヘアピン型リボザイム（Shippy et al., 1999）である。

30

【0271】

本発明のリボザイムおよびリボザイムをコードするDNAは、当技術分野で周知の方法を用いて化学合成することができる。また、リボザイムを、RNAポリメラーゼプロモーター、例えばT7 RNAポリメラーゼまたはSP6 RNAポリメラーゼのプロモーターと機能的に連結されたDNA分子（転写されるとRNA分子を生じる）から調製することもできる。したがって、同じく本発明によって提供されるものには、本発明の触媒性ポリヌクレオチドをコードする核酸分子、すなわちDNAまたはcDNAがある。ベクターが、DNA分子と機能的に連結されたRNAポリメラーゼプロモーターも含む場合には、RNAポリメラーゼおよびヌクレオチドとのインキュベーションによってリボザイムをインビトロで生成させることができる。1つの別の態様では、DNAを発現カセットまたは転写カセット中に挿入することができる。合成後に、RNA分子を、リボザイムを安定化してそれをRNアーゼに対して抵抗性にする能力を有するDNA分子との連結によって修飾することができる。

40

【0272】

本明細書に記載したアンチセンスポリヌクレオチドの場合と同じく、本発明の触媒性ポリヌクレオチドも、「生理的条件」下、すなわち細胞内部の条件（特にヒト細胞などの動物細胞内部の条件）下で、標的核酸分子（例えば、SEQ ID NO：1～8に提示されたいずれ

50

かのポリペプチドをコードするmRNA)とハイブリダイズしうるべきである。

【0273】

#### RNA干渉

RNA干渉(RNAi)は、特定のタンパク質の産生を特異的に阻害するために特に有用である。理論に制約されることは望まないが、Waterhouse et al. (1998)は、dsRNA(二重鎖RNA)を用いてタンパク質産生を低下させることができる機序に関するモデルを提示している。この技術は、関心対象の遺伝子のmRNAまたはその一部、この場合には本発明によるポリペプチドをコードするmRNAと本質的に同一な配列を含むdsRNA分子の存在に依拠している。簡便には、dsRNAは、センス配列およびアンチセンス配列が、センス配列およびアンチセンス配列をハイブリダイズさせてループ構造を形成する無関係な配列を有するdsRNA分子を形成させることを可能にする無関係な配列に隣接している、組換えベクターまたは宿主細胞内で単一のプロモーターから産生させることができる。本発明に適したdsRNA分子の設計および作製は、特にWaterhouse et al. (1998)、Smith et al. (2000)、WO 99/32619、WO 99/53050、WO 99/49029およびWO 01/34815を考慮すれば、十分に当業者の能力の範囲内にある。

10

【0274】

1つの例では、不活性化しようとする標的遺伝子に対する相同性を有する、少なくとも部分的に二本鎖であるRNA産物の合成を導くDNAを導入する。このため、このDNAは、RNAへと転写された場合にハイブリダイズして二本鎖RNA領域を形成することができる、センス配列およびアンチセンス配列の両方を含む。1つの好ましい態様において、センス配列およびアンチセンス配列は、RNAへと転写された場合にスプライシングで除去されるイントロンを含む、スパーサー領域によって隔てられる。この配置は、より高い効率での遺伝子サイレンシングをもたらすことが示されている。二本鎖領域は、1つのDNA領域または2つのそれから転写される、1つまたは2つのRNA分子を含みうる。二本鎖分子の存在は、二本鎖RNA、さらには標的植物遺伝子からの相同的RNA転写物の両方を破壊して、標的遺伝子の活性を有効に低下または消失させることができる、内因性植物系からの応答を誘発すると考えられている。

20

【0275】

ハイブリダイズするセンス配列およびアンチセンス配列の長さは、それぞれ少なくとも19個の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも30または50ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも100、200、500または1000ヌクレオチドであるべきである。遺伝子転写物の全体に対応する完全長配列を用いることもできる。その長さは最も好ましくは100~2000ヌクレオチドである。ターゲティングされる転写物に対するセンス配列およびアンチセンス配列の同一性の度合いは、少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95~100%であるべきである。アンチセンスRNA分子は当然ながら、分子を安定化するために機能しうる無関係な配列を含んでもよい。RNA分子は、RNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターの制御下で発現させることができる。後者の例には、tRNAプロモーターまたはsnRNAプロモーターが含まれる。

30

【0276】

好ましい短鎖干渉性RNA(「siRNA」)分子は、標的mRNAの約19~21個の連続したヌクレオチドと同一なヌクレオチド配列を含む。好ましくは、標的mRNA配列は、ジヌクレオチドAAで始まり、GC含量は約30~70%(好ましくは、30~60%、より好ましくは40~15%、より好ましくは約45%~55%)であり、それを導入しようとする動物(好ましくはヒト)のゲノム中の標的以外のいかなるヌクレオチド配列に対しても、例えば、標準的なBLAST検索による判定で、高い一致率を有しない。

40

【0277】

#### マイクロRNA

マイクロRNA調節は、従来のRNAi/PTGSから逸脱して、遺伝子調節に向けて進化した、RNAサイレンシング経路の明らかに特殊化した分枝路である。マイクロRNAは、特徴的な逆向き反復配列として構成された遺伝子様エレメント中にコードされる特定クラスの低分子

50

RNAである。転写されると、マイクロRNA遺伝子はステムループを形成した前駆体RNAを生じ、その後それからマイクロRNAがプロセッシングされる。マイクロRNAは典型的には約21ヌクレオチド長である。放出されたmiRNAは、配列特異的な遺伝子抑圧を発揮するアルゴノートタンパク質の特定のサブセットを含む、RISC様複合体中に組み入れられる（例えば、Millar and Waterhouse, 2005 ; Pasquinelli et al, 2005 ; Almeida and Allshire, 2005を参照）。

#### 【0278】

##### 共抑制

用いる別の分子生物学的アプローチは共抑制である。共抑制の機序は十分には解明されていないが、転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）を伴うと考えられており、その点でアンチセンス抑制の多くの例と非常に類似している。これは、植物の中に、ある遺伝子の余分な1コピーまたはその断片をその発現のためのプロモーターに対してセンスの向きに導入することを伴う。センス断片のサイズ、標的遺伝子領域に対するその対応関係、および標的遺伝子に対するその配列同一性の度合いは、アンチセンス配列に関して上述した通りである。場合によっては、遺伝子配列のこの追加のコピーは標的植物遺伝子の発現と干渉する。共抑制をアプローチ実行する方法については、WO 97/20936およびEP 0465572を参照されたい。

#### 【0279】

##### 組換えベクター

本発明の1つの態様は、ポリヌクレオチド分子を宿主細胞内に送達することができる任意のベクター中に挿入された、本明細書に記載した少なくとも1つの単離されたポリヌクレオチド分子、および/または本明細書に記載したポリペプチドもしくは化合物（抗体など）をコードするポリヌクレオチドを含む、組換えベクターを含む。そのようなベクターは、天然では本発明のポリヌクレオチド分子に隣接して認められず、好ましくはポリヌクレオチド分子の由来である種以外の種に由来するポリヌクレオチド配列である、異種ポリヌクレオチド配列を含む。ベクターは、RNAまたはDNA、原核生物性または真核生物性のいずれでもよく、典型的にはトランスポゾン（米国特許第5,792,294号に記載されたものなど）、ウイルスまたはプラスミドである。

#### 【0280】

組換えベクターの一つの型は、発現ベクターと機能的に連結されたポリヌクレオチドを含む。機能的に連結されたという語句は、分子が宿主細胞内に形質転換導入された時に発現されるような様式での、発現ベクター中へのポリヌクレオチド分子の挿入のことを指す。本明細書で用いる場合、発現ベクターとは、宿主細胞を形質転換させて、指定のポリヌクレオチド分子の発現を生じさせることができる、DNAベクターまたはRNAベクターのことである。好ましくは、発現ベクターは宿主細胞内で複製可能である。発現ベクターは原核生物性または真核生物性のいずれでもよく、典型的にはウイルスまたはプラスミドである。発現ベクターには、細菌細胞、真菌細胞、内部寄生生物細胞、節足動物細胞、動物細胞および植物細胞を含む組換え細胞において機能する（すなわち、遺伝子発現を導く）任意のベクターが含まれる。本発明のベクターはまた、無細胞発現系においてポリペプチドを産生するために用いることもでき、そのような系は当技術分野で周知である。

#### 【0281】

「機能的に連結された」とは、本明細書で用いる場合、2つまたはそれ以上の核酸（例えば、DNA）セグメント間の機能的関係のことを指す。典型的には、それは転写調節エレメントと転写される配列との機能的関係のことを指す。例えば、プロモーターは、それが適切な宿主細胞および/または無細胞発現系におけるコード配列の転写を刺激または調節する場合には、本明細書で定義したポリヌクレオチドなどのコード配列と機能的に連結されている。一般に、転写される配列と機能的に連結されたプロモーター転写調節エレメントは、転写される配列と物理的に連続しており、すなわち、それらはシス作用性である。しかし、エンハンサーなどの一部の転写調節エレメントは、それらが転写を強化するコード配列と物理的に連続していること、または近接して位置することは必ずしも必要でない



。

## 【0282】

特に、本発明の発現ベクターは、転写制御配列、翻訳制御配列、複製起点、および組換え細胞と適合性であり、かつ本発明のポリヌクレオチド分子の発現を制御する他の調節配列などの調節配列を含む。特に、本発明の組換え分子は転写制御配列を含む。転写制御配列とは、転写の開始、伸長および終結を制御する配列のことである。特に重要な転写制御配列は、プロモーター、エンハンサー、オペレーターおよびレプレッサー配列といった、転写開始を制御するものである。適した転写制御配列には、本発明の組換え細胞の少なくとも1つにおいて機能しうる任意の転写制御配列が含まれる。そのような種々の転写制御配列が当業者に公知である。好ましい転写制御配列には、細菌細胞、酵母細胞、節足動物細胞、線虫細胞、植物細胞または動物細胞において機能するものが含まれ、これには例えば、tac、lac、trp、trc、oxy-pro、omp/lpp、rrnB、バクテリオファージ、バクテリオファージT7、T7lac、バクテリオファージT3、バクテリオファージSP6、バクテリオファージSP01、メタロチオネイン、 $\lambda$ -接合因子、ピキア属 (*Pichia*) アルコールオキシダーゼ、アルファウイルスのサブゲノムプロモーター (シンドビスウイルスのサブゲノムプロモーターなど)、抗生物質耐性遺伝子、バキュロウイルス、ヘリオチス-ゼア (*Heliothis zea*) 昆虫ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、アライグマボックスウイルス、他のボックスウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス (中間初期 (intermediate early) プロモーターなど)、シミアンウイルス40、レトロウイルス、アクチン、レトロウイルス長末端反復配列、ラウス肉腫ウイルス、熱ショック、リン酸および硝酸による転写制御配列、ならびに原核細胞または真核細胞における遺伝子発現を制御することができる他の配列などがあるが、これらには限定されない。

10

20

## 【0283】

宿主細胞

本発明のもう1つの態様は、本明細書に記載した1つまたは複数の組換え分子によって形質転換された宿主細胞、またはそれらの子孫細胞を含む、組換え細胞である。細胞内へのポリヌクレオチド分子の形質転換導入は、ポリヌクレオチド分子を細胞内に挿入することができる任意の方法によって達成しうる。形質転換の手法には、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着およびプロトプラスト融合が非限定的に含まれる。組換え細胞は単細胞であり続けてもよく、または組織、臓器もしくは多細胞生物体へと増殖させてもよい。本発明の形質転換導入されたポリヌクレオチド分子は、染色体外に保たれてもよく、または、それらが発現される能力が保たれるような様式で、形質転換 (すなわち、組換え) 細胞の染色体内部の1つもしくは複数の部位に組み込まれてもよい。

30

## 【0284】

形質転換のために適した宿主細胞には、本発明のポリヌクレオチドを用いて形質転換することができる任意の細胞が含まれる。本発明の宿主細胞は、本明細書に記載したポリペプチドを内因性に (すなわち、天然で) 産生することができてよく、または、本明細書に記載した少なくとも1つのポリヌクレオチド分子によって形質転換された後にそのようなポリペプチドを産生することができてよく、または、本発明の宿主細胞は、本明細書に記載した少なくとも1つのタンパク質を産生することができる任意の細胞であってよく、これには細菌細胞、真菌 (酵母を含む) 細胞、寄生生物細胞、線虫細胞、節足動物細胞、動物細胞および植物細胞が含まれる。宿主細胞の例には、サルモネラ属 (*Salmonella*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、バシラス属 (*Bacillus*)、リステリア属 (*Listeria*)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、スポドプテラ属 (*Spodoptera*)、マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)、トリコプルシア属 (*Trichoplusia*)、BHK (ベビーハムスター腎臓) 細胞、CHO細胞、293細胞、EL4細胞、MDCK細胞、CRFK細胞、CV-1細胞、COS (例えば、COS-7) 細胞およびペロ細胞が含まれる。宿主細胞のさらなる例には、大腸菌K-12派生株を含む大腸菌; チフス菌 (*Salmonella typhi*); 弱毒系統を含むネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*); ヨウトガ (*Spodoptera frugiperda*); イラクサギンウワバ (*Trichop*

40

50

lusia ni) ; および非腫瘍形成性マウスG8筋芽細胞 (例えば、ATCC CRL 1246) が含まれる。

#### 【0285】

組換えDNA技術を用いることで、例えば、宿主細胞内のポリヌクレオチド分子のコピー数、それらのポリヌクレオチド分子が転写される効率、その結果生じる転写物が翻訳される効率、および翻訳後修飾の効率を操作することにより、形質転換導入されたポリヌクレオチド分子の発現を改善することができる。本発明のポリヌクレオチド分子の発現を増加させるために有用な組換え手法には、ポリヌクレオチド分子を高コピー数プラスミドと機能的に連結させること、1つまたは複数の宿主細胞染色体中へのポリヌクレオチド分子の組込み、プラスミドへのベクター安定性配列の付加、転写制御シグナル (例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー) の置換または改変、翻訳制御シグナル (例えば、リボソーム結合部位、シャイン-ダルガルノ配列) の置換または改変、宿主細胞のコドン使用に対応する本発明のポリヌクレオチド分子の改変、および転写物を不安定化する配列の削除が非限定的に含まれる。

10

#### 【0286】

##### トランスジェニック植物

「植物」という用語は、完全な植物体、植物器官 (例えば、葉、茎根など)、種子、植物細胞などのことを指す。本発明の実施における使用を想定している植物には、単子葉植物および双子葉植物の両方が含まれる。標的植物には、以下が非限定的に含まれる：穀物 (コムギ、オオムギ、ライムギ、カラスムギ、イネ、モロコシおよび関連する農作物) ;  
ビート (サトウダイコンおよび飼料用ビート) ; ナシ状果、核果および軟質果実 (リンゴ、セイヨウナシ、プラム、モモ、アーモンド、チェリー、イチゴ、ラズベリーおよびブラックベリー) ; マメ科植物 (マメ、レンズマメ、エンドウ、ダイズ) ; 油脂植物 (ナタネ、カラシ、ケシ、オリーブ、ヒマワリ、ココナッツ、トウゴマ、カカオ豆、ラッカセイ) ;  
キュウリ科植物 (ペポカボチャ、キュウリ、メロン) ; 繊維植物 (ワタ、アマ、アサ、ジュート) ; 柑橘類果物 (オレンジ、レモン、グレープフルーツ、マンダリン) ; 野菜 (ホウレンソウ、レタス、アスパラガス、キャベツ、ニンジン、タマネギ、トマト、ジャガイモ、パプリカ) ; クスノキ類 (アボガド、シナモン、ショウノウ) ; またはトウモロコシ、タバコ、ナッツ類、コーヒー、サトウキビ、チャ、ブトウ樹、ホップ、シバ、バナナ  
および天然のゴムノキ、ならびに観賞植物 (花、灌木、広葉樹および常緑樹、例えば針葉樹など) 。

20

30

#### 【0287】

本発明の文脈において定義されるトランスジェニック植物には、所望の植物または植物器官における少なくとも1つのポリペプチドおよび/または本発明のポリヌクレオチドの産生を引き起こすために組換え手法を用いて遺伝的に操作された植物 (ならびに前記植物の部分および細胞) およびそれらの子孫が含まれる。トランスジェニック植物は、A. Slater et al., Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003)、およびP. Christou and H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004) に一般的に記載されたもののような、当技術分野で公知の手法を用いて作製することができる。

40

#### 【0288】

本発明のポリヌクレオチドは、すべての発生段階中でトランスジェニック植物において構成的に発現させることができる。植物または植物器官の用途に応じて、ポリヌクレオチドを発生段階特異的な様式で発現させることもできる。さらに、ポリヌクレオチドを組織特異的に発現させることもできる。

#### 【0289】

植物における関心対象のポリヌクレオチドの発現を引き起こすことが公知であるか見いだされている調節配列を、本発明に用いることができる。用いる調節配列の選択は、関心対象の標的植物および/または標的器官に依存する。そのような調節配列は植物もしくは植物ウイルスから得ることもでき、または化学合成することもできる。そのような調節配

50

列は当業者に周知である。

【0290】

構成的な植物プロモーターは周知である。前述したプロモーターのほかに、いくつかの他の適したプロモーターには、ノパリンシンターゼプロモーター、オクトピンシンターゼプロモーター、CaMV 35Sプロモーター、リブローズ-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼプロモーター、Adh1を基にしたpEmu、Act1、SAMシンターゼプロモーターおよびUbiプロモーター、ならびにクロロフィルa/b結合タンパク質のプロモーターが非限定的に含まれる。または、導入遺伝子が調節された様式で発現されることが望ましいこともある。ポリヌクレオチドの調節された発現は、コード配列を組織特異的、発生特異的または誘導性のプロモーターの制御下に置くことによって可能である。いくつかの組織特異的に調節される遺伝子および/またはプロモーターが、植物で報告されている。これらには、種子貯蔵タンパク質（ナピン、クルシフェリン、 $\gamma$ -コングリシニン、グリシニンおよびファゼオリン）、ゼインもしくは油体タンパク質（オレオシンなど）をコードする遺伝子、または脂肪酸合成に関与する遺伝子（アシル担体タンパク質、ステアロイル-ACPデサチュラーゼおよび脂肪酸デサチュラーゼ（fad 2-1）を含む）、および胚発生中に発現される他の遺伝子（Bce4など）が含まれる。種子特異的発現のために特に有用であるのは、マメのビシリンプロモーターである。成熟葉における発現のために有用な他のプロモーターには、アラビドプシス（*Arabidopsis*）由来のSAGプロモーターのように老化の開始時にスイッチがオンになるものがある。開花時または開花から果実発生まで、少なくとも成熟の始まりまで発現される果実特異的プロモーターの1つのクラスが、米国特許第4,943,674号で考察されている。組織特異的プロモーターの他の例には、葉に対する損傷（例えば、咀嚼昆虫による）後に葉細胞における発現を導くもの、塊茎（例えば、パタチン遺伝子プロモーター）および繊維細胞（発生上の調節を受ける繊維細胞タンパク質の一例はE6繊維である）におけるものがある。

【0291】

関心対象の核酸配列を含む発現構築物の標的植物への導入のために、いくつかの手法を利用することができる。そのような手法には、カルシウム/ポリエチレングリコール法を用いたプロトプラストの形質転換、エレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションまたは（コーティングされた）粒子の射入（bombardment）が含まれる。これらのいわゆる直接的なDNA形質転換法に加えて、ウイルスベクターおよび細菌ベクター（例えば、アグロバクテリウム属由来のもの）などのベクターを含む形質転換系も広く利用可能である。選択および/またはスクリーニングの後に、形質転換されたプロトプラスト、細胞または植物部分を、当技術分野で公知の方法を用いて完全な植物体へと再生させることができる。形質転換および/または再生の手法の選択は本発明にとって決定的に重要なものではない。

【0292】

トランスジェニック細胞および植物における導入遺伝子の存在を確かめるために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅またはサザンブロット分析を、当業者に公知の方法を用いて行うことができる。導入遺伝子の発現産物は、産物の性質に応じてさまざまな任意のやり方で検出することができ、これにはウエスタンブロットおよび酵素アッセイが含まれる。さまざまな植物組織中での発現を定量し、複製を検出するための1つの特に有用なやり方は、GUSなどのレポーター遺伝子を用いることである。ひとたびトランスジェニック植物が得られれば、それらを成長させて、所望の表現型を有する植物組織または部分を生じさせることができる。植物組織または植物部分を収穫し、および/または種子を収集する。種子は、所望の特徴を有する組織または部分を備えた別の植物を成長させるための供給源として役立てることができる。

【0293】

トランスジェニック非ヒト動物

本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、「ノックアウト体」および「ノックイン体」という2つの種類に大きくカテゴリー化することができる。「ノックアウト体」は、好

10

20

30

40

50

ましくは標的遺伝子の発現がわずかであるかまたは検出不能になるような標的遺伝子の機能の低下をもたらす、トランスジェニック配列の導入を介した標的遺伝子中の変化を有する。「ノックイン体」は、例えば、標的遺伝子の追加コピーの導入による、または標的遺伝子の内因性コピーの発現強化を与える調節配列を機能的に挿入することによる、標的遺伝子の発現増強をもたらす宿主細胞ゲノム中の変化を有するトランスジェニック動物のことである。ノックインまたはノックアウトのトランスジェニック動物は、標的遺伝子に関してヘテロ接合性またはホモ接合性のいずれでもよい。

#### 【0294】

トランスジェニック動物を作製するための手法は当技術分野で周知である。この主題に関する有用な一般的教科書の1つは、Houdebine, Transgenic animals - Generation and Use, Harwood Academic, (1997)である。

10

#### 【0295】

異種DNAは、例えば、受精した哺乳動物卵細胞に導入することができる。例えば、全能性または多能性の胚性幹細胞を、マイクロインジェクション、リン酸カルシウムを介した沈降、リポソーム融合、レトロウイルス感染、エレクトロポレーションまたは他の手段によって形質転換させ、続いて形質転換細胞を胚に導入し、続いて胚を発生させてトランスジェニック動物にすることができる。1つの非常に好ましい方法では、発生中の胚を、所望のDNAを含むレトロウイルスに感染させて、感染した胚からトランスジェニック動物を生じさせる。しかし、別の好ましい方法では、胚、好ましくは単細胞期の胚の前核または細胞質に適切なDNAを同時注入し、胚を発生させて成熟トランスジェニック動物とする。

20

#### 【0296】

トランスジェニック動物を作製するために用いられる別の方法は、標準的な方法によって前核期の卵に核酸を微量注入する段階を含む。続いて、注入された卵を培養してから、偽妊娠レシピエントの卵管に移植する。

#### 【0297】

また、トランスジェニック動物を核移植技術によって作製することもできる。この方法を用いて、ドナー動物の線維芽細胞を、調節配列の制御下にある関心対象の結合ドメインまたは結合パートナーのコード配列を組み入れたプラスミドによって安定的にトランスフェクトさせる。続いて、安定なトランスフェクト体を除核卵母細胞と融合させ、培養して、雌レシピエントに移植する。

30

#### 【0298】

#### 遺伝子治療

本明細書に記載した治療用ポリヌクレオチド分子は、「遺伝子治療」としばしば称される治療様式におけるその種のポリヌクレオチドの発現により、本発明に従って用いることができる。例えば、ヒト5B6（例えば、SEQ ID NO:1）をコードするポリヌクレオチド、またはその断片を、疾患の治療のための遺伝子治療の手法に用いることができる。すなわち、患者からの細胞を、DNAまたはRNAなどのポリヌクレオチドがポリペプチドをコードするようにエキスピボで人為的に操作する。続いて、人為的に操作された細胞を、そのポリペプチドによって治療しようとする患者に与えることができる。この態様において、細胞は、例えば、幹細胞または分化した幹細胞を形質転換するために用いることができる、本明細書に記載したポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターの使用によって、エキスピボで人為的に操作してもよい。そのような方法は当技術分野で周知であり、本発明におけるそれらの使用は本明細書における教示から明らかであると考えられる。

40

#### 【0299】

さらに、細胞を、インピボでのポリペプチドの発現のために、当技術分野で公知の手順によってインピボで人為的に操作してもよい。例えば、本明細書に記載したポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、複製能が欠損したレトロウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターまたは他のベクター（例えば、ポックスウイルスベクター）における発現のために人為的に操作してもよい。続いて、発現構築物を単離することができる。パ

50

パッケージング細胞に対して、ヒト5B6などの本明細書に記載したポリペプチドをコードするRNAを含むプラスミドベクターによる形質導入を行って、パッケージング細胞が関心対象の遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生するようにする。これらの産生細胞を、インビボでの細胞の人為的に操作およびインビボでのポリペプチドの発現のために患者に投与することができる。ポリペプチドを投与するためのこれらの方法および他の方法は、本発明の教示により、当業者には明らかなはずである。

#### 【0300】

本明細書中に上述したレトロウイルスプラスミドベクターを得ることができるレトロウイルスには、モロニーマウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルスおよび乳腺癌ウイルスが非限定的に含まれる。1つの好ましい態様において、レトロウイルスプラスミドベクターはモロニーマウス白血病ウイルスから得られる。

10

#### 【0301】

そのようなベクターは、ポリペプチドを発現させるための1つまたは複数のプロモーターを含むと考えられる。用いる適したプロモーターには、以下が非限定的に含まれる：レトロウイルスLTR；SV40プロモーター；およびヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター。ヒストン、RNAポリメラーゼIII、メタロチオネインプロモーター、熱ショックプロモーター、アルブミンプロモーター、5B6プロモーター、ヒトグロビンプロモーターおよび-アクチンプロモーターを非限定的に含む、真核生物細胞プロモーターなどの細胞プロモーターを用いることもできる。用いるそのほかのウイルス性プロモーターには、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ（TK）プロモーターおよびB19パルボウイルスプロモーターが非限定的に含まれる。適したプロモーターの選択は、本明細書に含まれる教示から、当業者には明らかであると考えられる。

20

#### 【0302】

レトロウイルスプラスミドベクターを用いてパッケージング細胞株に形質導入して、産生細胞株を形成させることができる。トランスフェクトさせることができるパッケージング細胞の例には、PE501、PA317、Y-2、Y-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、YCRE、YCRIP、GP+E-86、GP+envAm12、およびMiller（1990）によって記載されたDAN細胞株が非限定的に含まれる。ベクターは、当技術分野で公知の任意の手段によってパッケージング細胞内に形質導入される。そのような手段には、エレクトポレーション、リボソームの使用、およびCaPO<sub>4</sub>沈降が非限定的に含まれる。1つの代替法では、レトロウイルスプラスミドベクターをリボソーム中に封入するか、または脂質と結合させて、宿主に投与する。

30

#### 【0303】

産生細胞株は、ポリペプチドをコードする核酸配列を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を生成すると考えられる。続いて、そのようなレトロウイルスベクター粒子を用いて、真核細胞にインビトロまたはインビボで形質導入する。形質導入された真核細胞は、ポリペプチドをコードする核酸配列を発現すると考えられる。形質導入を行いうる真核細胞には、胚性幹細胞、胚性癌細胞、ならびに造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、筋細胞（特に骨格筋細胞）、内皮細胞および気管支上皮細胞が含まれる。

40

#### 【0304】

本発明による遺伝子治療は、患者における遺伝子治療用ポリヌクレオチドの一過性の（一時的な）存在、または患者へのポリヌクレオチドの永続的導入を伴いうる。

#### 【0305】

本発明による、本明細書で考察した物質の直接投与のような遺伝子治療は、単独で用いてもよく、または他の治療様式とともに用いてもよい。

#### 【0306】

薬学的組成物、投与量および投与経路

5B6と結合する化合物を、許容される担体または希釈剤とともに含む組成物は、本発明

50

の方法において有用である。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、植物、抽出物、細胞株および/または宿主細胞を含む組成物も同じく提供される。

#### 【0307】

治療用組成物は、適切な純度を有する所望の成分（5B6と結合する化合物など）を、任意で薬学的に許容される担体、添加剤または安定化剤と混合することにより、凍結乾燥製剤、水溶液または水性懸濁液の形態で調製することができる（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980)）。許容される担体、添加剤または安定化剤は、好ましくは、用いられる投与量および濃度でレシipientに対して無毒性であり、これには、Tris、HEPES、PIPES、リン酸、クエン酸および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンなどの抗酸化剤；保存料（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメチウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む単糖類、二糖類および他の糖質；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；ならびに/または、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

#### 【0308】

そのような担体のその他の例には、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばグリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩、または電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、および、セルロースを基にした物質が含まれる。

#### 【0309】

インビボ投与のために用いようとする治療用組成物は、無菌であるべきである。これは、凍結乾燥および再構成の前または後での、無菌濾過膜を通しての濾過によって容易に達成される。組成物は、全身投与される場合には、凍結乾燥形態または溶液の状態で保存することができる。凍結乾燥形態にある場合、それは典型的には使用時点での適切な希釈剤による再構成用の他の成分と組み合わせて製剤化される。液体製剤の一例は、皮下注射用の単回用量バイアル内に充填された、無菌で、透明で、無色の、保存処置がなされていない（unpreserved）溶液である。

#### 【0310】

治療用組成物は一般に、無菌のアクセスポート（access port）を有する容器、例えば、皮下注射針による貫通が可能なストッパーを有する静脈内用の溶液バックまたはバイアルの内部に配置される。組成物は好ましくは、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内または非経口的に、例えば、静脈内注射もしくは注入として投与されるか、または体腔内に投与される。

#### 【0311】

化合物は、1回の用量当たり約0.001～2000mg/kg体重、より好ましくは1回の用量当たり約0.01～500mg/kg体重の量で投与される。反復用量を、治療に当たる医師によって処方された通りに投与することもできる。

#### 【0312】

組成物の単回投与または多回投与は、患者が必要とし、かつ患者によって認容される投与量および頻度に応じて行われる。投与量および頻度は典型的には、投与される具体的な治療物質または予防用物質、疾患の重症度および種類、または必要な免疫応答、投与経路

、ならびに患者の年齢、体重、反応および既往歴に応じて、各患者に特異的な要因によって異なると考えられる。当業者は、そのような要因を検討すること、および、例えば文献中に報告され、Physician's Desk Reference, 56th ed., (2002)で推奨されている投与量に従うことにより、適したレジメンを選択することができる。一般に、用量は、許容されない毒性を患者に生じさせることなく、疾患の症状または徴候を治療または改善するのに十分である。

#### 【0313】

本発明の別の例では、5B6と結合する化合物を、癌または病原体もしくは感染性生物の抗原といった抗原と結合させて、体液性および/またはT細胞媒介性免疫応答を強化するためのワクチンとして、筋肉内、皮下もしくは静脈内注射によって、または経口的に送達する。別の例では、5B6と結合する化合物を自己抗原またはアレルゲン性抗原と結合させたものを、33D1およびDEC-205に関して記載されたものと同様に、免疫応答を減じさせる目的で抗原を送達するために用いることができる (Bonifaz et al, 2002 ; Finkelman et al, 1996)。

10

#### 【0314】

本発明の別の例では、5B6と結合する化合物の放射性標識形態を、静脈内注射により、5B6を発現する標的細胞に対して治療用物質として送達することができる。放射性標識抗体およびそれらを治療薬として患者に投与するための方法の以前の例は、当業者に公知である。その例には、HLA-DRのサブユニットに対するヨウ素<sup>131</sup>標識Lym-1、ならびに抗CD20ヨウ素<sup>111</sup>およびイットリウム<sup>90</sup>標識イブリットモマブチウキセタン (IDEC-Y2B8、ZEVALIN (登録商標) およびヨウ素<sup>131</sup>トシツモマブ (BEXXAR (登録商標)) が含まれる。

20

#### 【0315】

1つの態様において、組成物はアジュバントを含まない。もう1つの態様において、組成物はアジュバントを含む。アジュバントの例には、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム (アラム)、ムラミルジペプチド、細菌エンドトキシン、リポドX、ポリリボヌクレオチド、アルギン酸ナトリウム、ラノリン、リゾレシチン、ビタミンA、サポニン、リポソーム、レバミソール、DEAE-デキストラン、ブロックコポリマー (blocked copolymer) または他の合成アジュバントが非限定的に含まれる。そのようなアジュバントはさまざまな販売元から販売されており、例えば、Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) またはフロイント不完全アジュバントもしくはフロイント完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) がある。

30

#### 【0316】

1つの態様において、組成物はリポソームまたは膜小胞を含む。そのようなリポソームの例は、米国特許第2007/0026057号、Leserman (2004) およびvan Broekhoven et al. (2004) に記載されている。これらの場合には、本発明の化合物は、樹状細胞もしくはその前駆体に対してリポソームをターゲティングさせるために用いること、および/または、例えば、樹状細胞もしくはその前駆体に対する化合物-抗原結合物の送達を強化するために用いることができる。米国特許第2007/0026047号に概説されているように、本発明に用いるための膜小胞の調製のための方法は、WO 00/64471に記載されている。

40

#### 【0317】

免疫応答を誘導および/または強化するための組成物は、慣例的には注射によって非経口的に、例えば皮下、筋肉内または静脈内に投与される。他の投与様式に適したそのほかの製剤には、坐薬、および場合によっては経口製剤が含まれる。坐薬の場合、従来の結合剤および担体には、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドが含まれる。そのような坐薬は、有効成分を0.5% ~ 10%、好ましくは1% ~ 2%の範囲で含む混合物から形成することができる。経口製剤は、例えば、医薬品等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムのような、通常用いられる添加剤を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性製剤または粉末の形態をとり、有効成分が10% ~ 95%、好ましくは25% ~ 70%を占める。ワクチン組成物を凍結乾燥する場合には、凍結乾燥され

50

た材料を、投与の前に、例えば懸濁液として再構成することができる。再構成は好ましくは緩衝液中で行わせる。患者に対する経口投与のためのカプセル、錠剤および丸剤には、例えば、Eudragit「S」、Eudragit「L」、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロースまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む、腸溶性コーティングを施してもよい。

#### 【0318】

任意の治療レジメンにおいて、治療用組成物は、患者に対して、単独で、または他の治療物質、組成物などを含むカクテルとして投与することができる。

#### 【0319】

1つの態様において、免疫応答は、抗原と結合させた本発明の化合物をコードするDNAワクチンを用いることによって調節される。DNAワクチン接種は、対象の組織の細胞による抗原の発現のための、対象の組織中への、抗原をコードするDNAの直接的なインピボ導入を伴う。そのようなワクチンを本明細書では「DNAワクチン」または「核酸を基にしたワクチン」と呼ぶ。DNAワクチンは、米国特許5,939,400号、米国特許第6,110,898号、WO 95/20660、WO 93/19183、Demangel et al. (2005) およびNchinda et al. (2008) に記載されている。

10

#### 【0320】

現在までのところ、哺乳動物系におけるほとんどのDNAワクチンは、サイトメガロウイルス (CMV) に由来するウイルスプロモーターに依拠している。これらは、さまざまな哺乳動物種において筋肉接種および皮膚接種の両方で優れた効率を有している。DNA免疫処置によって誘発される免疫応答に影響を及ぼすことが知られている1つの要因はDNA送達の方法であり、例えば、非経口的経路は遺伝子移入の割合が低く、遺伝子発現のばらつきがかなり大きい恐れがある。遺伝子銃を用いたプラスミドの高速接種でマウスの免疫応答が強化されているが、これはおそらく、DNAトランスフェクションの効率がより高く、かつ樹状細胞による抗原提示がより有効であるためと考えられる。また、本発明の核酸を基にしたワクチンを含むベクターを、当技術分野で公知の他の方法、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈降、リポフェクション (リソソーム融合)、またはDNAベクター輸送体によって、所望の宿主内に導入することもできる。

20

#### 【0321】

抗原性ポリペプチドを産生するトランスジェニック植物は、当技術分野で周知の手順によって構築することができる。植物由来のさまざまな食用ワクチンが、現在、動物病原体およびヒト病原体の両方に対して開発中である。抗原エピトープを提示するウイルス様粒子 (VLP) またはキメラ性植物ウイルスを産生するトランスジェニック植物を用いた経口免疫処置によっても免疫応答がもたらされている。粒子状形態にあるこれらのVLPまたはキメラ性ウイルスは、胃内での抗原の安定性の増加をもたらして、消化管における取り込みに利用可能な抗原の量を有効に増加させる可能性がある。

30

#### 【0322】

##### 実施例

##### 材料および方法

##### マウス

40

C57BL/6J Wehi、C57/BL6Ly5.1、ならびにOVA特異的なCD8 (OT-I) およびCD4 (OT-II) TCR-トランスジェニックC57BL/6のバックグラウンドを持つマウスを、The Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) において特定病原体除去環境で交配させた。C57BL/6に対して戻し交雑させたTRIF<sup>-/-</sup> (Yamamoto et al, 2003) およびMyD88<sup>-/-</sup> (Adachi et al, 1998) に雑種形成を行わせ、TRIF<sup>-/-</sup>MyD88<sup>-/-</sup>ダブルノックアウトマウスを得た。C57BL/6に対して戻し交雑させたFcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウス (Van de Velde et al, 2006) は、Burnet Institute, Austinから入手した。雌性マウスを6~12週齢で用いた。または、齢を一致させた性別コホートを作成した。動物はNational Health and Medical Research Council of Australiaの指針に従って取り扱った。実験手順はWEHIのAnimal Ethics Committeeによる承認を得た。

50



## 【 0 3 2 3 】

## 5B6の配列同定

シーケンシングは、Big Dye Terminatorバージョン3.1 (Applied Biosystems, Victoria, Australia) および200ngのプラスミドDNAを用いて行い、ABI 3730xl 96キャピラリー自動DNAシーケンサー上での電気泳動にかけた。配列と、発現配列タグ、cDNAおよびタンパク質のデータベースとの比較は、National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) を用いて、基本局所配列比較検索ツール (basic local alignment search tool) (BLAST) によって行った。ゲノム位置決定は、University of California Santa Cruz, Genome Browser ([www.genome.ucsc.edu/](http://www.genome.ucsc.edu/)) を用いて、マウスのアセンブリ (2006年2月) およびヒトのアセンブリ (2006年3月) に対するBLATアラインメントによって行った。

10

## 【 0 3 2 4 】

## 定量的RT-PCR

RNA (最大1 µg) をRQ1 DNアーゼ (Promega) でDNアーゼ処理し、続いてランダムプライマー (Promega) およびSuperscript II 逆転写酵素 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) を用いてcDNAに逆転写させた。造血細胞における5B6およびGapdhの発現を決定するために、Quantitect SYBR Green PCRキット (Qiagen) およびLight cycler (Roche, Victoria; Australia) を用いて、リアルタイム逆転写PCR (RT-PCR) を行った。リアルタイムRT-PCRのための特異的プライマーは以下の通りとした。

20

5B6; 5'-TGTGACTGCTCCCACAACCTGGA-3' (SEQ ID NO:17); 5'-TTTGCACCAATCACAGCACAGA-3' (SEQ ID NO:18), *Gapdh*; 5'-CATTTGCAGTGGCAAAGTGGAG-3' (SEQ ID NO:19); 5'-GTCTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3' (SEQ ID NO:20)

95 °C、15分間の最初の活性化段階に続いて、94 °Cで15秒間 (変性)、50 ~ 60 °Cで20 ~ 30秒間 (アニーリング) および72 °Cで10 ~ 12秒間 (伸長) を40サイクル行い、その後に融点分析を行った。各遺伝子の発現レベルを、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$  pgの特異的DNA断片から作成した標準曲線を用いて決定し、Gapdhに対する相対的な比として表した。

## 【 0 3 2 5 】

## 5B6の組換え体の表面発現

30

完全長マウスおよびヒト5B6 (m5B6およびh5B6) を、脾臓DC cDNAから、Advantage cDNAポリメラーゼ (Clontech) および以下のプライマー:

[5B6: 5'-GCCATTTCTTGTACCAACCTACTCCT-3' (SEQ ID NO:21); 5'-CGGTGTGGTATGGATCGTCACTT-3' (SEQ ID NO:22)],  
[h5B6: 5'-AGCCTCCTGTGTGGACTGCTTT-3' (SEQ ID NO:23); 5'-TTCATGGCCCACATTTTGGTTT-3' (SEQ ID NO:24)]

を用いるPCR増幅によって単離し、その結果得られた産物をpGemT easyプラスミド (Promega) 中にサブクローニングした。m5B6およびh5B6を、C末端 (細胞外) FLAGタグ付加タンパク質としてチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の表面上に、および緑色蛍光タンパク質 (GFP) を5B6のN末端細胞質ドメインと融合させた融合タンパク質としてマウスEL4細胞の表面上に発現させた。FLAGタグ付加タンパク質を作製するためには、5B6をコードするcDNAをAdvantage high fidelityポリメラーゼ (Clontech) を用いて増幅し、AscIおよびMlu-1で制限消化した上で、FLAGエピトープを含むように改変されたpEF-Bosベクター (T. Willson博士; WEHIにより寄贈) 中にサブクローニングした。

40

## 【 0 3 2 6 】

CHO細胞に対して、pEF-Bos-5B6レクチン、およびネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含むpGK-neoプラスミドをエレクトロポレーション (Gene Pulsar, Biorad, NSW, Australia) によってコトランスフェクトし、トランスフェクト体を1mg / mlのG418 (Geneticin, Life Technologies) によって選択した。5B6レクチン陽性細胞をラット抗F

50

LAG mAbで、その後に抗ラットIg-PE (Caltag) で染色し、続いてフローサイトメトリー選別によって単離した。GFPタグ付加タンパク質は、5B6レクチンをコードするcDNAを増幅し、EcoRIで制限消化した上でpEGFP-C2 ベクター (Clontech) 中にサブクローニングし、その後EL4細胞へのエレクトロポレーションを行って、1mg/mlのG418で選択することによって作製した。5B6陽性細胞は、GFP陽性細胞のフローサイトメトリー選別によって単離した。完全長非タグ標識タンパク質は、5B6レクチンをコードするcDNAを増幅し、EcoRIで制限消化した上でpIRES-Neoベクター中にサブクローニングし、その後CHO細胞へのエレクトロポレーションを行って、1mg/mlのG418で選択することによって作製した。

【0327】

C型レクチンに対するmAbの作製

10

ウィスターラットに対して、50 µgのキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 結合ペプチド：5B6マウスペプチド

(H-DGSSPLSDLLPAERQRSAGQIC-OH) (SEQ ID NO:29)

、ヒトペプチド

(H-RWLWQDGSSPSPGLLPAERSQSANQVC-OH) (SEQ ID NO:30)

、または5B6-FLAGを発現する $1 \times 10^7$ 個のCHO細胞による免疫処置を4週間間隔で3~4回行い、さらに最終追加投与を行って、その4日後にSp2/0骨髓腫細胞と融合させた。特異的mAbを分泌するハイブリドーマを、C型5B6-FLAGを発現するCHO細胞およびGFP-5B6を発現するEL4細胞を用いた上清のフローサイトメトリー分析によって同定した。マウス5B6およびヒト5B6のそれぞれに対して特異的な反応性を呈したハイブリドーマが作製された。

20

【0328】

まとめると、以下のmAbが作製され、本研究に利用された。2種類のラットmAb 24/04-10B4 (ペプチド免疫処置による) および42/04-4202 (CHO-5B6-FLAG免疫処置による) がマウス5B6 (m5B6) に対して産生された。2種類のラット抗体20/05-3A4および23/05-4C6 (h5B6ペプチド免疫処置による) がh5B6に対して産生された。ラットMAb 24/04-10B4もヒト5B6を認識することが見いだされた。

【0329】

抗5B6抗体10B4のクローニング、発現およびシーケンシング

ハイブリドーマ24/04-10B4-24-8-FACS9-5から、Qiagen RNeasy miniキット (Qiagen) を製造元の推奨に従ってカラム上でのDNアーゼ消化とともに用いて、全RNAを単離した。5' RACE ready cDNAをSMART RACE cDNA増幅キット (Clontech) を用いて調製し、製造元が推奨している汎用プライマーおよび以下の遺伝子特異的プライマー (IgG2a遺伝子特異的プライマー：

30

CCAGGGCAGTGCTGGGTGCTT (SEQ ID NO:52)

、遺伝子特異的プライマー：

ACGGGTGAGGATGATGTCTTATGAACAA) (SEQ ID NO:53)

) を製造元の推奨に従って用いて、抗体の重鎖配列および軽鎖配列を増幅した。その結果得られたPCR断片をpGemTeasyプラスミド (Promega) 中にサブクローニングして、シーケンシングを行った。完全長IgG2a重鎖は

40

[TAGTAGGAATTCAGCACTGACAACAGAACCTTAAGCAGTATG (SEQ ID NO:54); TAGTAGCGCGGCCGCTTTACCAGGAGAGTGCGGAGAGACTCTTCTC (SEQ ID NO:55)]

を用いて増幅し、完全長 鎖は

[TAGTAGGAATTTCGGCGCGCCTCAAACAGGCAGGAGGAGCAAGATG (SEQ ID NO:56);

TAGTAGGCGGCCGCACGCGTCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACG ACGGGTGAGGATGATGTCTTATGAACAA (SEQ ID NO:57)]

およびHotstar DNAポリメラーゼ (Qiagen) を用いて増幅した。

#### 【0330】

PCR産物をゲルから切り出して、Qiaquick spin Gel抽出キット (Qiagen) を用いて精製し、EcoRIおよびNotI酵素で消化した上で、Minelute PCR精製キット (Qiagen) を用いて再び精製した。鎖はpcDNA 3.1 (Invitrogen) 中にサブクローニングした。重鎖は、pcDNA 3.1のNotI-XbaI領域内に可溶性Ova cDNAインサートと融合されたAla-Ala-Alaリンカーを含むように改変されたpcDNA 3.1ベクター (自家作製) 中にサブクローニングした。この構築物は、重鎖のC末端領域がアラニンリンカーおよびovaと融合された単一の融合タンパク質の作製を可能にする。プラスミドDNAをEndo-freeプラスミドDNA抽出キット (Qiagen) を用いて調製し、鎖、およびOvaと連結された重鎖をコードするプラスミドを、free style 293F細胞 (Invitrogen) に対して、製造元の推奨に従って一過性にコトランスフェクトした。一過性トランスフェクションから48時間後に上清を収集し、抗Clec9A-Ova Abの存在に関して検討した。組換えAbを、完全長 (膜結合型) 5B6を安定的に発現するCHO細胞と結合するその能力に関して確かめ、結合は (1) ビオチン化Ova特異的血清 (Calbiochem) とストレプトアビジンPE、および (2) 抗ラットIg PE (Caltag) という2通りのアプローチを用いて検出した。

#### 【0331】

DCの単離およびフローサイトメトリー分析

リンパ系器官からのDCの単離は、以前の記載の通りに行った (Vremec et al, 2000)。手短に述べると、組織を機械的に切り刻み、コラゲナーゼおよびDNアーゼで消化した上で、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で処理した。低密度細胞を密度遠心分離 ( $1.077\text{g/cm}^3$  Nycodenz, Axis-Shield, Oslo, Norway) によって濃縮した。非DC系列細胞をmAb (KT3-1.1、抗CD3; T24/31.7、抗Thy1; TER119、抗赤血球; ID3、抗CD19; および1A8、抗Ly6G) でコーティングし、続いて抗ラットIg磁性ビーズ (Biomagビーズ, QIAGEN, Victoria, Australia) を用いて除去した。血液DCは赤血球 (RBC) の除去 ( $0.168\text{M NH}_4\text{Cl}$ ; 4で5分間) および上記の通りの無関係な細胞を除去することによって濃縮したが、ただしmAbカクテルにはmAb F4/80も含めた。DC濃縮集団をラットIgおよび抗FcR mAb (2.4G2) を用いてブロックし、続いて、蛍光色素と結合させた、CD11c (N418)、CD205 (NLDC-145)、CD4 (GK1.5)、GD8 (YTS169.4)、CD24 (M1/69)、120G8またはCD45RA (14.8)、Sirp (pS4) およびm5B6 (24/04-10B4-ビオチン) に対するmAbで染色した。

#### 【0332】

cDCはCD11c<sup>hi</sup>CD45RA<sup>-</sup>またはCD11c<sup>hi</sup>120G8<sup>-</sup>として選択された。脾臓cDCは、CD4<sup>+</sup>cDC (CD11c<sup>hi</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>)、二重陰性 (DN) cDC (CD11c<sup>hi</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) およびCD8<sup>+</sup>cDC (CD11c<sup>hi</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>) にさらに細分された。胸腺DCはCD8<sup>-</sup>cDC (Sirp<sup>hi</sup>CD8<sup>lo</sup>) およびCD8<sup>+</sup>cDC (Sirp<sup>lo</sup>CD8<sup>hi</sup>) に細分された。LN cDCはCD8<sup>-</sup>cDC (CD11c<sup>hi</sup>CD205<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)、皮膚DC (CD11c<sup>+</sup>CD205<sup>int</sup>CD8<sup>-</sup>)、ランゲルハンス細胞 (CD11c<sup>+</sup>CD205<sup>hi</sup>CD8<sup>-</sup>) およびCD8<sup>+</sup>cDC (CD11c<sup>+</sup>CD205<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup>) に細分され、これらは以前の記載の通りであった (Lahoud et al, 2006)。pDCは、CD11c<sup>int</sup>CD45RA<sup>+</sup>またはCD11c<sup>int</sup>120G8<sup>+</sup>として分離された。ビオチン染色をストレプトアビジン (SA) -フィコエリトリン (PE) を用いて検出した。さまざまなDC集団上でのm5B6の発現を分析して、アイソタイプ対照染色 (IgG2a, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) と比較した。フローサイトメトリー分析はLSR II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 上で行い、自己蛍光およびヨウ化プロビジウム (PI) 陽性の死細胞は除外した。

#### 【0333】

ヒト血液DCおよび造血細胞の単離およびフローサイトメトリー分析

10

20

30

40

50

ヒト血液から、Ficoll-Pacque-PLUS (GE Healthcare, Rydalmere, NSW, Australia) 密度分離法を用いて、末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。血液ドナーからはインフォームドコンセントを得ており、採取はHuman Research Ethics Committee, Melbourne Health による承認を得た。PBMCをラットIgおよび抗FcR mAb (2.4G2) でブロックし、続いて、HLA-DRに対するmAb (L243; Becton Dickinson) ならびにPEと結合させた、系列マーカー、すなわちCD3 (BW264156; T細胞)、CD14 (Tuk4; 単球)、CD19 (6D5; B細胞) およびCD56 (AF12-7H3; NK細胞) に対するmAbのカクテルによって染色した。血液DCはHLA\_DR<sup>hi</sup>、系列細胞としてゲーティングされ、それらのBDCA-1 (ADJ-8E3)、BDCA-3 (AD5-14H2)、BDCA-4 (AD5-17F6) およびCD16 (VEP13) の発現に基づいてさらに分離された。PBMCは、CD3 (BW264156; T細胞)、CD19 (6D5; B細胞)、CD56 (AF12-7H3) およびNKp46 (9E2) (CD56<sup>+</sup>Kp46<sup>+</sup>; NK細胞) およびCD14 (Tuk4; 単球) に対するmAbを用いて単離された、他の造血細胞の供給源としても用いた。h5B6 (20/05-3A4) の発現に関する染色およびフローサイトメトリー分析を行い、PI陽性の死細胞は除外した。別に指定する場合を除き、抗ヒトmAbはすべてMiltenyi Biotec (North Ryde, NSW, Australia) から購入した。

10

20

30

40

50

#### 【0334】

##### マウス造血細胞上の5B6の単離および分析

脾細胞懸濁液を、DC単離の場合と同様に調製した (Vremec et al, 2000)。細胞を、CD3 (KT3-1.1)、CD19 (1D3)、NK1.1 (PK136)、CD49b (Hm 2; eBioscience, San Diego, CA, USA) に対するmAbで染色し、続いてB細胞 (CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>)、T細胞 (CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>) およびNK細胞 (CD49b<sup>+</sup>K1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) を選択した。脾臓マクロファージを1.082g/cm<sup>3</sup>の密度遠心分離 (Nycodenz) によってまず濃縮し、CD3<sup>+</sup> T細胞およびCD19<sup>+</sup> B細胞を免疫磁性ビーズによって除去した。濃縮された細胞を、CD11b (M1/70) およびF4/80に対するmAbで染色し、続いてマクロファージをCD11b<sup>hi</sup>F4/80<sup>+</sup>としてゲーティングした。骨髄マクロファージおよび単球は、脾臓の場合と同様にまず濃縮し、続いてCD11b (M1/70) およびLy6C (5075-3.6) で染色した。続いて単球を側方散乱<sup>Lo</sup>Ly6C<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup>としてゲーティングし、マクロファージをLy6C<sup>in</sup>CD11b<sup>hi</sup>としてゲーティングした。すべての細胞をラットIgおよび抗FcR mAb (2.4G2) でブロックし、その後抗5B6 mAb (10B4-ビオチン) を含むさまざまなmAbカクテルによる免疫蛍光染色を行った。ビオチン染色はストレプトアビジン-PEを用いて検出した。試料はLSR II (Becton Dickinson) 上で5B6の発現に関して分析し、PI陽性の死細胞は除外した。

#### 【0335】

##### 抗5B6 mAbを用いた免疫処置

マウス (C57BL6またはTRIF<sup>-/-</sup>MyD88<sup>-/-</sup>マウス) に対して、10 μgのラット抗5B6 mAb (10B4) またはアイソタイプ対照mAb 1 (IgG2a, eBioscience) またはアイソタイプ対照mAb 2 (IgG2a, -抗<sup>-</sup>-Gal, GL117) による皮下 (s.c.) または静脈内 (i.v.) の免疫処置を行った。血清試料を2~8週の時点で入手し、抗ラットIg反応性のレベルをELISAによって決定した。抗5B6 mAbおよびGL117対照mAbは、オボアルブミン (OVA) にも化学的に結合させた。遊離OVAおよび非結合mAbを除去するために結合物をクロマトグラフィーで精製した。mAbとOVAとの所望の比は1:1であり、これはSDS-PAGEおよびクーマシーブルー染色で確認される。それらが標的Agを引き続いて認識する能力は、トランスフェクトされた細胞株を結合物で染色し、ビオチン化OVA特異的血清 (Calbiochem) およびその後ストレプトアビジン-PEを用いて結合を検出することによって検証される。C57BL6マウスに対して、2.5~10 μgの10B4-Ova (OVAと結合させた抗5B6 mAb) または対照-OVA (OVAと結合させたアイソタイプ対照GL117 mAb) による免疫処置を行った。

#### 【0336】

##### 血清Abの検出のためのELISA

ELISAプレート (Costar, Broadway, Cambridge, UK) を、2 μg/mlのラットGL117 mAbにより、4℃で一晩かけてコーティングした。非結合mAbは洗い流した (PBS, 0.05% Tween-20)。系列希釈した血清試料をプレーティングして (PBS/5% 粉乳)、4℃で一晩インキュベートした。結合したマウス抗ラットIg抗体をロバ抗マウスIgG HRP (Chemicon Inte

rnational, Temecula, CA, USA) で検出し、ABTSを用いて視覚化した。光学密度が0.1を上回った場合に力価を陽性とみなした。抗ラット応答のアイソタイプは上記と同様にアッセイしたが、ただし検出には抗マウスIgG1-、IgG2b-、IgG2c-およびIgG3-HRP結合物(1/4000)を用いた(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)。抗OVA応答はプレートに10 µg/mlのOVAでコーティングすることによってアッセイし、抗ラットIg抗体を上記の通りに検出した。

#### 【0337】

##### 抗原提示アッセイ

10 µgの10B4-Ova(OVAと結合させた抗5B6 mAb)およびGL117-Ovaによる免疫処置を行ったマウスを1日後に殺処理し、脾臓を摘出した。別のものに記載された通りにDCを脾臓から単離し(Vremec et al, 2000)、CD8<sup>+</sup>またはCD8<sup>-</sup>DCをフローサイトメトリーによって精製した。

#### 【0338】

##### トランスジェニックT細胞の精製およびインビボ増殖アッセイ

トランスジェニックT細胞を精製し、カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)で標識した(Caminschi et al, 2006)。CFSE標識細胞(10<sup>6</sup>個)をC57BL6Ly5.1マウスに静脈内注射した。3日後に脾臓を摘出し、細胞懸濁液を調製してRBCを排除した上で、CD4(GK1.5-APC)またはCD8(YTS169-APC)およびLy5.2(S.450-15.2-PE)に対するmAbで染色した。増殖性のOT-II細胞(CD4<sup>+</sup>Ly5.2<sup>+</sup>)またはOT-I細胞(CD8<sup>+</sup>Ly5.2<sup>+</sup>)をCFSE蛍光の喪失によって視覚化し、一定数の校正用ビーズ(BD Pharmingen)の添加によって算定した。死細胞はPIを用いて除外した。分析はFACSCalibur装置(Becton Dickinson)を用いて行った。

#### 【0339】

##### CFSEで標識したT細胞の増殖アッセイ

精製したOT-I細胞を0.1% BSA/PBS中で1回洗浄し、続いて1×10<sup>7</sup>個/mlに再懸濁させた。CFSE(5mM)を添加し(1 µl/細胞10<sup>7</sup>個)、細胞を37 °Cで10分間インキュベートした。2.5% FCSを含むRPMI-1640培地を添加して、細胞を2回洗浄した。T細胞(5×10<sup>4</sup>個/ウェル)を、DC(10<sup>4</sup>個または別に指定した通り)とともに、U底96ウェルプレート内で、200 µlのDC培養液(10% FCS、100U/mlペニシリン、100 µg/mlのストレプトマイシン、10<sup>-4</sup>Mのメルカプトエタノールを含む改変RPMI-1640培地)中にインキュベートした。培養後にT細胞を算定するために、1ウェル当たり2.5×10<sup>4</sup>個の校正用ビーズ(BD Bioscience Pharmingen)を添加し、適切なマーカー(抗TCR-V $\beta$  2 mAb(B20.1-PE, Pharmingen))による染色によってT細胞を視覚化した。死細胞はヨウ化プロビジウムを用いて除外した。分析はFACScanまたはFACSCalibur(Becton Dickinson)上にを行った。増殖性のT細胞をCFSE蛍光の喪失によって同定し、ビーズに対して相対的に算定することで、1ウェル当たりの増殖性T細胞の総カウント数を求めた。

#### 【0340】

##### 可溶性5B6の組換え発現

可溶性5B6を作製するためには、ヒンジおよび外部ドメイン領域を含むcDNAを、Advantage high fidelity 2ポリメラーゼ(Clontech)および以下のプライマー

TAGTAGACGCGTGAGCAGCAGGAAAGACTCATC-3' (SEQ ID NO:25); 5'-TAGTAGACGCGTTTCAGATGCAGGATCCAAATGC-3'] (SEQ ID NO:26), [H5B6:5'-TAGTAGACGCGTCAGCAGCAAGAAAAACTCATC-3' (SEQ ID NO:27); 5'-TAGTAGACGCGTTTCAGACAGAGGATCTCAACGC-3'] (SEQ ID NO:28)

を用いて増幅した。増幅されたcDNAをMlu-1で制限消化し、大腸菌ピオチンホロ酵素シンテターゼBirAによって特異的に認識されるピオチン化コンセンサス配列(ペプチドコンセ

10

20

30

40

50

## ンサス配列

### NSGLHHILDAQKMVWNHR (SEQ ID NO:31)

）およびFLAGエピトープを含むように改変されたpEF-BosベクターのMlu-1部位にサブクローニングした。したがって、その結果得られたレクチン融合構築物は以下を含んだ（N末端から順に）：IL3シグナル配列（分泌を確実にするため）、ビオチン化コンセンサスペプチド配列、FLAG-タグ、ヒンジ領域およびレクチンドメイン。組換えタンパク質は、8  $\mu$ g DNA / 75cm<sup>2</sup> フラスコを含むDMEM-10% FCS中での、ヒュージーン（Fugene）を用いた、293T細胞（ポリオーマ / SV40ラージT抗原が安定的にトランスフェクトされたヒト腎臓上皮細胞株）の一過性トランスフェクションによって発現させた。8時間後に培地を除去し、細胞を2回洗浄した上で、10mlのX-Vivo-10タンパク質非含有 / 無血清培地（BioWhittaker, Walkersville, MD）中に36～60時間インキュベートした。分泌された組換えタンパク質を含む培地を収集し、培養上清からの組換えタンパク質を、カットオフ値10,000mwtの遠心分離装置（Nanosep 10K Omega, PALL Life Sciences）を用いて100倍に濃縮した。続いて、濃縮されたタンパク質をそのまま用いるか、またはBIR酵素（Avidity, Denver, CO）を用いて酵素的にビオチン化した。

#### 【0341】

#### 可溶性5B6を用いた結合アッセイ

293T細胞に対して、pIRES Neo中にある完全長非タグ付加5B6をコードする発現構築物を一過性にトランスフェクトした。2～3日後に細胞を収集し、（1）可溶性FLAGタグ付加ビオチン化m5B6、h5B6およびシーレで標識してストレプトアビジンPEで検出するか、または（2）可溶性FLAGタグ付加5B6、ビオチン化抗FLAG mAb 9H10およびストレプトアビジン-PE、のいずれかを用いる表面免疫蛍光標識を行った。生細胞を前方散乱もしくは側方散乱に関して、またはヨウ化プロピジウム排除によってゲーティングし、それらの可溶性5B6の表面結合に関して分析した。可溶性5B6の結合の特異性は、シーレなどの他の可溶性FLAGタグ付加C型レクチンに対する結合との比較によって示された。

#### 【0342】

#### ELISA

組換え可溶性タンパク質の分泌は、捕捉 / ツーサイト（two-site）ELISAによってアッセイした。手短に述べると、96ウェルのポリ塩化ビニル製マイクロタイタープレート（Costar, Broadway, Cambridge, UK）を、精製した捕捉用mAb、すなわち抗FLAG 9H10 12.5ug / ml（自家作製）でコーティングした。培養上清を、ビオチン化抗m5B6抗体（24/04-10134）-（2ug / ml）、ストレプトアビジン-HRPおよびABTS基質を用いて検出した。ビオチン化組換え可溶性タンパク質は、捕捉 / ツーサイトELISAによってアッセイした。手短に述べると、96ウェルのポリ塩化ビニル製マイクロタイタープレート（Costar, Broadway, Cambridge, UK）を、精製した捕捉用mAb、すなわち抗FLAG 9H10 12.5ug / ml（自家作製）でコーティングした。培養上清を、ストレプトアビジン-HRPおよびABTS基質を用いて検出した。

#### 【0343】

#### Flt3リガンドを培養させたDCの作製

骨髄（BM）細胞を大腿骨および脛骨から流出させ、0.168M NH<sub>4</sub>Clに対する短時間の曝露によって赤血球を溶解させた。細胞を、10mLのDC培養液（10% FCS、100U / ml ペニシリン、100  $\mu$ g / mlのストレプトマイシン、10<sup>-4</sup>Mのメルカプトエタノールを含む改変RPMI-1640培地）中に再懸濁させ、遠心分離によって2～3回洗浄した。細胞懸濁液を篩に通過させた。細胞を遠心分離し、DC培養液中に1.5 × 10<sup>6</sup>個 / mLとして再懸濁させた。Flt3L（FL）を200～300ng / mLの濃度で添加した。8日間の培養後に細胞を収集し、CD11c（N418-PE.Cy7）、Sirp（p84-FITC）、CD45RA（14.8-PE）および5B6（10B4-APC）に対する抗体で染色した。

#### 【0344】

#### 骨髄からの前駆体の単離

BM細胞を上記と同様に調製し、5mLのNycodenz培地（Nycomed Pharma）中に1.086g / cm<sup>3</sup>

として再懸濁させた。この細胞懸濁液の上に同じ密度の5mLの新たなNycodenz培地の層を重ね、さらに2mLのFCSの層を細胞懸濁液の上に重ねた。2900rpmで10分間遠心分離した後に、低密度の細胞を単離して、系列抗原 CD2、CD3、CD8、CD45R、CD11b、TER119およびLy 6Gに対する抗体でコーティングし、ビーズ8個 / 細胞の比のポリクローナルヒツジ抗ラットIgG磁性biomagビーズ (Qiagen) とともにインキュベートした。ビーズを磁石 (DynaI) を用いて除去し、非結合画分を、CD117 (ACK-2-FITC)、幹細胞抗原-1 (sca-1; E13 161-7-Alexa Fluor 680) およびCD34 (RAM34-ビオチン; ストレプトアビジン-PEで視覚化) またはCD117 (ACK-2-FITC)、CD135 (A2F10-PE) およびCD115 (AFS98-ビオチン; ストレプトアビジン-PerCP.Cy5.5で視覚化) に対するモノクローナル抗体 (mAb) で染色した。多能性始原細胞はCD117<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>画分として単離された。

10

#### 【0345】

培養物からのDC前駆体の単離

記載した通りに、BMを抽出して、細胞 $3 \times 10^6$ 個 / mLの濃度で培養した。培養の前に、細胞をCFSE (Molecular Probes) で標識した。CFSE標識は以前の記載の通りに行った。手短に述べると、細胞をPBS-BSA中での遠心分離によって2回洗浄し、 $1 \times 10^7$ 個 / mLの濃度で再懸濁させた。CFSEを細胞懸濁液に最終濃度0.5  $\mu$ Mとして添加し、この溶液を間欠的に混合しながら37 °Cで10分間インキュベートした。続いて、細胞を2回洗浄し、DC培養液中に再懸濁させた。

#### 【0346】

3.5日間の培養の後に細胞を収集し、低密度細胞を上記の通りにNycodenz培地 (1.086g / cm<sup>3</sup>) 中での遠心分離によって単離した。これらの細胞を、系列抗原 (CD19、CD127、MHCクラスII、Ly6GおよびTER119) に対するビオチン化抗体でコーティングして、抗ビオチン磁性ビーズとともにインキュベートした。結合した細胞を、MACS磁性カラム (Myltenyi) を用いて単離した。残りの系列<sup>+</sup>細胞を視覚化するために、除去処理を行ったこの画分をストレプトアビジン-PerCP.Cy5.5とともにインキュベートした。洗浄の後に、細胞を、CD11c (N418-PE.Cy7) および5B6 (10B4-APC) に対するmAbの組み合わせによって染色した。プレDCはCFSE<sup>low</sup> Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞として単離された。

20

#### 【0347】

### 結果

脾臓DCサブセット間の遺伝子発現パターンの比較

30

遺伝子発現プロファイル分析により、CD8<sup>-</sup> cDCと対比してCD8<sup>+</sup> cDCサブセットによって優先的に発現されるマウスcDNAクローンが同定された。5B6と命名されたこのクローンは、CD8<sup>+</sup> DCにおいて差異を伴って発現される、第6番染色体上に認められる遺伝子である「仮想的C型レクチン」の断片に相当した (Riken 9830005G006, (最近、C型レクチンドメインファミリー9、メンバーA、(Clec9a) Genbankアクセッション番号AK036399.1、Unigene ID Mm.391518と命名)。さらに、公開データベースの分析により、最近になってCLEC9A (Genbankアクセッション番号NM\_207345) と再命名された、第12番染色体上の5B6のヒトオルソログ (HEEE9341) が明らかになった。チンパンジー (Genbankアクセッション番号XP\_001143778)、マカクザル (XP\_001114857)、イヌ (Genbankアクセッション番号XP\_854151)、ウシ (XP\_873119)、ウマ (XP\_001493987) およびラット (Genbankアクセッション番号XP\_578403) などの他の動物にもオルソログが存在することが同定されている。

40

#### 【0348】

C型レクチンの同定、特性決定およびクローニング

本発明者らは、マウスおよびヒトの5B6をコードする完全長cDNAをPCRによって増幅し、遺伝子のシーケンシングを行った (図1Aおよび1B)。

#### 【0349】

13.4kbのゲノムDNAの範囲にまたがる7個のエクソンによってコードされるマウス5B6の完全長コード配列 (図1D) は、264アミノ酸 (aa) のタンパク質をコードする単一のオープンリーディングフレーム (ORF) (795bp) を含む (図1C)。ヒト5B6のコード配列は、12.9kbのゲノムDNAの範囲にまたがる6個のエクソンによってコードされ (図1D)、同様に

50

、241aaのタンパク質をコードする単一のORFを含む（図1C）。

#### 【0350】

マウスおよびヒトの5B6遺伝子はそれぞれ、その細胞外領域内にある単一のC型レクチンドメイン、細胞質尾部、およびシグナル伝達モチーフの可能性のあるYXXL残基を含む膜貫通領域を有する、膜貫通タンパク質と推定されるものをコードする（Fuller et al, 2007）（図1C）。ヒト5B6は、マウスのものよりも短いヒンジ領域を有する。マウスおよびヒトのタンパク質配列のアラインメントは図1Cに示されている（同一性53%；類似性69%）。提唱されるマウスおよびヒトの5B6タンパク質の構造の概略図は図1Eに示されている。

#### 【0351】

NCBI Blastタンパク質分析を用いることで、m5B6はマウスのデクチン-1（Clec7A）、Clec12BおよびNKG2Dとの配列類似性が最も高く、一方、h5B6はLOX-1（Clec8A）、Clec12BおよびDCAL-2（Clec12A）と最も類似していることが明らかになった。5B6のCTLDは、古典的なC型レクチンであるラットマンノース結合タンパク質A（MBP-A）と同じく、2つのジスルフィド結合を形成する4個の保存的なシステイン残基を有する（図2）。さらに、5B6は、さらに2つのシステイン残基をネック（neck）領域に保有し、これらはタンパク質のホモ二量体化を可能にする可能性がある（Weis et al, 1998）。決定的に重要なこととして、古典的なC型レクチンにおいて $\text{Ca}^{2+}$ 結合に関与する残基はマウスおよびヒトの5B6には存在しない（図2）。

#### 【0352】

マウス5B6の遺伝子発現

マイクロアレイ分析により、5B6は、 $\text{CD8}^+$  DCと対比して $\text{CD8}^+$  DCにおいて3.5倍の高さのレベルで、DN DCと対比して $\text{CD8}^+$  DCにおいて2.6倍の高さのレベルで発現されると予想された。このため、本発明者らはプライマーを設計し、マウス脾臓cDCサブセットにおける5B6の発現を定量的RT-PCRによって調べた。5B6は $\text{CD8}^+$  cDCによって優先的に発現されることが確認された。脾臓 $\text{CD8}^+$  DCは脾臓 $\text{CD4}^+$  cDCよりも22倍の多さのmRNAを発現した（図3A）。

#### 【0353】

本発明者らは、一団の造血細胞種にわたってのマウスおよびヒトの5B6遺伝子の発現を定量的リアルタイムRT-PCRによって検討した。5B6 mRNAの発現はcDCおよびpDCの双方のDCに特異的であり、NK細胞におけるmRNA発現は中等レベルであった（図3B）。これは $\text{CD8}^+$  cDCと対比して脾臓 $\text{CD8}^+$  DCにおいて優先的に発現された。これはまた、胸腺 $\text{CD8}^+$  cDCおよびLN  $\text{CD8}^+$  DEC205<sup>hi</sup> cDCにおいても差異を伴って発現された（図3A）。さらに、3種類の脾臓cDC集団のすべてにおいて、遺伝子発現は、それぞれToll様受容体9および4に対するリガンドであるCpGおよびLPSによるインビゴ活性化の3時間後には低下した（図3C）。

#### 【0354】

マウス5B6タンパク質の表面発現

m5B6およびh5B6のタンパク質発現について調べるために、本発明者らは、5B6トランスフェクト細胞の表面にあるタンパク質をフローサイトメトリーによって認識するmAbを作製した。一団の新たに単離したマウス造血細胞をmAb 10B4で染色することにより、m5B6がcDCのあるサブセット上およびほとんどのpDC上で発現されることが指し示された（図4A）。注目されることに、m5B6タンパク質は、T細胞、ほとんどのB細胞、単球およびマクロファージを含む、調べた他のほとんどの造血細胞上では検出されなかった。若干のmRNAを発現したNK細胞上でも、それは同じく検出されなかった（図4A）。しかし、B細胞のわずかな（3%）割合は、m5B6に関して明らかに陽性染色された。10B4による何らかの染色が認められたのは骨髓細胞のおよそ3%に過ぎず、このほとんどは弱かった。したがって、造血系において、m5B6の表面発現は主としてDCに限定されて生じる（図4A）。加えて、mAb 10B4による凍結切片の染色からも、DCに起因する範囲を越える染色は認められなかった（非提示データ）。

#### 【0355】

続いて、脾臓、LNおよび胸腺cDC上でのm5B6の表面レベルを比較した。m5B6は、脾臓、

10

20

30

40

50



胸腺およびLNのCD8<sup>+</sup> cDCによって発現された(図4A)。ほとんどの脾臓、胸腺およびLN CD8<sup>+</sup> cDCならびに遊走性cDC(皮膚DCおよびランゲルハンス細胞)は、m5B6発現に関して陰性であった(図4A、B)。しかし、CD8<sup>+</sup> cDCのわずかな割合は、バックグラウンド染色を上回るものを示した。これは、このCD8<sup>+</sup> cDCゲーティングの内部に存在することが知られている、まだCD8<sup>+</sup>を発現していないCD8<sup>+</sup> cDC系列のDCのわずかな割合に起因する可能性がある。炎症性マウス脾臓由来の炎症性CD11<sup>int</sup>CD11b<sup>hi</sup> DCの標本上では、m5B6染色は全く検出されなかった(Naik et al, 2006)(非提示データ)。これらのDC表面発現プロファイルは、定量的RT-PCRによって観察された遺伝子発現と一致した(図3)。

#### 【0356】

マウス血液DC上でのマウス5B6の表面発現

10

マウス血液は、脾臓内に認められるDCと比べて成熟DC(CD11c<sup>hi</sup>)を極めてわずかしが含まず、これらのわずかな血液DCではCD8の発現はみられない(O'Keefe et al, 2003)。しかし、マウスでは、CD24発現はCD8の発現と相関づけられている。血液内の成熟DCのわずかな割合はこのマーカーを発現する。おそらくこれらの細胞はCD8<sup>+</sup>になる途上にあると考えられる。血液DC上での5B6の発現を明らかにするために、本発明者らはそれらを単離して、CD24および5B6によって染色した。CD24を発現するDC(これらはCD8<sup>+</sup>DCになるように運命づけられている)は5B6も発現する(図4C)。

#### 【0357】

マカクザルおよびヒトの5B6の表面発現

20

ヒト5B6(h5B6)の表面発現について調べるために、本発明者らは、フローサイトメトリによる測定でh5B6-トランスフェクト細胞の表面上の天然タンパク質を認識した(非提示データ)、2種類のモノクローナル抗体(20/05-3A4; 23/05-4C6)を作製した。ヒトまたはマカクザルから新たに単離した末梢血細胞の染色により、5B6はDCのサブセット上で発現されることが指し示された(図5)。特に、HLADR<sup>+</sup> DCのわずかなサブセットはh5B6に関して陽性であった(図5A)。ほとんどの他のヒト血液細胞は陽性染色を示さなかったが、ヒト血液B細胞上では低レベルの染色が観察された(図5B)。5B6を発現するDCがマウス血液に見いだされるものと類似しているか否かを明らかにするために、これらの血液DCをBDCA-1、BDCA-3およびBDCA-4によっても染色した。mAb 3A4または4C6による染色は、わずかなBDCA-3<sup>+</sup> DCサブセット(マウスCD8<sup>+</sup> cDCの等価物と提唱されている)に限定され、BDCA-4<sup>+</sup>サブセットには存在しなかった(非提示データ)。このことは、h5B6が、マウスCD24<sup>+</sup>に類似した種類のcDCであるCD8<sup>+</sup> DC系列上には存在するが(Galibert et al, 2005)、マウスとは対照的に、pDC上には存在しないことを示唆する。

30

#### 【0358】

さらに、抗マウス5B6 Ab(10B4)はh5B6と結合することが見いだされた。トランスフェクト細胞の表面上(非提示データ)およびヒトBDCA-3<sup>+</sup> DC上でのh5B6の発現はいずれも、抗マウス5B6 mAb(10B4)を用いて検出することができたものの、抗h5B6 Ab(4C6)で観察されたレベルよりも低かった(図5C)。

#### 【0359】

免疫調節における5B6の役割

40

ある種のDC表面分子に対するAgを標的とするAbは、免疫応答を調節することができる(Bonifaz et al, 2002; Finkelman et al, 1996; Carter et al, 2006)。CD8<sup>+</sup> DC上で発現される表面分子Fireに対するAbは体液性免疫を強化すること、および、DCターゲティングに関する他の研究とは対照的に、この強化は追加のアジュバントも危険シグナル(danger signal)も必要としないことが以前に実証されている(Corbett et al, 2005)。残念ながら、Fireには細胞表面で発現されるヒトでの対応物はないが(Caminschi et al, 2006)、5B6は、マウスおよびヒトで共通しており、ヒトへの応用の可能性をもたらすものである。こうしたことから、5B6を介したDCに対する抗原のターゲティングの効果を調べた。混入性LPS(エンドトキシン)が免疫処置においてアジュバントとして作用したという可能性を除外するために、これらの実験で用いたmAbはすべてLPS混入に関して検査し、検出限界(1 EU/ml)未満であったことが見いだされている。これは、アイソタイプ対照mA

50

bに対する免疫を強化するために必要な20ngのLPSよりも1 logを超えて少ない（非提示データ）。

#### 【0360】

5B6に対するAbを、体液性免疫を調節するために用いるか否かを明らかにするために、マウスに対して、10  $\mu$ gの抗5B6（10B4）またはターゲティングされていないアイソタイプ対照（GL117）mAbによる免疫処置を静脈内に行った。ラットIgG2aはマウスにおいて抗原性であるが、これはこのターゲティング性mAbそれ自体が外来性抗原決定基を含むためである。このため、免疫応答に対するDCターゲティングの効果を、ELISAアッセイで抗ラットIgG応答を測定することによって評価することができる。このアッセイでは、ターゲティングされていないAb（GL117）を被覆Agとして用いるため、非特異的結合のいかなるバイアスも、ターゲティングされていない免疫原に関するものと考えられる。

10

#### 【0361】

追加のDC活性化物質を伴わない、抗m5B6 mAb 10B4の単独での注射は、顕著かつ長期的な抗ラットIg応答を生じさせた（図6）。およそ2  $\mu$ gの10B4は最適な応答を生じさせたが、16ngほどの少なさであっても検出可能な力価をもたらした（図6A、B）。10  $\mu$ gのターゲティング性mAbに対する応答は、10  $\mu$ gの非ターゲティング性アイソタイプ対照mAbの5000倍の高さであった。有意な抗ラットIg価を得るためには、ターゲティングされたmAbと比較して、少なくとも3000倍高いレベルの非ターゲティング性ラットIgが必要であった（図6A、B）。さらに、ターゲティング性抗5B6 mAbを用いてひとたび抗ラット反応性が確立されれば、非ターゲティング性アイソタイプ対照ラットIgは有意な追加刺激をもたらしたが、このことは記憶応答が生じたことを示唆する（図6C）。5B6ターゲティングによって誘導される抗ラットIg応答はIgG1アイソタイプによるものが優位であるが、有意なIgG2c成分を含め、他のアイソタイプもかかわっていた（図6D）。

20

#### 【0362】

抗5B6 mAbはAgをCD8<sup>+</sup> DCに送達するために用いることができる

DC上のm5B6に対するAgのターゲティングによって得られる強化された抗体応答の顕著な特徴は、追加のDC活性化物質もアジュバントも用いていないことである（図6、7A、B、C）。用いた10B4 mAbは「エンドトキシン非含有」条件下で調製しており、濃縮されたmAbは検出可能なエンドトキシンを含まなかった（1 EU/ml未満）。強化された抗体応答が微量のエンドトキシンまたは他の微生物産物に起因するのではないことを確かめるために、Toll様受容体（TLR）リガンドに応答することができないMyD88<sup>-/-</sup>TRIF<sup>-/-</sup>マウスを用いて実験を再度行った。m5B6に対するmAbの注射によるラットIgに対する同等で強力な抗体応答の誘導がこれらのマウスでも認められ（図7A）、このことはこの応答がTLRリガンドによって媒介される「危険」シグナルとは無関係であることを指し示している。リポ多糖（LPS）を意図的にターゲティング性抗5B6 mAbとともに注射したところ、抗体応答は強化されたこともあれば（図7D）、そうでないこともあった（図7E）。

30

#### 【0363】

強化された応答について可能性のある理由としては、抗m5B6 mAbとFcRとの結合、さらにはm5B6それ自体も考えられる。この可能性は、Fc RIまたはFc RIII<sup>34</sup>の活性化を通じてシグナルを伝達することができないFcR 鎖欠損マウスへの10B4 mAbの注射によって否定された（図7B）。これらは対照マウスと同一な抗ラットIg応答を生じた。

40

#### 【0364】

体液性応答の強化は、DCにAgを送達するように設計したターゲティング戦略によって得られたことから、この強化はAg特異的なCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞の活性化に主として起因すると推定された。しかし、一部のB細胞は少量の5B6を発現したため、B細胞への直接的なターゲティングの可能性を否定することはできないと考えられる。胸腺由来T細胞を欠くヌードマウスに抗5B6 mAb 10B4を注射することによって、T細胞の役割について検証した。ラットIgに対する強化された抗体応答は消失しており（図7C）、このことはそれがヘルパーT細胞に依存することを示している。

#### 【0365】

50

抗5B6 mAbは、化学的に連結されたOVA Agを送達し、抗OVA抗体応答を強化するために役立てることもできる。陽性の抗OVA価を生じさせるためには400倍の高さのレベルの遊離OVAの注射が必要であり、それでもなお、これは抗5B6 mAbを介したDCへのOVAのターゲティングによって誘導される力価よりも数桁小さかった（図7E、F）。

#### 【0366】

抗5B6 Abは、アジュバントの存在下および非存在下において、種々の経路を介した抗原送達に極めて有効である

本発明者らは、種々の投与経路を介した、5B6 (Clec9A) に対する抗原のターゲティングが体液性応答に及ぼす効果を比較した。抗5B6 Ab (10B4) の静脈内、皮下および腹腔内投与はすべて、ラットIgに対する体液性応答を有意に強化し、一方、アイソタイプ対照Ab (GL117) を用いた場合はごくわずかな応答しか観察されなかった（図10A）。さらに、5B6に対する抗原のターゲティングは、アジュバントの非存在下でも強力な体液性応答を誘導した。アジュバントの共投与が、生じる抗体応答をさらに強めることができるか否かを明らかにするために、マウスに対して、抗5B6 (10B4) mAbまたはアイソタイプ対照 (GL117) と、LPS (1  $\mu$ g) またはCpG (10  $\mu$ g) とを静脈内注射した。10B4による抗原のターゲティングは、アジュバントを伴う場合も伴わない場合も強い体液性応答を誘導し、アジュバントの添加は一次的な体液性応答およびその後の記憶応答を強化するように見えたが、それはわずかに過ぎなかった（図10B）。したがって、抗5B6 mAbを用いた5B6に対する抗原のターゲティングはアジュバントを伴っても伴わなくても成功裏に用いうると考えられる。ワクチン戦略は、ワクチン接種の対象となる病原体または抗原性材料、および必要な応答の種類に従って/ 応じて、設計することができる。

#### 【0367】

m5B6のターゲティングに対する強化されたT細胞応答

特定のAgに対するT細胞応答が5B6に対するAgのターゲティングによって強化されたか否かを直接明らかにするために、少数のCFSE標識したOVA特異的なCD8 (OT-I) またはCD4 (OT-II) トランスジェニックT細胞をC57BL/6マウスに養子免疫移入し、続いてそれに対してOVAと結合した抗m5B6 (10B4) またはOVAと結合したアイソタイプ対照mAb (GL117) による免疫処置を行った。3日後に、移入したAg特異的T細胞の増殖応答を、CFSE蛍光の減少として算定した。非ターゲティング性対照OVAと結合したmAbによるマウスの免疫処置はOT-I増殖もOT-II増殖も誘導することができず、このことは、提示されたAgがこれらのT細胞を活性化するには不十分であったことを指し示している。これとは対照的に、抗m5B6-OVA mAb結合物によるマウスの免疫処置は、OT-IおよびOT-II T細胞のいずれもの大幅な増殖を誘導した（図8）。m5B6にターゲティングされたAgは、CD4およびCD8 T細胞のいずれもの活性化の強化をもたらした。

#### 【0368】

5B6分子を細胞表面に発現するCD8<sup>+</sup> DCは、ナイーブOT-I細胞を活性化して増殖させたが、一方、CD8<sup>-</sup> DCはそうではなく（図9）、このことは抗5B6 mAb (10B4-OVA) による免疫処置がOVA AgをCD8<sup>+</sup> DCサブセットに成功裏に輸送したことを立証している。

#### 【0369】

m5B6に対する結合はDCを活性化する

抗m5B6によるDCへのAgのターゲティングに対する強化された抗体応答またはT細胞応答を得るためには追加のDC活性化物質もアジュバントも必要でなかったことから、DC活性化シグナルは5B6それ自体によって与えられたと考えることが可能である。DCが活性化されたか否かを確かめるために、それらを、ターゲティング性抗5B6 mAb 10B4による免疫処置を行ったマウスの脾臓およびLN、ならびに免疫処置を行わなかった対照マウスから単離した。DCを、DC成熟マーカーであるMHCクラスII、CD80、CD86およびCD40に対する抗体とともに、DCサブセット分離用マーカーによって染色した。mAbの主要な標的であるCD8<sup>+</sup> cDCを含め、いずれのDCサブセットにおいても、DC活性化に関するこれらのマーカーの増加の証拠はみられなかった（非提示データ）。5B6に対するAgのターゲティングは、DC活性化の通常の徴候を伴わずに免疫応答を強化するように見えた。

## 【0370】

可溶性5B6は膜結合型5B6と種交差的な様式で相互作用することができる

5B6分子の結合パートナーを同定するために、本発明者らは、ストーク領域およびC型レクチン様ドメイン(CTLD)を含む5B6の外部ドメインを範囲に含む、図11A中に「元のもの(ストークを有する)」として表した、可溶性FLAGタグ付加m5B6およびh5B6を作製した。可溶性のFLAGタグ付加外部ドメイン型のC型レクチンシーレも、対照分子として作製した。可溶性5B6(ストークおよびCTLDを有する)を、pIresNeoベクター中にある完全長非タグ付加5B6構築物による一過性トランスフェクション後に膜結合型m5B6およびh5B6を発現する293T細胞との結合に関してスクリーニングした。可溶性マウス5B6は、膜結合型マウス5B6およびヒト5B6を発現する293T細胞のいずれとも結合することができたが、モック(DNAを有しない)トランスフェクト293T細胞との結合はごくわずかまたは皆無であった(図11B)。同様に、可溶性ヒト5B6は、膜結合型マウス5B6およびヒト5B6を発現する293T細胞のいずれとも結合することができたが、モックトランスフェクト293T細胞とは結合しなかった。対照的に、対照可溶性分子シーレは対照またはトランスフェクト細胞株のいずれともごくわずかな結合しか示さなかった。したがって、可溶性5B6は膜結合型5B6と種交差的な様式で相互作用することができる。

## 【0371】

この相互作用をさらに特徴づけるために、本発明者らは、5B6のCTLDを含むがストーク領域は含まない、図11A中に「可溶性タンパク質-2/3(ストークを有しない)」と表した、ビオチン化可溶性FLAGタグ付加m5B6およびh5B6を作製した。可溶性マウスおよびヒト5B6は両方とも、膜結合型マウス5B6を発現するCHO細胞とは結合することができたが、非トランスフェクトCHO細胞との結合はごくわずかまたは皆無であった(図11c)対照的に、対照可溶性分子シーレは対照またはトランスフェクト細胞株のいずれともごくわずかな結合しか示さなかった。膜結合型5B6に対する可溶性5B6の結合は、元の5B6タンパク質(ストーク+CTLD)および可溶性2/3タンパク質(CTLDのみ、ストークは有しない)のいずれを用いても検出され、このことは5B6のCTLDが膜結合型5B6との種交差的な相互作用を媒介していることを指し示している。

## 【0372】

DC前駆体上でのマウス5B6の表面発現

本発明者らは、一団の造血前駆体およびDC前駆体上での表面発現を調べた。5B6の表面発現は、すべての造血系列への分化能を保っている、運命づけられていない(uncommitted)初期の多能性始原細胞上では検出されなかった。対照的に、培養下または照射を受けたレシピエント内でDCを生成することができる直前の前駆体であるプレDCは、5B6の低レベルの発現を示した。5B6発現はFlt3リガンド生成Sirp<sup>+</sup>cDC(エキスピボのCD8<sup>+</sup>cDCと機能的に同等(Naik et al, 2005))およびpDC上では検出されたが、同じ培養物からのSirp<sup>+</sup>cDC上では検出されなかった(図12)。

## 【0373】

抗5B6抗体10B4のクローニング、発現およびシーケンシング

本発明者らは抗5B6 Ab 10B4の重鎖および軽鎖をクローニングし、さらに重鎖および軽鎖を個別の発現ベクター中にサブクローニングした。これにより、重鎖、ならびに重鎖のC末端領域がアラニンリンカーおよびovaと融合された単一の融合タンパク質重鎖の作製が可能になった。組換えAbの産生はfreestyle 293F細胞の一過性トランスフェクションによって行った。

## 【0374】

mAb 24/04-10B4の重鎖(SEQ ID NO: 42)および軽鎖(SEQ ID NO: 47)のアミノ酸配列は、対応する遺伝子のシーケンシングによって決定した。

## 【0375】

抗5B6-Ova組換えAbが5B6を認識する能力は、組換えAbによるCHO-5B6トランスフェクト細胞の標識、ならびに抗Ovaおよび抗ラットIg試薬を用いた検出によって確認した。組換えAbはCHO-5B6細胞と結合することが示されたが(図13)、一方、親(非トランスフェク

ト) CHO細胞を用いた場合は、染色はごくわずかしき、または全く検出されなかった。

【0376】

当業者には、概括的に記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく、具体的な態様に示された本発明に数多くの変更および／または改変を加えうることが理解されることが考えられる。したがって、本発明の態様はあらゆる面において限定的なものではなく、例示的なものであるとみなされるべきである。

【0377】

本出願は、そのすべての内容が参照により本明細書に組み入れられる、US 61/052,865 およびUS 60/969,118に対する優先権を主張する。

【0378】

本明細書で考察および／または参照したすべての刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0379】

本明細書に含まれる文書、行為、材料、装置または物品などの議論は、単に本発明に関する状況を提供することのみを目的としている。それは、これらの事項のいずれかまたはすべてが、先行技術基盤の一部を構成すること、または本出願の各請求項の優先権主張日の前に存在していたために本発明に関連する分野における共通の一般的知識であったことを認定するものとみなされるべきではない。

【0380】

参考文献

10

20

- Adachi et al (1998) *Immunity* 9:143-150.
- Almeida and Allshire (2005) *TRENDS Cell Biol* 15: 251-258.
- Al-Mufti et al (1999) *Am. J. Med. Genet.* 85:66-75.
- Bauer et al (2002) *Int J Legal Med* 116:39-42.
- Belz et al (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8670-8675.
- Bird et al (1988) *Blood* 80:1418-1422.
- Bonifaz et al (2002) *J Exp Med* 196:1627-1638.
- Bourque (1995) *Plant Sci.* 105:125-149. 10
- Caminschi et al (2006). *DNA Seq.* 17:8-14.
- Carter et al (2006) *J Immunol* 177:2276-2284.
- Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917.
- Colcher et al (1986) *Methods Enzymol.* 121:802-816.
- Corbett et al (2005) *Eur J Immunol* 35:2815-2825.
- Demangel et al (2005) *Mol Immunol* 42:979-985.
- den Haan et al (2000) *J Exp Med* 192:1685-1696.
- Drickamer (1999) *Cur. Opin Struct Biol* 9:585-590. 20
- Dudziak et al (2007) *Science* 315:107-111.
- Dunbrack, et al (1997) *Folding and Design*, 2:R27-42.
- Finkelman et al (1996). *J Immunol* 157:1406-1414.
- Fuller et al (2007) *J Biol Chem* 282:12397-12409.
- Galibert et al (2005) *J Biol Chem* 280:21955-21964.
- Greenwood et al (1993) *Eur J Immunol* 23: 1098-1104.
- Haseloff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591.
- Harayama (1998) *Trends Biotechnol.* 16:76-82. 30
- Hochrein et al (2001) *J Immunol* 166:5448-5455.
- Huston et al (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-5883.
- Jones et al (1986) *Nature* 321:522-525.
- Lahoud et al (2006) *J Immunol* 177:372-382.
- Leserman (2004) *J Liposome Res* 14:175-189.
- Miller (1990) *Blood* 76:271-278.
- Millar and Waterhouse (2005) *Funct Integr Genomics* 5:129-135.
- Morrison et al (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851-6855. 40
- Naik et al. (2005) *J Immunol* 174:6592-6597.
- Naik et al (2006) *Nat Immunol* 7:663-671.
- Nchinda et al (2008) *J Clin Investig* 118:1427-1436.
- Needleman and Wunsch. (1970). *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453.

- O'Keeffe et al (2002) *J Exp Med* 196:1307-1319.
- O'Keeffe et al (2003) *Blood* 101:1453-1459.
- Pasquinelli et al (2005) *Curr Opin Genet Develop* 15: 200-205.
- Pastan et al (1986) *Cell* 47: 641-648.
- Perriman et al (1992) *Gene* 113: 157-16.
- Pooley et al (2001) *J Immunol* 166:5327-5330.
- Proietto et al (2004) *Immunobiology* 209:163-172.
- Schnorrer et al (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10729-10734. 10
- Senior (1998) *Biotech. Genet. Engin. Revs.* 15:79-119.
- Shippy et al (1999) *Mol. Biotech.* 12: 117-129.
- Shortman and Liu (2002) *Nat Rev Immunol* 2:153-163.
- Shortman and Naik (2007). *Nat Rev Immunol* 7:19-30.
- Smith et al (2003) *J Immunol* 170:4437-4440.
- Smith et al (2000) *Nature* 407: 319-320.
- Sun et al (1986) *Hybridoma* 5S1:517-520.
- Takeda et al (2003) *Annu Rev Immunol* 21:335-376. 20
- Thorpe et al (1987) *Cancer Res* 47: 5924-31.
- Van Broekhoven et al (2004) *Cancer Res* 64:4357-4365.
- Vandenabeele et al (2001) *Blood* 97:1733-1741.
- Van de Velde et al (2006) *Springer Semin Immunol* 28:329-338.
- Vitetta et al (1987) *Science* 238: 1098 -1104.
- Vremec et al (2000) *J Immunol* 164:2978-2986.
- Waldmann (1991) *Science* 252: 1657-1662.
- Waterhouse et al (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959-13964
- Weis et al (1998) *Immunol Rev.* 163:19-34. 30
- Yamamoto et al (2003) *Science* 301:640-643.

#### A. マウス5B6のコード配列

#### A. マウス5B6のコード配列

[illegible]

### B. ヒト586のコード配列

TCGACGACGACGACAAATATACACGCTCTCTCTCGCGGGATAGCCACGACACGACATCTCAGGAAAGAGATGTCCTCTCCACAAAGCTGTG  
 AGAGCATGCTGCTCTTGATGGTGGTAACTTCAGTGGTCTTCTGACGGAGATATTAACAGATCACTGATTTCTGGGGGCTCAGTGGTATGTC  
 AGGTGTGCTAGCTTCGATGCGACGACGAAAGAACTCATCCACAGGACAGGGCCATGCTAAACTTTCACGAGATGAGGAGAGAGAGCTGT  
 GCGCTTCAGTGAATATTCGACAGAGCTTCTGCGAAACTCTTAAGTCAGCGGCTACGACGAGCTGCTGTGTCCACAGATCTGGATCTGA  
 CAGGACGAGAGAGTGTCTACTGCTGCTCTGCGTGGGGCTCTTGCCACGCGCTCCAGGAGATCTGTTTAAAGGAGAGCTCCGACGATCTG  
 GAGGAG  
 CAGATGACACACGCGGACCTGCTGCTGCGAAGTGGCTGCTCTCTCTCTCTGCGCGAGAGCTGTGGCGCGAGAGAGATCCGACGACCTAA  
 CAGAGTCTGGATAGCTAGCGAAGAAAGATTCGCTCTTCTGCTCTGCTCTGACGCGACGAGCGGAGATATTTATCTCTGAGAGAGTGTGGCTGTG  
 GATCTCTGCTGCTGA

C. 予想されるタンパク質配列

[illegible]

↑

D. ゲノム構造

m596

1 2 3 4 5 6 7

エクソン 91 123 486 140 77 151 118 132

イントロン 123 97 377 141 104

m595

1 2 3 4 5 6

エクソン 140 48 67 143 151 171 130

イントロン 140 48 67 143 151 171 130

E. タンパク質の視覚図

m596

m595

—Ch—BA —X—C—R—H—N—W—F—O—L—A

[illegible]

**A** **Figure 1** **DC**

**A** **Figure 1** **DC**

**脾臓 (Spleen):**

- pDC:** CD38<sup>low</sup> vs CD11c<sup>+</sup> plot. Histograms for CD8<sup>+</sup>cDC, CD8<sup>+</sup>cDC, and CD8<sup>+</sup>cDC.
- cDC:** CD11c<sup>+</sup> vs CD11c<sup>+</sup> plot. Histograms for CD8<sup>+</sup>cDC, CD8<sup>+</sup>cDC, and CD8<sup>+</sup>cDC.

**血液 (Blood):**

- pDC:** CD38<sup>low</sup> vs CD11c<sup>+</sup> plot. Histograms for CD8<sup>+</sup>cDC, CD8<sup>+</sup>cDC, and CD8<sup>+</sup>cDC.
- cDC:** CD11c<sup>+</sup> vs CD11c<sup>+</sup> plot. Histograms for CD8<sup>+</sup>cDC, CD8<sup>+</sup>cDC, and CD8<sup>+</sup>cDC.

**皮下 LN DC (Skin LN DC):**

- pDC:** CD38<sup>low</sup> vs CD11c<sup>+</sup> plot. Histograms for CD8<sup>+</sup>cDC, CD8<sup>+</sup>cDC, and CD8<sup>+</sup>cDC.
- cDC:** CD11c<sup>+</sup> vs CD11c<sup>+</sup> plot. Histograms for CD8<sup>+</sup>cDC, CD8<sup>+</sup>cDC, and CD8<sup>+</sup>cDC.

**骨髄 (Bone Marrow):**

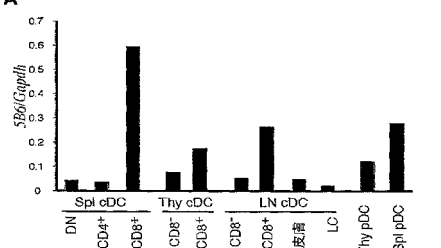
- pDC:** CD38<sup>low</sup> vs CD11c<sup>+</sup> plot. Histograms for CD8<sup>+</sup>cDC, CD8<sup>+</sup>cDC, and CD8<sup>+</sup>cDC.
- cDC:** CD11c<sup>+</sup> vs CD11c<sup>+</sup> plot. Histograms for CD8<sup>+</sup>cDC, CD8<sup>+</sup>cDC, and CD8<sup>+</sup>cDC.

### B 脾臟

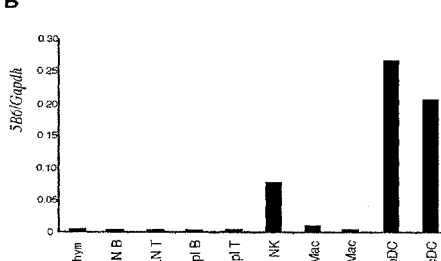
**C 血液**

A

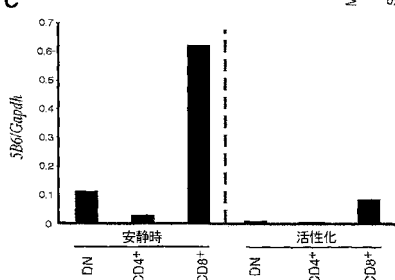
A



**P**



c



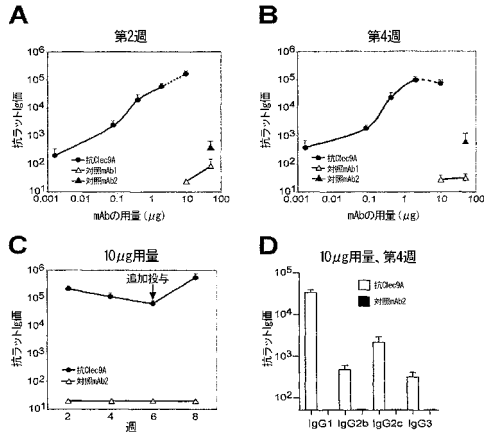
A

A

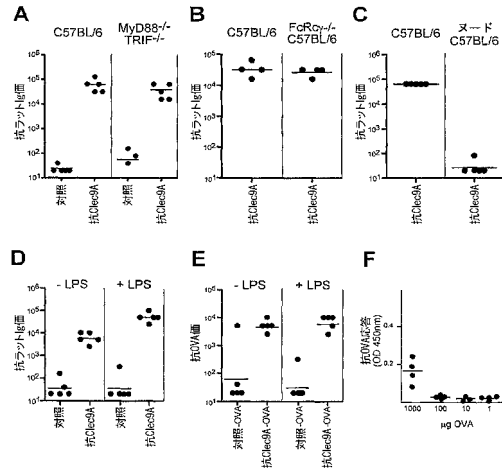
Figure 1 consists of three panels. Panel A is a schematic of the BDCA3 locus on chromosome 12p13, showing exons 1-5 and introns. Panel B is a Northern blot analysis of BDCA3 mRNA expression in various tissues. Panel C is an RT-PCR analysis of BDCA3 mRNA expression in various tissues.



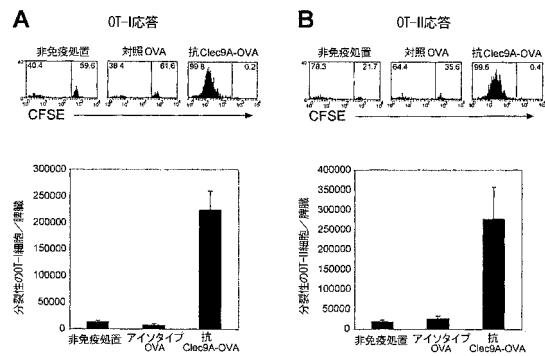
【図 6】



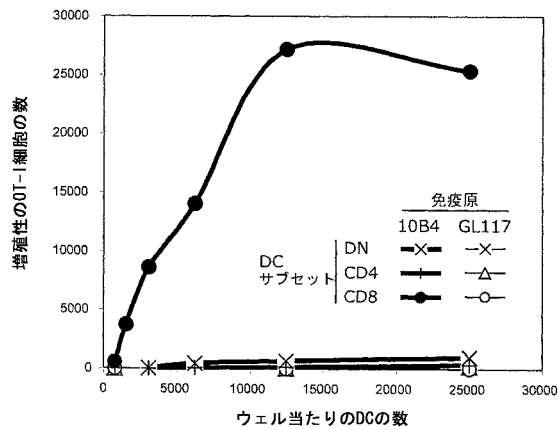
【図 7】



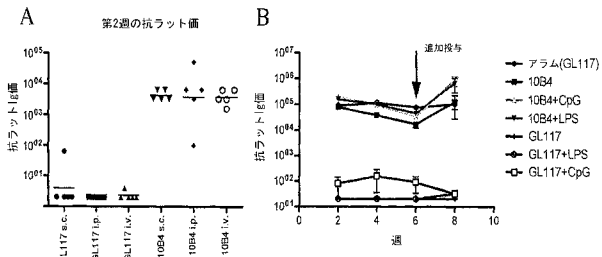
【図 8】



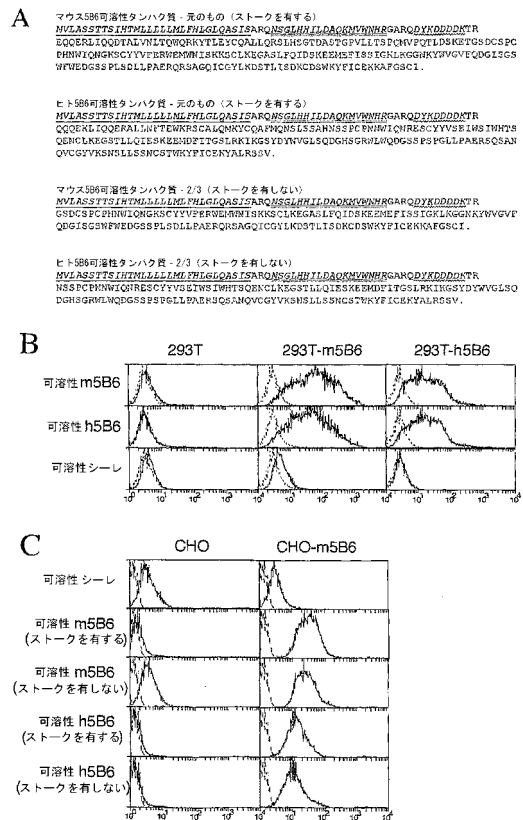
【図 9】



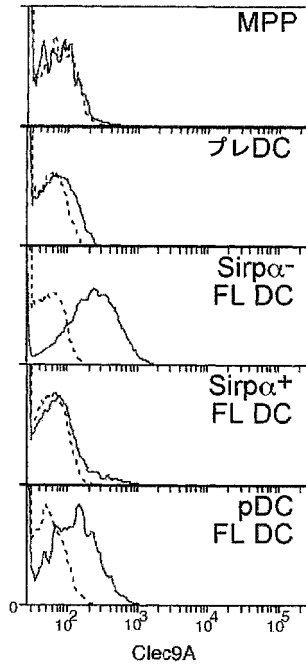
【図 10】



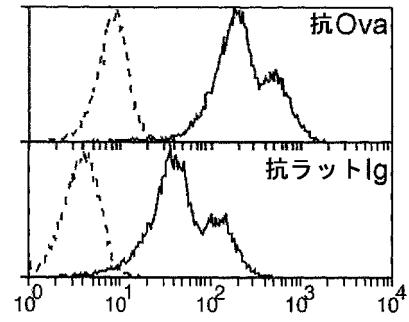
【図 11】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

2010536388000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2008/001294
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C12N 15/09</i> (2006.01) <i>C12N 5/22</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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) GENOME QUEST (SEQ ID NO: 1-8, 9-16, 42-51 and 58-61) MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, BIOTECHABS (dendritic, DC, 5B6, Clec9a, C-type lectin-like molecule, C-type lectin-like receptor, C-type lectin domain) EPODOC, WPI, TXTEN (Dendritic, DC, 5B6, Clec9a, C-type lectin)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0042386 A1 (ROSEN et al) 11 April 2002 See whole document especially SEQ ID NO: 42 and 307; Claims 13 and 14; Paragraphs [0192], [0281], [0282], [0350], [0531] and [0962]	1-5, 13, 15-21, 22, 24, 27-36, 39, 42-45, 49, 51, 52, 54-58, 61, 63-78, 82-89, 93, 95, 105-108
X	WO 2003/054152 A2 (HYSEQ, INC.) 3 July 2003 See whole document especially SEQ ID NO: 38 and 950; Claim 12; Page 14, lines 21-29; Page 45, lines 32-33	1-5, 13, 22, 55-58, 61, 63-66, 75-78, 82-84, 88, 89, 93, 95, 105-108
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 November 2008		Date of mailing of the international search report 10 NOV 2008
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer DAMIAN TRIFFETT AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2845

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/AU2008/001294

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
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. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

*(See Supplemental Box)*

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/AU2008/001294

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/025130 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 27 March 2003 See whole document especially SEQ ID NO:21; Claims 7, 8 and 11	1-5, 13, 22, 55-58, 61, 63- 66, 75-84, 89, 93, 95, 105- 107
X	WO 2003/091435 A1 (RIKEN et al) 6 November 2003 See whole document especially SEQ ID NO: 10, 46 and 47	22, 55-58, 61, 63-66, 75-78, 82-84, 95, 105-107
X	GenPept Accession No. NP_997228 20 April 2004 C-type lectin domain family 9, member A from Homo sapiens which is 100% identical to SEQ ID NO:1	1-5, 13, 22, 55-58, 61, 63- 78, 82-84, 89, 93, 95, 105- 107
X	GenPept Accession No. AAH87955 22 December 2004 Clec9a protein from Mus musculus which is 100% identical to SEQ ID NO:2 and 73.58% identical to SEQ ID NO:8	1-5, 13, 22, 55-58, 61, 63- 78, 82-84, 89, 93, 95, 105- 107
X	GenPept Accession No. XP_001114857 14 June 2006 C-type lectin domain family 9, member A polypeptide from Macaca mulatta which is 100% identical to SEQ ID NO:4	1-5, 13, 22, 55-58, 61, 63- 78, 82-84, 89, 93, 95, 105- 107
X	GenPept Accession No. XP_854151 30 August 2005 C-type lectin domain family 9, member A from Canis familiaris which is 100% identical to SEQ ID NO:5	1-5, 13, 22, 55-58, 61, 63- 78, 82-84, 89, 93, 95, 105- 107
X	GenPept Accession No. XP_873119 1 October 2005 C-type lectin domain family 9, member A from Bos taurus which is 100% identical to SEQ ID NO:6	1-5, 13, 22, 55-58, 61, 63- 78, 82-84, 89, 93, 95, 105- 107

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/AU2008/001294

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenPept Accession No. XP_001493987 25 June 2007 C-type lectin domain family 9, member A from Equus caballus which is 100% identical to SEQ ID NO:7	1-5, 13, 22, 55-58, 61, 63- 78, 82-84, 89, 93, 95, 105- 107
X	GenBank Accession No. BC087955 22 December 2004 Mus musculus C-type lectin domain family 9, member A which is 99.87% identical to SEQ ID NO:10 and 82.46% identical to SEQ ID NO:16	1-5, 13, 22, 63-78, 82-84, 89, 93, 95, 105-107
X	GenBank Accession No. XM_001143778 15 September 2006 Pan troglodytes C-type lectin domain family 9, member A (CLEC9A) which is 100% identical to SEQ ID NO:11	1-5, 13, 22, 63-78, 82-84, 89, 93, 95, 105-107
X	GenBank Accession No. XM_001114857 14 June 2006 Macaca mulatta similar to C-type lectin domain family 9, member A which is 100% identical to SEQ ID NO:12	1-5, 13, 22, 63-78, 82-84, 89, 93, 95, 105-107
X	GenBank Accession No. XM_849058 30 August 2005 Canis familiaris similar to C-type lectin domain family 9, member A which is 100% identical to SEQ ID NO:13	1-5, 13, 22, 63-78, 82-84, 89, 93, 95, 105-107
X	GenBank Accession No. XM_868026 1 October 2005 C-type lectin domain family 9, member A (CLEC9A) which is 100% identical to SEQ ID NO:14	1-5, 13, 22, 63-78, 82-84, 89, 93, 95, 105-107
X	GenBank Accession No. XM_001493937 25 June 2007 Equus caballus similar to C-type lectin domain family 9, member A which is 100% identical to SEQ ID NO:15	1-5, 13, 22, 63-78, 82-84, 89, 93, 95, 105-107

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2008/001294
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6491918 B1 (THOMAS et al.) 10 December 2002 See whole document especially Claim 1	85-87
A	EP 1516881 (KATHOLIEKE UNIVERSITEIT NIJMEGEN) 23 March 2005 See whole document especially Abstract	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/AU2008/001294

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of Boxes I to IV is not sufficient)

**Continuation of Box No: III**

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

In assessing whether there is more than one invention claimed, I have given consideration to those features which can be considered to potentially distinguish the claimed combination of features from the prior art. Where different claims have different distinguishing features they define different inventions.

This International Searching Authority has found that there are 8 different inventions as follows:

- Invention 1 (Claims 1-108(partially)). It is considered that a human 5B6 C-type lectin-like molecule (SEQ ID NO:1) and the nucleic acid encoding it (SEQ ID NO:9) comprises a first distinguishing feature.
- Invention 2 (Claims 1-108(partially)). It is considered that a murine 5B6 C-type lectin-like molecule (SEQ ID NO:2) and the nucleic acid encoding it (SEQ ID NO:10) comprises a second distinguishing feature.
- Invention 3 (Claims 1-108(partially)). It is considered that a chimpanzee 5B6 C-type lectin-like molecule (SEQ ID NO:3) and the nucleic acid encoding it (SEQ ID NO:11) comprises a third distinguishing feature.
- Invention 4 (Claims 1-108(partially)). It is considered that a rhesus monkey 5B6 C-type lectin-like molecule (SEQ ID NO:4) and the nucleic acid encoding it (SEQ ID NO:12) comprises a fourth distinguishing feature.
- Invention 5 (Claims 1-108(partially)). It is considered that a dog 5B6 C-type lectin-like molecule (SEQ ID NO:5) and the nucleic acid encoding it (SEQ ID NO:13) comprises a fifth distinguishing feature.
- Invention 6 (Claims 1-108(partially)). It is considered that a cow 5B6 C-type lectin-like molecule (SEQ ID NO:6) and the nucleic acid encoding it (SEQ ID NO:14) comprises a sixth distinguishing feature.
- Invention 7 (Claims 1-108(partially)). It is considered that a horse 5B6 C-type lectin-like molecule (SEQ ID NO:7) and the nucleic acid encoding it (SEQ ID NO:15) comprises a seventh distinguishing feature.
- Invention 8 (Claims 1-108(partially)). It is considered that a rat 5B6 C-type lectin-like molecule (SEQ ID NO:8) and the nucleic acid encoding it (SEQ ID NO:16) comprises an eighth distinguishing feature.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

The only feature common to all of the claims is a 5B6 C-type lectin like molecule and the nucleic acid encoding it.

However this concept is not novel in light of:

US 2002/0042386 A1 (ROSEN et al) 11 April 2002  
WO 2003/054152 A2 (HYSEQ, INC.) 3 July 2003  
WO 2003/025130 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 27 March 2003  
WO 2003/091435 A1 (RIKEN et al) 6 November 2003  
GenPept Accession No. NP\_997228 20 April 2004

(Continued in Supplemental Box I)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2008/001294

**Supplemental Box 1**

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

**Continuation of : Supplemental Box**

GenPept Accession No. AAH87955 22 December 2004

GenPept Accession No. XP\_001114857 14 June 2006

GenPept Accession No. XP\_854151 30 August 2005

GenPept Accession No. XP\_873119 1 October 2005

GenPept Accession No. XP\_001493987 25 June 2007

US 2003/0059875 A1 (ROSEN et al) 27 March 2003

GenBank Accession No. BC087955 22 December 2004

GenBank Accession No. XM\_001134778 No record

GenBank Accession No. XM\_001114857 14 June 2006

GenBank Accession No. XM\_849058 30 August 2005

GenBank Accession No. XM\_868026 1 October 2005

GenBank Accession No. XM\_001493937 25 June 2007

This means that the common feature can not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, since it makes no contribution over the prior art.

Because the common feature does not satisfy the requirement for being a special technical feature it follows that it cannot provide the necessary technical relationship between the identified inventions. Therefore the claims do not satisfy the requirement of unity of invention *a posteriori*.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2008/001294

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
US	2002/0042386	AU	29508/01	AU	30958/01
		AU	36460/01	AU	36461/01
		AU	36463/01	AU	36464/01
		AU	36466/01	AU	37943/01
		AU	37946/01	AU	37947/01
		AU	37949/01	AU	37950/01
		AU	37952/01	AU	37953/01
		AU	37955/01	AU	37957/01
		AU	38585/01	AU	39726/01
		AU	39728/01	AU	41402/01
		AU	41404/01	AU	41405/01
		AU	41407/01	AU	41408/01
		AU	41410/01	AU	41411/01
		AU	41413/01	AU	41414/01
		AU	41416/01	AU	41417/01
		AU	41419/01	AU	43134/01
		AU	43136/01	AU	43137/01
		AU	45354/01	AU	47190/01
		AU	49052/01	AU	49053/01
		AU	50767/01	AU	50768/01
		AU	50770/01	AU	50771/01
		AU	52878/01	AU	52879/01
		AU	53323/01	AU	55162/01
		AU	60969/01	AU	62899/01
		AU	71714/01	AU	74888/01
		AU	96301/01	AU	2001236466
		CA	2392398	CA	2392422
		CA	2392438	CA	2392450
		CA	2392757	CA	2393002
		CA	2393618	CA	2393652
		CA	2393941	CA	2393954
		CA	2394039	CA	2394841
				AU	36459/01
				AU	36462/01
				AU	36465/01
				AU	37944/01
				AU	37948/01
				AU	37951/01
				AU	37954/01
				AU	37958/01
				AU	39727/01
				AU	41403/01
				AU	41406/01
				AU	41409/01
				AU	41412/01
				AU	41415/01
				AU	41418/01
				AU	43135/01
				AU	45262/01
				AU	47191/01
				AU	49054/01
				AU	50769/01
				AU	50772/01
				AU	52917/01
				AU	57912/01
				AU	66787/01
				AU	94678/01
				AU	2001241414
				CA	2392428
				CA	2392751
				CA	2393616
				CA	2393912
				CA	2394022
				CA	2395178

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2008/001294

CA	2395295	CA	2395398	CA	2395403
CA	2395654	CA	2395666	CA	2395671
CA	2395676	CA	2395693	CA	2395699
CA	2395724	CA	2395729	CA	2395734
CA	2395738	CA	2395787	CA	2395794
CA	2395811	CA	2395815	CA	2395816
CA	2395827	CA	2395838	CA	2395849
CA	2395857	CA	2395858	CA	2395872
CA	2395885	CA	2395889	CA	2396719
CA	2397407	CA	2397502	CA	2397839
CA	2398227	CA	2398275	CA	2398411
CA	2398877	CA	2400638	CA	2403508
CA	2406649	CA	2433469	CA	2433474
EP	1251863	EP	1252176	EP	1252185
EP	1252289	EP	1252290	EP	1252297
EP	1252302	EP	1252303	EP	1252312
EP	1252326	EP	1252337	EP	1254147
EP	1254148	EP	1254150	EP	1254151
EP	1254152	EP	1254153	EP	1254154
EP	1254157	EP	1254165	EP	1254170
EP	1254171	EP	1254172	EP	1254173
EP	1254217	EP	1254218	EP	1254219
EP	1254228	EP	1254242	EP	1254248
EP	1254272	EP	1255766	EP	1255767
EP	1255768	EP	1255776	EP	1255777
EP	1255778	EP	1255817	EP	1255864
EP	1255869	EP	1259525	EP	1259526
EP	1259528	EP	1259531	EP	1259540
EP	1259642	EP	1261380	EP	1261618
EP	1261619	EP	1261633	EP	1261634
EP	1261635	EP	1261637	EP	1261703
EP	1261742	EP	1261745	EP	1263944
EP	1265910	EP	1268527	EP	1268541
EP	1287015	EP	1301524	EP	1368468
EP	1370651	US	6566325	US	6627741
US	6924356	US	6951924	US	6953667
US	7026447	US	7053190	US	7091315

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International application No.		
Information on patent family members			PCT/AU2008/001294		
US	7105644	US	7163797	US	7196164
US	7247442	US	7368531	US	7411051
US	2002026040	US	2002042096	US	2002045230
US	2002061521	US	2002077270	US	2002077287
US	2002086330	US	2002086353	US	2002086811
US	2002086820	US	2002086821	US	2002086822
US	2002086823	US	2002090615	US	2002090672
US	2002090673	US	2002090674	US	2002094953
US	2002102638	US	2002106780	US	2002119919
US	2002120103	US	2002132753	US	2002132767
US	2002147140	US	2002151009	US	2002151479
US	2002160493	US	2002161208	US	2002164669
US	2002164685	US	2002165137	US	2002165374
US	2002168711	US	2002173454	US	2002183503
US	2003013649	US	2003017500	US	2003018180
US	2003022185	US	2003028003	US	2003036505
US	2003039993	US	2003039994	US	2003040088
US	2003044851	US	2003044890	US	2003044904
US	2003044905	US	2003044907	US	2003049650
US	2003049652	US	2003049703	US	2003050231
US	2003050442	US	2003050460	US	2003050461
US	2003054368	US	2003054373	US	2003054375
US	2003054377	US	2003054379	US	2003054420
US	2003054443	US	2003059875	US	2003059908
US	2003068627	US	2003077602	US	2003077606
US	2003077703	US	2003077704	US	2003077808
US	2003078405	US	2003082681	US	2003082758
US	2003087341	US	2003092102	US	2003092611
US	2003092615	US	2003096346	US	2003096982
US	2003100051	US	2003104400	US	2003108907
US	2003113840	US	2003125246	US	2003139327
US	2003157508	US	2003171252	US	2003175739
US	2003190707	US	2003199008	US	2003207285
US	2003208058	US	2003215893	US	2003219758
US	2003224461	US	2003225009	US	2003232975
US	2003235829	US	2003235831	US	2004002066
US	2004002591	US	2004005575	US	2004005577

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2008/001294

US	2004005579	US	2004009488	US	2004009491
US	2004010132	US	2004014039	US	2004018969
US	2004023283	US	2004038277	US	2004044191
US	2004101927	US	2004152164	US	2004181047
US	2004225118	US	2004241803	US	2004253684
US	2005009085	US	2005010042	US	2005032168
US	2005042667	US	2005079537	US	2005153335
US	2005181371	US	2005197285	US	2005208621
US	2005208622	US	2005239059	US	2005239099
US	2005244845	US	2006036089	US	2006057582
US	2006084082	US	2006099575	US	2006160126
US	2006223088	US	2006223090	US	2006246483
US	2006281095	US	2007014787	US	2007015696
US	2007015908	US	2007020724	US	2007037206
US	2007041963	US	2007055056	US	2007154910
US	2007154918	US	2007172830	US	2007190612
US	2007203070	US	2007224663	US	2008020969
US	2008103090	US	2008146505	WO	0154472
WO	0154473	WO	0154474	WO	0154708
WO	0154733	WO	0155162	WO	0155163
WO	0155164	WO	0155167	WO	0155168
WO	0155173	WO	0155200	WO	0155201
WO	0155202	WO	0155203	WO	0155204
WO	0155205	WO	0155206	WO	0155207
WO	0155208	WO	0155300	WO	0155301
WO	0155302	WO	0155303	WO	0155304
WO	0155305	WO	0155306	WO	0155307
WO	0155308	WO	0155309	WO	0155310
WO	0155311	WO	0155312	WO	0155313
WO	0155314	WO	0155315	WO	0155316
WO	0155317	WO	0155318	WO	0155319
WO	0155320	WO	0155321	WO	0155322
WO	0155323	WO	0155324	WO	0155325
WO	0155326	WO	0155327	WO	0155328
WO	0155329	WO	0155343	WO	0155350
WO	0155355	WO	0155364	WO	0155367
WO	0155368	WO	0155387	WO	0155388

International application No.

### Information on patent family members

**PCT/AU2008/001294**

WO	0155430	WO	0155440	WO	0155441
WO	0155447	WO	0155448	WO	0155449
WO	0157182	WO	0159063	WO	0159064
WO	0162789	WO	0164703	WO	0170804
WO	0179253	WO	0190304	WO	0200677
WO	0202587	WO	0226930		
WO	2003/054152	AU	22924/01	AU	25936/01
		AU	25955/01	AU	25983/01
		AU	27284/01	AU	27348/01
		AU	27385/01	AU	31178/01
		AU	31288/01	AU	32967/01
		AU	32969/01	AU	32989/01
		AU	33003/01	AU	33041/01
		AU	33047/01	AU	34582/01
		AU	34847/01	AU	34865/01
		AU	34944/01	AU	36658/01
		AU	36660/01	AU	36721/01
		AU	38347/01	AU	41511/01
		AU	41873/01	AU	45280/01
		AU	45491/01	AU	49728/01
		AU	50872/01	AU	52926/01
		AU	53620/01	AU	55454/01
		AU	59041/01	AU	63006/01
		AU	64724/01	AU	77840/01
		AU	96235/01	AU	2001263005
		AU	2002250419	AU	2002332767
		AU	2002360460	AU	2002368010
		AU	2003213064	AU	2003259696
		AU	2003295649	AU	2003298604
		AU	2003302733	AU	2007234602
		CA	2395443	CA	2395736
		CA	2395749	CA	2395770
		CA	2398215	CA	2398396
		CA	2398546	CA	2398554
		CA	2399644	CA	2399652
		CA	2399672	CA	2399686
		CA	2399776	CA	2402293

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2008/001294

CA	2402563	CA	2404501	CA	2404555
CA	2405104	CA	2406039	CA	2406121
CA	2409164	CA	2425827	CA	2429343
CA	2440257	CA	2441006	CA	2442077
CA	2453344	CA	2458818	CA	2460425
CA	2469941	CA	2476555	CA	2506356
CA	2507156	CA	2522421	EP	1240178
EP	1242443	EP	1242580	EP	1242596
EP	1248848	EP	1250346	EP	1252333
EP	1254246	EP	1254256	EP	1254265
EP	1254266	EP	1254268	EP	1254269
EP	1254270	EP	1261735	EP	1261736
EP	1261743	EP	1268510	EP	1268543
EP	1268762	EP	1274716	EP	1276751
EP	1276754	EP	1276902	EP	1282635
EP	1285084	EP	1325120	EP	1341804
EP	1345965	EP	1365801	EP	1381621
EP	1409715	EP	1427747	EP	1430146
EP	1432800	EP	1483407	EP	1492557
EP	1504099	EP	1567863	EP	1572235
EP	1572987	EP	1574520	EP	1578989
EP	1591448	EP	1628991	EP	1661986
EP	1683809	MX	PA02006193	US	6436703
US	6465620	US	6569662	US	6586390
US	6610536	US	6635742	US	6667391
US	6673904	US	6783969	US	6806254
US	6818754	US	6824973	US	7029677
US	7067301	US	7109030	US	7317099
US	7319141	US	7378253	US	7411052
US	7425610	US	2002009786	US	2002061567
US	2002127199	US	2002128187	US	2002137044
US	2002142302	US	2002142953	US	2002146692
US	2002146757	US	2002150898	US	2002197679
US	2003022329	US	2003022825	US	2003032034
US	2003044792	US	2003073099	US	2003087370
US	2003092112	US	2003096279	US	2003100746
US	2003104413	US	2003104529	US	2003113847

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International application No.		
Information on patent family members.			PCT/AU2008/001294		
US	2003124573	US	2003138804	US	2003144491
US	2003152941	US	2003158400	US	2003165881
US	2003165921	US	2003166152	US	2003170818
US	2003180722	US	2003180745	US	2003211987
US	2003215453	US	2003219743	US	2003219744
US	2003224379	US	2003228584	US	2003232054
US	2003235883	US	2004005317	US	2004005592
US	2004013657	US	2004022786	US	2004023870
US	2004034208	US	2004048249	US	2004048817
US	2004053245	US	2004053248	US	2004053250
US	2004068097	US	2004072173	US	2004106116
US	2004110940	US	2004116683	US	2004121948
US	2004122220	US	2004132022	US	2004137434
US	2004152884	US	2004162419	US	2004219521
US	2004220383	US	2004236090	US	2004248156
US	2005027114	US	2005059073	US	2005095237
US	2005153334	US	2005164202	US	2005170374
US	2005175607	US	2005175994	US	2005192215
US	2005196754	US	2005202422	US	2005208488
US	2005208498	US	2005221342	US	2005226812
US	2005239060	US	2005266423	US	2005281813
US	2006052591	US	2006073514	US	2006074044
US	2006104977	US	2006149049	US	2006258567
US	2006263803	US	2007042392	US	2007049743
US	2007060743	US	2007264261	US	2008050393
US	2008051565	US	2008076715	US	2008213839
US	2008227712	US	2008241207	US	2008241882
WO	0152616	WO	0153312	WO	0153326
WO	0153453	WO	0153454	WO	0153455
WO	0153456	WO	0153466	WO	0153485
WO	0153500	WO	0153515	WO	0154477
WO	0155332	WO	0155333	WO	0155334
WO	0155335	WO	0155336	WO	0155337
WO	0155339	WO	0155435	WO	0155437
WO	0155442	WO	0157175	WO	0157187
WO	0157188	WO	0157190	WO	0157233
WO	0157255	WO	0157260	WO	0157261



INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No.	
Information on patent family members				PCT/AU2008/001294	
	WO	0157262		WO	0157265
	WO	0157267		WO	0164834
	WO	0164839		WO	0164840
	WO	0166689		WO	0174836
	WO	0175067		WO	0175093
	WO	0179254		WO	0179446
	WO	0179449		WO	0187917
	WO	0188091		WO	0188092
	WO	0231111		WO	02051868
	WO	02066600		WO	02070539
	WO	02077180		WO	03023013
	WO	03048326		WO	03068935
	WO	2004009834		WO	2004015078
	WO	2004047758		WO	2004053061
	WO	2005060375		WO	2005069854
WO 2003/025130	AU	2002248723	AU	2002255733	AU 2002257088
	AU	2002258520	AU	2002258657	AU 2002303843
	AU	2002320026	AU	2002324915	AU 2002326910
	AU	2002327419	AU	2002327533	AU 2002330157
	AU	2002336529	AU	2002342010	AU 2002343515
	AU	2002343516	AU	2002347778	AU 2002352912
	AU	2002354803	AU	2002357850	AU 2002357860
	AU	2002358273	AU	2002359242	AU 2002359567
	AU	2002360513	AU	2002362586	AU 2002364699
	AU	2002364890	AU	2002366606	AU 2003205353
	AU	2003211112	AU	2003212475	AU 2003215369
	AU	2003218238	AU	2003218321	AU 2003220607
	AU	2003222189	AU	2003222225	AU 2003224811
	AU	2003225282	AU	2003228869	AU 2003230760
	AU	2003231245	AU	2003231531	AU 2003238930
	AU	2003239871	CA	2434944	CA 2437398
	CA	2437571	CA	2438235	CA 2439941
	CA	2440272	CA	2440618	CA 2442062
	CA	2443334	CA	2443713	CA 2443897
	CA	2444675	CA	2445338	CA 2445366
	CA	2446023	CA	2447338	CA 2447340
	CA	2447647	CA	2448116	CA 2448146

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2008/001294

CA	2452082	CA	2452501	CA	2453985
CA	2456369	CA	2458445	CA	2458625
CA	2458645	CA	2458648	CA	2459022
CA	2459137	CA	2459140	CA	2459323
CA	2459442	CA	2460476	CA	2460480
CA	2460625	CA	2460808	CA	2460812
CA	2460953	CA	2460959	CA	2462795
EP	1355935	EP	1368472	EP	1368473
EP	1383789	EP	1383798	EP	1385977
EP	1390396	EP	1390410	EP	1409550
EP	1409655	EP	1417224	EP	1421111
EP	1423415	EP	1423697	EP	1429806
EP	1432801	EP	1434785	EP	1434788
EP	1434796	EP	1434860	EP	1436383
EP	1444254	EP	1451212	EP	1456365
EP	1456655	EP	1461446	EP	1478745
EP	1480994	EP	1481081	EP	1485474
EP	1487989	EP	1497319	EP	1506303
EP	1506304	EP	1519741	EP	1521822
EP	1521824	EP	1537138	EP	1572875
EP	1578899	EP	1578902	US	7348139
US	7378492	US	2003198975	US	2004063924
US	2004087773	US	2004097711	US	2004101882
US	2004101884	US	2004106125	US	2004115687
US	2004132043	US	2004152157	US	2004152877
US	2004158039	US	2004166501	US	2004171009
US	2004198651	US	2004203014	US	2004203097
US	2004248249	US	2004248251	US	2004249128
US	2004254350	US	2005019763	US	2005033018
US	2005048490	US	2005064543	US	2005069876
US	2005107293	US	2005107588	US	2005118594
US	2005130145	US	2005176944	US	2005191627
US	2006051836	US	2006121459	US	2006127894
US	2006194275	US	2007225218	US	2008076117
US	2008213782	WO	02062841	WO	02063006
WO	02066646	WO	02070669	WO	02070709
WO	02072794	WO	02074913	WO	02078420

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No.	
Information on patent family members				PCT/AU2008/001294	
	WO 02079441	WO 02081636	WO 02083705		
	WO 02083712	WO 02086069	WO 02088316		
	WO 02088322	WO 02092759	WO 02094780		
	WO 02094988	WO 02094990	WO 02096951		
	WO 02097032	WO 02097035	WO 03002610		
	WO 03004615	WO 03012065	WO 03014322		
	WO 03016493	WO 03016497	WO 03016506		
	WO 03018612	WO 03023003	WO 03023009		
	WO 03025129	WO 03025131	WO 03025150		
	WO 03025542	WO 03027228	WO 03027263		
	WO 03029437	WO 03031568	WO 03031595		
	WO 03031939	WO 03031940	WO 03042357		
	WO 03046152	WO 03046196	WO 03048305		
	WO 03050084	WO 03050253	WO 03051902		
	WO 03052049	WO 03052075	WO 03054219		
	WO 03062391	WO 03063688	WO 03068943		
	WO 03070902	WO 03072723	WO 03074726		
	WO 03077875	WO 03080805	WO 03083081		
	WO 03083082	WO 03083085	WO 03087300		
	WO 03091419	WO 03093427	WO 03093439		
	WO 03093444	WO 03100016	WO 03104410		
WO 2003/091435	AU 2003235099	JP 2004041178	JP 2004229644		
	JP 2004229648	JP 2004229651			
US 6491918	CA 2178984	CA 2191655	US 5877299		
	US 6117985	US 6306575	US 6482926		
	US 2003147886				
EP 1516881	AU 41526/00	CA 2330231	EP 1046651		
	EP 1086137	KR 20070094990	NZ 508723		
	US 7148329	US 7285642	US 2005118168		
	US 2005220804	US 2008160041	WO 0063251		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 6
A 0 1 H 5/00 (2006.01)	A 0 1 H 5/00 A	4 H 0 4 5
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 N 5/0784 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 M	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	
G 0 1 N 33/532 (2006.01)	G 0 1 N 33/532 A	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 Q	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y	
G 0 1 N 33/564 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/564 Z	
G 0 1 N 33/563 (2006.01)	G 0 1 N 33/569 A	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/563	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
	G 0 1 N 33/48 Z	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,T,R),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,K,G,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100160923  
弁理士 山口 裕孝  
(74)代理人 100119507  
弁理士 刑部 俊  
(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一  
(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ラフード ミレイユ ハンナ  
オーストラリア国 ビクトリア州 イースト メルボルン ビクトリア パレード 44 / 400
- (72)発明者 プロイエット アンナ イレーネ  
オーストラリア国 ビクトリア州 グリーン ドイル ストリート 6
- (72)発明者 カミンスキ イリーナ  
オーストラリア国 ビクトリア州 アスコット ベイル ムンロ ストリート 35
- (72)発明者 ショートマン ケン  
オーストラリア国 ビクトリア州 プリンセス ヒル ウィルソン ストリート 92
- (72)発明者 ルー アンドリュー マーク  
オーストラリア国 ビクトリア州 エッセンドン ウォーナー ストリート 13
- (72)発明者 ウー リ  
オーストラリア国 ビクトリア州 アスコット ベイル ケント ストリート 10 / 7 - 13
- (72)発明者 ライト マーク デクスター  
オーストラリア国 ビクトリア州 ノースコート ウォータールー ロード 13

F ターム(参考) 2B030 AA02 AA03 AB04 AD08 CA14 CB03

2G045 AA01 AA13 AA16 AA24 AA25 AA26 AA28 AA29 AA31 BB03

BB10 BB13 BB20 BB24 CA11 CA17 CA18 CA19 CA20 CA25

CA26 CB01 CB02 CB03 CB07 CB09 CB13 CB17 CB20 CB21

CB26 DA13 DA14 DA36 DA37 DA77 DA78 FA12 FA16 FA20

FA27 FA36 FA37 FB01 FB02 FB03 FB07 FB09 FB12 GA01

GC12 GC15 JA01

4B024 AA01 AA08 AA11 AA20 BA31 BA44 CA01 CA12 DA01 DA02

DA05 DA11 GA11 HA01 HA12 HA15

4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ53 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR42 QR48

QR55 QR62 QS15 QS25 QS33 QS34 QX02

4B065 AA89X AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25

CA44 CA45 CA46 CA53 CA60

4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 NA14 ZB05 ZB07

ZB08 ZB13 ZB26 ZB35 ZB38

4C085 AA03 AA14 AA21 AA25 AA38 BB11 CC23 CC31 CC32

4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZB05 ZB07 ZB08 ZB13 ZB26 ZB32

ZB35 ZB38

4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA72 FA74