

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6629497号
(P6629497)

(45) 発行日 令和2年1月15日(2020.1.15)

(24) 登録日 令和1年12月13日(2019.12.13)

(51) Int.Cl.		F 1	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K 14/54
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53
P			
請求項の数 17 (全 24 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2013-553044 (P2013-553044)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月10日 (2012.2.10)
 (65) 公表番号 特表2014-510517 (P2014-510517A)
 (43) 公表日 平成26年5月1日 (2014.5.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/000259
 (87) 国際公開番号 W02012/110878
 (87) 国際公開日 平成24年8月23日 (2012.8.23)
 審査請求日 平成27年2月10日 (2015.2.10)
 審判番号 不服2017-4516 (P2017-4516/J1)
 審判請求日 平成29年3月31日 (2017.3.31)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0012983
 (32) 優先日 平成23年2月14日 (2011.2.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(73) 特許権者 513205259
 エヌケーマックス カンパニー リミテッド
 NKMAX CO., Ltd.
 大韓民国 13605 キョンギード ソンナムーシ、ブンダンーグ、ドルマーロ 172、エヌエヌユーエイチ エイチアイピー 6エフ
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 イ, ジェ ミョン
 大韓民国 140-744 ソウル、ヨンサンーグ、イチョン 1ードン、コロニアアパート、104-1902

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんを診断する方法およびNK細胞活性の測定を使用した診断キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ナチュラルキラー (NK) 細胞活性を測定する方法であって、
 全血試料を、インターロイキン 2 を含む刺激性サイトカインを含む作用物質と共にインキュベートすることによって、全血試料中のNK細胞を刺激し、それによって人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成および分泌させること、および、
 全血試料中へ分泌されたNK細胞分泌サイトカインの量を測定すること、およびNK細胞活性を示すその量を使用すること、
 を含み、

ここでNK細胞分泌サイトカインが、インターフェロン - ガンマ (IFN -) を含む、前記方法。

【請求項 2】

NK細胞の刺激が、全血試料を、インターロイキン 2 と共にインキュベートすることによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

NK細胞の刺激が、全血試料を、インターロイキン 2 およびインターロイキン 1 2 と共にインキュベートすることによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

NK細胞の刺激が、全血試料を、インターロイキン 2 およびインターロイキン 1 8 と共にインキュベートすることによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

NK細胞の刺激が、全血試料を、インターロイキン2およびインターロイキン15と共にインキュベートすることによって行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

NK細胞分泌サイトカインがインターフェロン-ガンマ(IFN-)である、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

マクロファージ炎症性タンパク質-1(MIP-1)が、NK細胞の活性化を正常者のものと比較するための対照群として使用される、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

NK細胞分泌サイトカインの量の測定が、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)または他の免疫学的分析によって行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも1つの刺激性サイトカインが、安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態であり、

安定化ペプチドが、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドであり、

安定化ペプチドが、-シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基103~115(配列番号22)、アミノ酸残基114~126(配列番号23)、アミノ酸残基119~140(配列番号24)またはアミノ酸残基130~140(配列番号25)、-シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基85~134(配列番号27)、-シヌクレインのアミノ酸残基1~127(配列番号28)または-シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96~127(配列番号29)を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

全血試料中のNK細胞を刺激し、それによって人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成および分泌させるステップが、担体タンパク質を含有する溶液において行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

作用物質が、インターロイキン2を含み、方法が、がんの罹患または再発を検出するためのものであり、ここで対象におけるNK細胞分泌サイトカインの量の、正常個体におけるレベルと比較した低減が、がんの罹患または再発の指標である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

少なくとも1つの刺激性サイトカインが、安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態であり、ここで融合タンパク質が、配列番号2のアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

NK細胞の刺激が、全血試料をインターロイキン2と共に、または安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態のインターロイキン2と共にインキュベートすることによって行われる、請求項1または6に記載の方法。

【請求項 14】

NK細胞の刺激が、全血試料を、インターロイキン2または安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態のインターロイキン2と、インターロイキン15または安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態のインターロイキン15と共にインキュベートすることによって行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

NK細胞の刺激が、全血試料を、インターロイキン2または安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態のインターロイキン2と、インターロイキン18または安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態のインターロイキン18と共にインキュベートすることによって

10

20

30

40

50

行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

NK細胞活性を測定することが、全血試料中へ分泌されたNK細胞分泌サイトカインの測定量を、正常者からのものと比較することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法を使用して、がんの罹患または再発の診断を補助する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は2011年2月14日に出願された韓国特許出願第2011-0012983号に対する優先権および同出願の利益を主張するものであり、当該出願の開示はその全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

1. 発明の技術分野

本発明はがんを診断するための方法および、NK細胞活性の測定を利用する診断キットに関する。

【0003】

2. 関連技術の考察

ナチュラルキラー（NK）細胞は、病原体およびがん細胞を排除する自然免疫に関与し、インターフェロン-ガンマ（IFN- γ ）、腫瘍壊死因子-アルファ（TNF- α ）、マクローファージ炎症性タンパク質-1（MIP-1）、および、適応免疫を調節する他の分子を分泌することが知られている。NK細胞が他の細胞に遭遇すると、NK細胞は、がん細胞のようにMHCクラス1が存在しない場合、または、ウイルス感染した細胞のようにMHCクラスの形状が異常な場合に、これらの異常な細胞をそれらの分子作用を通じて攻撃するよう、それらの主要組織適合性複合体（MHCs）が、NK細胞内にシグナルを送る機構を有する。しかしながら、NK細胞は様々な種類のがんにおいて、機能および分化能に障害を有すると報告されていることから、NK細胞活性はがん細胞の生存と密接に関連している。それゆえに、がんの免疫療法のためにNK細胞の数または活性を増大させる広範な研究が行われている。

【0004】

一方、がんを診断する方法は主に、コンピュータ断層撮影法（CT）、磁気共鳴画像法（MRI）またはX線を使用して得られたグラフィック画像から、がんの存在を発見することを含んでいる。しかしながら、これらの検査は通常、患者が痛みや不都合が原因で検査を受ける強い必要性があるときにのみ、そして特定の組織においてのみ行われるため、がんの存在が見落とされる可能性がある。血液検査を使用したがんのリスクを決定する方法は開発されているが、がんを診断する方法としてのその利用は限られている。これは、その方法が、例えば前立腺がん、結腸がん、卵巣がん、膵がんまたは肝がんに対する血液腫瘍マーカーを使用して行われるため、患者が、がんよりもむしろ対応する臓器に病因因子がある場合に、がんが陽性であるように見えることがあるためである。抗体を使用してがんを診断する試みもあるが、そのような試みは特定のタイプのがんに限られている。

【0005】

したがって、様々なタイプのがんを診断するための新しい方法に対する必要性が引き続き存在している。

【発明の概要】

【0006】

そのため、がんの診断および評価に使用できる方法、ならびに、かかる方法において有用なキットおよび試薬を提供することが本発明の目的である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

本発明の一側面として、NK細胞活性を測定する方法であって、該方法が、血液試料中のNK細胞を刺激し、それによって人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させること、および、血液試料中のNK細胞分泌サイトカインの量を測定することを含む方法が提供される。

【 0 0 0 8 】

特定の非限定的な態様において、血液試料は全血試料、末梢血単核球（PBMCS）または、NK細胞であってもよい。

【 0 0 0 9 】

さらなる態様において、NK細胞の刺激は、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15、インターロイキン18またはそれらの組み合わせを含む、少なくとも1つの刺激性サイトカインと共に血液試料をインキュベートすること、または、リポ多糖（LPSs）または、ポリイノシン・ポリシチジン酸（ポリI：C）と共に血液試料をインキュベートすることによって行ってもよい。

10

【 0 0 1 0 】

特定の態様において、NK細胞分泌サイトカインは、インターフェロン - ガンマ（IFN - ）、腫瘍壊死因子 - アルファ（TNF - ）またはマクロファージ炎症性タンパク質 - 1（MIP - 1）を含み得る。

【 0 0 1 1 】

本方法のさらなる非限定的な態様において、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1（MIP - 1）は、NK細胞の活性化を正常者のものと比較するためのコントロール群として使用できる。

20

【 0 0 1 2 】

また、特定の態様において、本方法は、安定化ペプチドと融合した少なくとも1つの刺激性サイトカインを使用して実行してもよい。例えば、限定することを望まないが、安定化ペプチドはシヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドであってもよい。かかる態様において、安定化ペプチドは、シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基103～115（配列番号22）、アミノ酸残基114～126（配列番号23）、アミノ酸残基119～140（配列番号24）またはアミノ酸残基130～140（配列番号25）、シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基85～134（配列番号27）、シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96～127（配列番号29）、または、シノレチン（配列番号29）のC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96～127を含み得る。

30

【 0 0 1 3 】

さらなる態様において、血液試料中のNK細胞を刺激し、それによって人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させるステップは、担体タンパク質、例えば血清アルブミンタンパク質を含有する培地において行われる。

【 0 0 1 4 】

前記方法は、がんの罹患または再発を検出するのに特に有用である。かかる態様において、対象におけるNK細胞分泌サイトカインの量の、正常個体におけるレベルと比較した低減は、がんの罹患または再発の指標である。

40

【 0 0 1 5 】

本発明のさらなる側面として、NK細胞活性を測定するためのキットが提供される。当該キットは、血液試料中のNK細胞を刺激し、それによって人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させるための作用物質を含む。また、当該キットは、がんの罹患または再発を検出するためのものを含む、上記の方法を実行するために有用たり得る。

【 0 0 1 6 】

当該キットのさらなる非限定的な態様において、NK細胞分泌サイトカインはインターフェロン - ガンマ（IFN - ）または、腫瘍壊死因子 - アルファ（TNF - ）であっ

50

てもよい。

【0017】

さらなる態様において、血液試料中のNK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させるための作用物質は、少なくとも1つの刺激性サイトカイン、LPSまたはポリI:Cを含み得、前記少なくとも1つの刺激性サイトカインは、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15、インターロイキン18の1または2以上を含む。

【0018】

記載されたキットは、特定の態様において、以下の1または2以上をも含み得る：抗INF-抗体、抗TNF-抗体および抗MIP-1抗体。いかようにも限定的であることを望まないが、当該キットは、対象におけるNK細胞分泌サイトカインの量を正常個体におけるレベルと比較するための指示をさらに含んでもよく、ここで、対象におけるNK細胞分泌サイトカインのレベルの低減は、がんの罹患または再発の指標である。

10

【0019】

本発明のさらなる側面として、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したサイトカインを含む融合タンパク質が提供され、当該サイトカインは、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18のいずれかである。

【0020】

記載された融合タンパク質の特定の非限定的態様において、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドは、-シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基103~115(配列番号22)、アミノ酸残基114~126(配列番号23)、アミノ酸残基119~140(配列番号24)または、アミノ酸残基130~140(配列番号25)、-シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基85~134(配列番号27)、-シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96~127(配列番号29)、または、シノレチンのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96~127(配列番号29)を含んでもよい。

20

【0021】

上記融合タンパク質を含む組成物もまた提供される。

【0022】

また、上記融合タンパク質または上記組成物のいずれかを含むがん診断キットもまた、ここで提供される。

30

【0023】

上記がん診断キットは、特定の非限定的な態様において、以下のうちの少なくとも1つの抗体をも含み得る：抗INF-抗体、抗TNF-抗体および抗MIP-1抗体。

【0024】

配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8または、配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドもまたここで提供される。限定的であることは望まないが、ポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8および、配列番号10の配列と、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を含む、より高いパーセントの同一性を有してもよい。

40

【0025】

上記融合タンパク質およびポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチドもまた提供される。例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7または配列番号9の核酸配列、または、それらの相補鎖と少なくとも80%の同一性を有する核酸配列を含むオリゴヌクレオチドが提供される。かかるオリゴヌクレオチドは、限定なしに、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7または配列番号9の配列または、それらの相補配列と、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、9

50

0%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を含む、より高いパーセントの同一性を有してもよい。

【0026】

上記のオリゴヌクレオチドを含むベクターもまた提供され、かかるベクターまたはオリゴヌクレオチドを含む宿主細胞も同様に提供される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

本発明の上記および他の目的、特徴および利点は、それらの例示的な態様を、図面を参照して詳細に記載することにより、当業者にとってより明らかになる。

【0028】

【図1】図1は、hIL2、hIL12、hIL15およびhIL18を含むサイトカインのN末端またはC末端のいずれかに融合されたSPペプチドの融合産物を示した概略図である。

【0029】

【図2】図2は、精製されたSP融合タンパク質の電気泳動結果を示した写真図である。

【0030】

【図3】図3は、正常者における人為的に活性化されたNK細胞活性を、単一のサイトカイン(図3A)または組み合わせられたサイトカイン(図3B~3D)によってNK細胞が刺激されたときに生成されたインターフェロン- γ の量の分析によって示した図である。

【0031】

【図4】図4は、活性化されたNK細胞から分泌されたサイトカインを、サンドイッチELISA法によって示したグラフである。

【0032】

【図5】図5は、SP IL-2とIL-2との間のタンパク質活性(A)および安定性(B)の比較を示した図である。

【0033】

【図6】図6は、SP IL-2(10ng/ml)(条件A)、および、SP IL-2(5ng/ml)+IL-12(5ng/ml)(条件B)で別々に処置された、正常者およびがん患者におけるNK細胞活性を示した図である。

【0034】

【図7】図7は、NK細胞がIL2の刺激に従い、T細胞、NK細胞、全血およびPBMCにおいてインターフェロン- γ を分泌する能力を示したグラフである。

【0035】

【図8】図8は、LPSによって刺激した正常者のNK細胞から分泌されたインターフェロン- γ の量の変化を示したグラフである。

【0036】

【図9】図9は、処置されたIL12およびIL15の濃度および培地の組成の違いによる、インターフェロン- γ を分泌するNK細胞の能力の変化を示したグラフである。

【0037】

【図10】図10は、がんの進行段階に応じた、分泌インターフェロン- γ の量の変化を示したグラフである。

【0038】

【図11】図11は、サイトカインにより刺激された正常者のNK細胞から生成されるインターフェロン- γ の、ELISAプレートを使用した分析の結果を示した図である。

【0039】

【図12】図12は、サイトカインによって刺激された、正常者から提供された全血のフローサイトメトリーの結果を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0040】

発明の詳細な説明

10

20

30

40

50

本発明は、がんとNK細胞の相互作用を利用した、がん罹患を診断するための方法、キットおよび試薬に関する。

【0041】

本目的のために、NK細胞活性の測定方法であって、血液試料中のNK細胞を刺激し、それにより人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させること、および、血液試料中のNK細胞分泌サイトカインの量を測定することを含む方法が提供される。

【0042】

本発明者らは、がん患者においてNK細胞活性が減少するという観察に基づいて、NK細胞活性を測定することにより、がんの罹患を一次スクリーニングし得ることを見出した。本明細書に記載される方法は、NK細胞に対して人為的な刺激を与えることによりNK細胞が正常に機能するかどうかについて決定すること、および、血液試料中に存在するNK細胞分泌サイトカインの量の変化を検出することによりNK細胞の活性化レベルを測定することが可能であり、これは、単に元々血液試料中に存在しているNK細胞の数やサイトカインの量を測定する他の方法とは異なる。例えば、NK細胞の活性化レベルを測定する従来の方法においては、 ^{51}Cr 放出アッセイが標的特異的細胞毒性の測定方法として使用されている。しかしながら、NK細胞活性をこのやり方で測定する場合には、放射性同位体を使用する必要があるため、測定および分析が難しく、複雑で費用がかかる。そのため、当該アッセイは、がんの罹患を簡単に診断できるがんの一次スクリーニング/検査方法への使用には適しない。一方で、本発明によると、NK細胞を刺激し、NK細胞分泌サイトカインを生成させ、生成されたNK細胞分泌サイトカインを定量化することによってNK細胞活性を測定することができるため、NK細胞活性が減少した対象を、がんを患っている、または、がんを患うリスクのある対象として、有利にスクリーニングすることができる。

【0043】

本発明によると、血液試料は、限定されずに、対象から採取された全血、末梢血単核球(PBMCs)および、NK細胞を含んでよい。PBMCsまたはNK細胞は、全血の代わりに無処置(intact)で使用され得るが、特定の態様においては、手順がより簡単であり、低コストであるため、全血の使用が有利な場合がある。

【0044】

なお、本発明において、用語「対象(subject)」はがんを患っている疑い、もしくは、がんの再発を有する疑いがある、または、がんの罹患または再発を決定することを望む哺乳動物をいう。

【0045】

血液試料中に存在するNK細胞は一般的に不活性状態で存在する。本発明によると、少なくとも1つのサイトカイン、リポ多糖(LPS)またはポリイノシン：ポリシチジン酸(ポリI:C)を、血液試料中の当該NK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させる役目をする作用物質(本明細書中では、アゴニストまたはアクチベーターとも呼ばれる)として使用することができる。ここで、NK細胞を活性化するために使用されるサイトカインは、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15およびインターロイキン18、または、それらの組み合わせであってよい。インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15、インターロイキン18、LPSまたはポリI:Cは、NK細胞分泌サイトカインを生成するために刺激されることが当該技術分野において広く知られている。そのため、本発明の1つの例示的な態様によると、NK細胞の刺激は、血液試料を、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15および/またはインターロイキン18を含む、少なくとも1つのサイトカインと共にインキュベートすることにより、または、血液試料をLPSまたはポリI:Cと共にインキュベートすることにより行われてもよい。

【0046】

1つの非限定的な態様において、NK細胞の刺激は血液試料をインターロイキン2と共

10

20

30

40

50

にインキュベートすることによって行われてもよい。インターロイキン2はT細胞によって分泌されるサイトカインの1つであり、*in vivo*の適応免疫応答におけるT細胞によるNK細胞の活性化に関連することが知られている。また、インターロイキン2は*in vitro*でNK細胞を活性化するために一般的に広く使用されるサイトカインである。そのため、NK細胞の刺激は、血液試料をインターロイキン2と共にインキュベートすることによって行われてもよい。

【0047】

他の非限定的な態様において、NK細胞の刺激は、血液試料をインターロイキン2およびインターロイキン12と共にインキュベートすることによって行われてもよい。早期のがん患者の場合、NK細胞の活性が低くてもT細胞の活性が高いことがある。それに対して、末期のがん患者の場合、NK細胞だけでなく、T細胞の活性も低いことがある。インターロイキン12はNK細胞だけでなく、T細胞の活性化にも関与する。それゆえ、もしインターロイキン2と共にインターロイキン12で処置する場合、NK細胞から分泌されるサイトカインに、T細胞の刺激によって分泌されるサイトカインが加わる。そのため、NK細胞の抗がん免疫だけでなく、免疫の総合的なレベルを評価し、そして、このレベルをがんの進行の程度またはがん治療の予後を表すマーカーとして使用することが可能である。インターロイキン15およびインターロイキン18は、活性化した樹状細胞およびマクロファージにより分泌されるサイトカインであり、*in vitro*での自然免疫応答の最中にNK細胞の活性化および増殖を誘導する。特に、インターロイキン12がインターロイキン15またはインターロイキン18と組み合わせられた場合、比較的少量のインターロイキン12を、NK細胞におけるNK細胞分泌サイトカインの分泌を刺激するために使用することができる。そのため、NK細胞の刺激は、血液試料をインターロイキン12およびインターロイキン15、または、インターロイキン12およびインターロイキン18と共にインキュベートすることによって効果的に行うことができる。

【0048】

本発明によると、NK細胞分泌サイトカインの数値はNK細胞活性を評価する尺度として使用される。本発明において、「NK細胞分泌サイトカイン」はNK細胞から分泌されるサイトカイン、特に、人為的な刺激による活性化NK細胞からのサイトカインをいう。1つの態様において、NK細胞分泌サイトカインは、インターフェロン-ガンマ(IFN- γ)、腫瘍壊死因子-アルファ(TNF- α)、マクロファージ炎症性タンパク質-1(MIP-1 α)の群から選択される少なくとも1つのサイトカインである。インターフェロン- γ はNK細胞、樹状細胞、Tc細胞、Th1細胞等から分泌され、がんの制御のための自然免疫および適応免疫において、重要な役割を果たすサイトカインとして知られる。また、腫瘍壊死因子-アルファ(TNF- α)はがん細胞を殺滅し、さらには、細菌などの外部侵入物の殺滅、T細胞の活性化の誘導に関与し、B細胞からの抗体生産のための補助的な因子としての役割を果たす。そのため、例えば、インターフェロン- γ または腫瘍壊死因子-アルファの数値が正常者からのインターフェロン- γ または腫瘍壊死因子-アルファの数値より小さい場合、このことは、がんの制御のためのNK細胞活性に問題があることを示す。そのため、人為的に活性化されたNK細胞から分泌されるインターフェロン- γ または腫瘍壊死因子-アルファの量を、正常者からのインターフェロン- γ または腫瘍壊死因子-アルファの量と比較することによって、NK細胞活性を決定することが可能である。

【0049】

一方、マクロファージ炎症性タンパク質-1(MIP-1 α)は、NK細胞の活性化を比較するための対照群として使用できる。以下の例において示すとおり、マクロファージ炎症性タンパク質-1(MIP-1 α)の数値は正常者およびがん患者の双方において同様に高い。それゆえ、マクロファージ炎症性タンパク質-1(MIP-1 α)は、正常者およびがん患者におけるNK細胞活性を分析するために使用でき、または、がん診断キットを用いた分析のための対照群として使用できる。

【0050】

10

20

30

40

50

NK細胞分泌サイトカインの定量化は、当該技術分野において知られるいかなる方法によって行われてもよいが、本発明はこれに限定されるものではない。例えば、インターフェロン- γ の定量化は、インターフェロン- γ 酵素結合免疫吸着アッセイ(インターフェロン- γ ELISA)を使用して行われてもよい。

【0051】

また、血液試料中のNK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させる役目をする作用物質として使用される、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18を含む少なくとも1つのサイトカインは、安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態であってよい。

【0052】

安定化ペプチドとの融合タンパク質の形態のインターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18は、野生型インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18の生物学的活性および保存安定性と比較して、同様の生物学的活性および高い保存安定性を提供することができる。例えば、サイトカインが当該安定化ペプチドと結合されると、当該サイトカインは、本来の活性を有する一方、凍結乾燥など環境の変化にも関わらず安定性を維持する。

【0053】

安定化ペプチドは、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18のNまたはC末端に結合していてもよく、当該融合タンパク質の調製は、融合タンパク質を調製する既知の方法を用いて行ってもよい。

【0054】

1つの例示的な態様によると、シヌクレインファミリーのC末端酸性テール(アルファ-シヌクレインの酸性テールアミノ酸配列、ATS)ドメインペプチドを、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18に結合できる安定化ペプチドとして使用することができるが、本発明はこれに限定されるものではない。韓国特許第10-0506766号は、ATSペプチドが環境ストレスに対する抵抗性を融合パートナータンパク質に与えることを開示している。

【0055】

1つの例示的な態様によると、ここで使用され得る安定化ペプチドは、 α -シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基103~115、アミノ酸残基114~126、アミノ酸残基119~140および、 β -シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基85~134、 γ -シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96~127および、シノレチンのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96~127から選択される安定化ペプチドを含む。本発明において、ATSペプチドのアミノ酸配列、ATSペプチドおよび同ペプチドを含む融合タンパク質の調製方法は、韓国特許第10-0506766号に開示される方法を使用して行うことができる。以下の例を参照すると、ATSペプチドと融合されたインターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18は安定性が高く、サイトカインがTリンパ球により活性化された場合に野生型のものと同様の活性を表すことが示される。

【0056】

1つの態様において、血液試料中のNK細胞を刺激し、それによって人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させるステップは、担体タンパク質を含有する培地中で行うことができる。担体タンパク質は、血液試料中のNK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させ、それによってNK細胞がより多くのNK細胞分泌サイトカインを生産するのを誘導するための作用物質として使用される、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18などのサイトカインを安定化させるための役割を果たす。特定の態様において、担体タンパク質はウシ血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンであってよ

10

20

30

40

50

いが、これらに限定されるものではない。

【0057】

また、NK細胞活性を測定する方法は、がんの罹患または再発をスクリーニングすることに使用することができる。

【0058】

NK細胞活性は、人為的に活性化されたNK細胞から分泌されるNK細胞分泌サイトカインの量を、正常者からのNK細胞分泌サイトカインの量と比較することによって測定することができる。この場合、NK細胞分泌サイトカインの量が正常者からのNK細胞分泌サイトカインのものより小さい場合に、NK細胞活性は減少したとみなされる。そのため、がんのリスクまたはがんの再発を判定することが可能である。NK細胞活性が正常者と比較して減少した場合、対象は、がんを患っている疑いのある患者、あるいは、がんの再発を有する患者として一次的に分類され得る。また、がんの罹患または再発は、通常行われるがん診断のための、CT、MRIまたはポジトロン断層撮影（PET）などのさらなる診断方法を介して、または、最終的な組織検査を介して診断され得る。本発明による方法はがんを最終的に診断する方法ではないが、当該方法は、血液を使用してがんの罹患または再発を一次スクリーニングできるという優れた利点がある。

10

【0059】

また、本発明は、血液試料中のNK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させる役目をするアゴニストまたはアクチベーターなどの作用物質を含む、NK細胞活性を測定するためのキットを提供する。NK細胞活性を測定するための当該キットは、上記NK細胞活性を測定する方法を容易に行うために使用することができる。

20

【0060】

NK細胞活性を測定するためのキットにおいて、NK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させる役目をする作用物質は、少なくとも1つのサイトカイン、LPSまたはポリI:Cであり得、当該サイトカインは、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15およびインターロイキン18からなる群から選択され得る。

NK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化して、インターフェロン- γ などのNK細胞分泌サイトカインを生成させる役目をする作用物質に加えて、当該がん診断キットは、NK細胞活性測定のためのさらなる構成要素、例えば、NK細胞分泌サイトカインを定量化するための抗体および基材を含んでもよい。1つの態様において、本発明のキットは、抗INF- γ 抗体、抗TNF- α 抗体および抗MIP-1 β 抗体の群から選択される少なくとも1つの抗体をさらに含む。

30

【0061】

本発明によるキットにおける抗体は、固体基材上に固定されていてもよい。抗体は、文献（Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988）中に記載される様々な方法を使用して固定することができる。適した固体基材は、細胞培養プレート、ELISAプレート、チューブおよび高分子フィルムを含み得る。さらに、固体基材は、棒、合成ガラス、アガロースビーズ、カップ、平面パック、または、固体支持体によって支持された、または固体支持体に付着した、他のフィルムまたはコーティングを含む。

40

【0062】

また、本発明によるキットは、インターフェロン- γ などの、NK細胞分泌サイトカインを選択的に認識する抗体を用いた免疫学的分析のために使用される試薬を含み得る。免疫学的分析は、本発明による抗体への抗原の結合を測定できるすべての方法を含み得る。かかる方法は当該技術分野において知られており、例えば、免疫細胞化学および免疫組織化学、放射性免疫測定法、ELISA、免疫プロット、Farrアッセイ、沈降素反応、比濁法、免疫拡散法、向流電気泳動法、一元放射免疫拡散法および、免疫蛍光法を含む。

【0063】

50

免疫学的分析のために使用される試薬は、適した担体、検出可能なシグナルを生成する能力のある標識、溶解剤、界面活性剤を含む。また、標識材料が酵素の場合、試薬は酵素活性を測定できる基質、および、反応停止剤を含み得る。

適した担体は、限定されずに、可溶性担体、例えば、当該技術分野において知られる、生理学的に利用可能なバッファー（例えば、PBS）の1つ、または、不溶性担体、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋性デキストラン、多糖およびラテックスの表面を金属で覆うことによって得られる磁性粒子などの高分子、および、他の紙、ガラス、金属、アガロースおよびそれらの組み合わせを含み得る。

【0064】

検出可能なシグナルを生成できる標識として、酵素、蛍光物質、発光物質および放射性物質が使用され得る。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、D-ガラクトシダーゼ、ブドウ糖酸化酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、インペルターゼ等を使用することができ、フルオレセインイソチオシアネートまたはフィコビリタンパク質は、蛍光物質として使用することができ、イソルミノールまたはルシゲニン、発光物質として使用することができ、 I_{131} 、 C_{14} または H_3 は、放射性物質として使用することができる。しかしながら、例示的な材料に加えて、免疫学的分析のために使用できる任意の物質をここで使用することができる。

【0065】

さらに本発明は、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したサイトカインを含む融合タンパク質を提供する。ここで、サイトカインは、インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18であってもよい。上述のとおり、当該融合タンパク質は、NK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化してNK細胞分泌サイトカインを生成させる役目をする作用物質として使用することができ、凍結乾燥または長期保存などの環境の変化にも関わらず、野生型インターロイキン2、インターロイキン12、インターロイキン15またはインターロイキン18と比較して高い安定性を提供する。

【0066】

1つの例示的な態様によると、融合タンパク質は、インターロイキン2がシヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合した融合タンパク質であってもよい。

【0067】

別の例示的な態様によると、融合タンパク質は、インターロイキン12がシヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合した融合タンパク質であってもよい。

【0068】

さらに別の例示的な態様によると、融合タンパク質は、インターロイキン15がシヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合した融合タンパク質であってもよい。

【0069】

さらにまた別の例示的な態様によると、融合タンパク質は、インターロイキン18がシヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合した融合タンパク質であってもよい。

【0070】

融合タンパク質において、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドはまた、 α -シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基103~115、アミノ酸残基114~126、アミノ酸残基119~140およびアミノ酸残基130~140、 β -シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基85~134、 γ -シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96~127および、シノレチンのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96~127から選択され得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 1 】

また、本発明はNK細胞を活性化するための融合タンパク質の使用を提供する。上述のように、当該融合タンパク質は、血液中のNK細胞を活性化し、NK細胞分泌サイトカインの分泌を促進するために使用することができる。

【 0 0 7 2 】

したがって、本発明はNK細胞を活性化するための組成物を提供する。ここで、組成物は、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したインターロイキン2、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したインターロイキン12、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したインターロイキン15およびシヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペ
10
プチドに結合したインターロイキン18からなる群から選択される、少なくとも1つの融合タンパク質を含む。

【 0 0 7 3 】

1つの例示的な態様によると、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドは、
- シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基103～115、
アミノ酸残基114～126、アミノ酸残基119～140およびアミノ酸残基130
～140、
- シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基85～134、
- シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96～127および、シノ
レチンのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96～127から選択され得る。

【 0 0 7 4 】

また、NK細胞を活性化するための組成物は、安定化ペプチドと融合したサイトカインに加えて、融合タンパク質を維持および保存することが可能なバッファーを含み得る。

【 0 0 7 5 】

さらに、本発明は、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したインターロイキン2、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したインターロイキン12、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したインターロイキン15および、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドに結合したインターロイキン18からなる群から選択される、
30
少なくとも1つの融合タンパク質を含む、がん診断キットを提供する。上述のとおり、対象から採取された血液試料を融合タンパク質と共にインキュベートすると、血液試料中のNK細胞が活性化される。そのため、対象におけるNK細胞活性は、NK細胞の活性化により生成されたインターフェロン- γ を定量化することにより測定することができ、それによって、正常者のNK細胞活性より低いNK細胞活性を有する対象を、がんを患っている、または、がんの再発を有するリスクのある患者として分類することにより、がんを一次診断することができる。

【 0 0 7 6 】

1つの例示的な態様によると、シヌクレインファミリーのC末端酸性テールドメインペプチドは、
- シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基103～115、
アミノ酸残基114～126、アミノ酸残基119～140およびアミノ酸残基130
～140、
- シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基85～134、
40
- シヌクレインのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96～127および、シノレチンのC末端酸性テールドメインのアミノ酸残基96～127から選択され得る。

【 0 0 7 7 】

融合タンパク質に加えて、当該がん診断キットは、本発明による診断方法を行うために使用されるさらなる構成要素、例えばNK細胞分泌サイトカインを定量化するための抗体および基材を含み得る。これらの構成要素は、NK細胞活性を測定するためのキットに関連して上述されている。上述の方法におけるこれらの構成要素を使用するための説明書もまた、キットに含まれ得る。

【 0 0 7 8 】

本発明の好ましい態様のこれらおよび他の特徴、側面および利点が、以下の例において

10

20

30

40

50

、より十分に記載されることは明らかである。これらの例が、説明の目的のためだけに提供され、発明の範囲を限定することを意図しないこともまた理解されるべきである。当業者は、特許請求の範囲に記載された発明の範囲から逸脱することなく、他の均等物の作製および改良を行うことができることを理解する。

【実施例】

【0079】

例

調製例1：安定化ペプチド - IL融合タンパク質を有する発現ベクターの構築

安定化ペプチドと融合したIL-2、IL-12、IL-15またはIL-18を調製するために、発現ベクターを構築した。 -シヌクレインのアミノ酸残基119~140を含有するペプチド(配列番号23、以下「SP」と称する)を安定化ペプチドとして使用した。IL2、IL12p35、IL12p40、IL15およびIL-18のcDNAを、全RNA抽出キット(Invitron Biotechnology)を使用してヒトリンパ球から全RNAを単離し、逆転写酵素(Invitrogen)を使用して全RNA逆転写することによって得た。得られたcDNAを鋳型として使用し、各cDNA遺伝子に特異的な以下のプライマーを使用して、PCRで増幅した。

【数1】

IL2-22-BamH1-F: ACAGGATCCCCTACTTCAAGTTCT (配列番号11)

IL2-153-Xho-R: CACTCTCGAGTCAAGTCAGTGTGAGAT (配列番号12)

IL12-p40-23-BamH: GTGGATCCATATGGGAAGTGAAGAAAGATG(配列番号13)

IL12-p40-328-CT-His: ATGGTGATGATGACTGCAGGGCACAGATGCCC (配列番号

14)

IL12-p35-23-BamH: GTGGATCCAGAAACCTCCCCGTGGC (配列番号15)

IL12-p35-219-CT-His: ATGGTGATGATGGGAAGCATTTCAGATAGC(配列番号16)

IL15-49-Nde: GAGTCAAGCATATGAACTGGGTGAATGTAA (配列番号17)

IL15-162-BamH-R: GTGGATCCAGAAGTGTGATGAAC (配列番号18)

IL18-37-BamH: GTGGATCCTACTTTGGCAAGCTTG (配列番号19)

IL18-193-EcoR1: AGACTGGAATTCCTAGTCTTCGTTTTG (配列番号20)

【0080】

図1は、IL2、IL12p35、IL12p40、IL15およびIL-18を含む、上記サイトカインとSPとの融合産物のコンストラクトを示す概略図である。同図に図解するとおり、SP-hIL2融合産物は、PCR増幅したhIL2および -シヌクレインのアミノ酸残基119~140をコードする遺伝子を、pRSETA発現ベクターに順次サブクローニングすることによって構築した。SP-hIL12p40融合産物は、PCR増幅したhIL12p40および -シヌクレインのアミノ酸残基119~140をコードする遺伝子を、pVL1393発現ベクターに順次サブクローニングすることによって構築した。SP-hIL12p35融合産物は、PCR増幅したSP-hIL12p35および -シヌクレインのアミノ酸残基119~140をコードする遺伝子を、pVL1393発現ベクターに順次サブクローニングすることによって構築した。hIL15-SP融合産物は、PCR増幅したhIL15および -シヌクレインのアミノ酸残基119~140をコードする遺伝子を、pRSETA発現ベクターに順次サブクローニングすることによって構築した。SP-hIL18融合産物は、PCR増幅したhIL18および -シヌクレインのアミノ酸残基119~140をコードする遺伝子を、pRSETA発現ベクターに順次サブクローニングすることによって構築した。すべてのコンスト

ラクトの配列はDNAシーケンシングによって確認した。

【0081】

SP-hIL2融合産物の核酸およびアミノ酸配列は、配列番号1および2にそれぞれ記載されている。SP-hIL12p40融合産物の核酸およびアミノ酸配列は、配列番号3および4にそれぞれ記載されている。SP-hIL12p35融合産物の核酸およびアミノ酸配列は、配列番号5および6にそれぞれ記載されている。図1に示すように、6×His-tag配列が、ウィルスによって発現されるSP-hIL12p40融合産物およびSP-hIL12p35融合産物の単離および精製の目的のために、各ベクターに含有される。hIL15-SP融合産物の核酸およびアミノ酸配列は、配列番号7および8にそれぞれ記載されている。また、SP-hIL18融合産物の核酸およびアミノ酸配列は、配列番号9および10にそれぞれ記載されている。

10

【0082】

調製例2：組換えSP融合タンパク質の発現および精製

組換えSP-hIL2タンパク質を発現するために構築した発現ベクターは、Escherichia coli BL21(DE3)RIPL (Invitrogen) に形質転換し、次いでインキュベートした。培養液を10,000rpmで10分間遠心分離し、細胞ペレットを得た。細胞ペレットはリン酸緩衝食塩水(PBS、pH7.4)に再懸濁し、その後、超音波処理によってホモジナイズした。E. coliにおいて不溶性の形態で発現されたSP融合タンパク質をリフォールディングの手順に供し、その後、イオン-交換樹脂を使用して精製した。

【0083】

組換えSP-hIL12タンパク質を発現するために構築した2つの発現ベクターは、昆虫細胞系であるsf21細胞にそれぞれトランスフェクトし、ウィルス培養液を製造した。得られた2つのウィルス培養液は、IL12p40がIL12p35に結合したヘテロ二量体IL12p70タンパク質を生産するために、同時に昆虫sf21細胞系にトランスフェクトし、これをその後、精製した。

20

【0084】

組換えhIL15-SPタンパク質を発現するために構築した発現ベクターは、E. coli BL21(DE3)RIPL (Invitrogen) に形質転換し、次いでインキュベートした。培養液を10,000rpmで10分間遠心分離し、細胞ペレットを得た。細胞ペレットはPBS (pH7.4)に再懸濁し、その後、超音波処理によってホモジナイズした。E. coliにおいて可溶性の形態で発現されたSP融合タンパク質を、イオン-交換樹脂を使用して精製した。

30

【0085】

組換えSP-hIL18タンパク質を発現するために構築した発現ベクターは、E. coli BL21(DE3)RIPL (Invitrogen) に形質転換し、次いでインキュベートした。培養液を10,000rpmで10分間遠心分離し、細胞ペレットを得た。細胞ペレットはPBS (pH7.4)に再懸濁し、その後、超音波処理によってホモジナイズした。E. coliにおいて可溶性の形態で発現されたSP融合タンパク質を、イオン-交換樹脂を使用して精製した。

【0086】

精製したSP融合タンパク質(3μg)は、最終精製タンパク質を確認するために15%SDS-PAGE使用して電気泳動した(図2:(a)SP-hIL2タンパク質(ATGen, Cat# ATGK04)、(b)IL15-SPタンパク質(ATGen, Cat# ATGK06)および(c)SP-hIL18タンパク質(ATGen, Cat# ATGK07))。

40

【0087】

実験例1：全血においてNK細胞を活性化できるサイトカインの種類の確認

正常者からの全血1mlとRPMI1640培地1mlとを24ウェル細胞培養プレートに入れ、10ng/mlの各組換えヒトインターロイキンIL-2、IL-12、IL-15およびIL-18と混合し、その後24時間培養した。24時間の培養後、上清を採取し、上清中のインターフェロン- γ の量をサンドイッチELISA法を使用して測定

50

した(図3A)。結果として、正常者の血液試料中のNK細胞によって分泌されたサイトカインは、微量であったため、検出されなかったが、血液試料をIL-2、IL-12、IL-15およびIL-18の少なくとも1つで処理すると、血液試料中のNK細胞から分泌されるサイトカインのレベルは上昇した。血液試料をNK細胞スティミュレーターのみで処理すると、血液試料中のインターフェロン- γ のレベルが、特にIL-2で処理した群およびIL-12で処理した群において上昇することが分かった(図3A)。

【0088】

また、正常者からの全血1mlとRPMI1640培地1mlとを24ウェル細胞培養プレートに入れ、図3B(各10ng/ml)に示すように、組換えヒトインターロイキンの様々な組み合わせにより処理し、24時間培養した。24時間の培養後、上清を採取し、インターフェロン- γ のレベルを上記と同じ方法で測定した。全血をNK細胞スティミュレーターの様々な組み合わせで処理すると、インターフェロン- γ のレベルが、特にIL-2+IL-12の存在下において上昇することが分かった(図3B)。

10

【0089】

さらに、IL-12およびIL-15の組み合わせでの処理の後のインターフェロン- γ のレベルを測定するために、全血を図3Cに示す濃度のNK細胞スティミュレーターで処理し、24時間培養した。24時間の培養後、上清を採取し、インターフェロン- γ のレベルを上記と同じ方法で測定した。

【0090】

IL-12およびIL-18の組み合わせの処理の後のインターフェロン- γ のレベルを測定するために、全血を図3Dに示す濃度のNK細胞スティミュレーターでも処理し、24時間培養した。24時間の培養後、上清を採取し、インターフェロン- γ のレベルを上記と同じ方法で測定した。

20

【0091】

実験例2：IL-2で人為的に活性化させたNK細胞から分泌されるサイトカインの種類の確認

全血試料を61人の正常者および50人のがん患者から取得した。全血1mlとRPMI1640培地1mlとを24ウェル細胞培養プレートに入れ、10ng/mlの組換えヒトインターロイキンSPIL-2で処理し、その後24時間培養した。24時間の培養後、上清を採取し、その後、サンドイッチELISA法を使用して、インターフェロン- γ 、TNF- α およびMIP-1 β のレベルを測定した。結果として、図4に示すように、インターフェロン- γ およびTNF- α が、がん患者のよりも少ない量で正常者の全血から分泌されたが、MIP-1 β は、正常者およびがん患者の全血試料から分泌されたことが確認された。

30

【0092】

疾患検査に使用されるin vitro診断試薬の場合、様々な検証技術が使用されている。ここでは、一般的に、正常範囲とカットオフ分析を使用した。正常範囲は、各試料群の平均値および標準偏差を測定するために使用される参照範囲であり、カットオフ分析は、in vitro診断試薬の推定値を計算することによって臨床的感度および臨床的特異度を測定する方法である。臨床的感度は、患者が疾患を患っている場合に、診断検査の結果が陽性を示すことが実証される確率を意味し、臨床的特異度は、患者が疾患を患っていない場合に、診断検査の結果が陰性を示すことが実証される確率を意味する。

40

【0093】

カットオフ値が10%超および10%未満である場合、カットオフ値はそれぞれ、正および負の値に設定されていると仮定する。その場合、臨床的感度および臨床的特異度はカットオフ分析を使用して測定した。結果を表1に示す。

【表 1】

	IFN- γ	TNF- α	MIP-1 β
臨床的感度 (%)	98.4	90.9	100
臨床的特異度 (%)	98.0	69.0	50

【0094】

10

がん患者および正常者の群において、IFN- γ は98.4%の感度および98%の特異度を有することが測定された。TNF- α は90.9%の感度および69%の特異度を有することが測定され、IFN- γ のものより低かったが、最新の開発されたがん診断キットは高くても20~30%の特異度を有する。それゆえ、約70%またはそれを超える特異度を有するTNF- α もまた、NK細胞活性を測定するためのがん診断キット用のマーカーとして使用し得ることが予想される。

【0095】

実験例3：SP IL-2およびIL-2の安定性の比較

SP IL-2およびIL-2の安定性を比較するために、2人から全血試料を採取した。得られた全血試料のそれぞれ1mlとRPMI 1640培地1mlとを、24ウェル細胞培養プレートに入れ、その後、SP IL-2およびIL-2を加え、完全に混合し、その後24時間培養した。24時間の培養後、上清を採取し、上清中のインターフェロン- γ のレベルをサンドイッチELISA法を使用して測定した。IL-2およびSP IL-2の活性分析の結果から、2つのタンパク質の活性に違いがないことが分かった(図5A)。しかしながら、それぞれ全血培養条件下において、IL-2ではなくSP IL-2で全血を処理した場合、NK細胞がSP IL-2によって活性化され、それによってインターフェロン- γ のレベルが上昇したことが確認できた(図5B)。このことは、2つのタンパク質の活性に違いはないが、SPを適用することでIL-2の安定性が増大することを示す。

20

【0096】

30

実験例4：NK細胞を刺激するための条件に応じた、正常者およびがん患者からのNK細胞活性の比較

20人の正常者および48人の末期(3~4段階)がん患者から採取した全血試料のそれぞれ1mlと、RPMI 1640培地1mlとを、24ウェル細胞培養プレートに入れ、各試料を2つのサブグループに分け、サブグループをそれぞれ、SP IL-2(10ng/ml)(条件A)およびSP IL-2(5ng/ml)+IL-12(5ng/ml)(条件B)で処理し、その後24時間培養した。培養の後、上清を採取し、インターフェロン- γ のレベルをサンドイッチELISA法を使用して測定した。

【0097】

結果として、条件Aの場合において、図6に示すように、正常者の約90%が高いインターフェロン- γ レベルを有したが、がん患者の大半は低いインターフェロン- γ レベルを有したことが分かった。条件Bの場合においても、正常者は高いインターフェロン- γ レベルを有したが、がん患者の大半は低いインターフェロン- γ のレベルを有したことが分かった。しかしながら、条件Aの場合と比較して、条件Bの場合における、高いインターフェロン- γ レベルはがん患者においてより高かった。SP IL-2のみで全血試料を処理する場合、NK細胞のみが特異的に活性化される(以下の実験例5および図7参照)が、全血試料がSP IL-2およびIL-12の組み合わせで処理する場合、NK細胞はT細胞と共に活性化されるようである。それゆえ、インターフェロン- γ のレベルがT細胞の活性化により上昇するようである。そのため、T細胞活性が残っているがん患者の一部において、高いインターフェロン- γ レベルが観察される可能性があると考えられ

40

50

る。条件Bで処理された場合であっても、がん患者が低いインターフェロン - レベルを有する場合、NK細胞の抗がん免疫および全般的な全身性免疫ががん患者において減少したと推定できる。これを、がんの進行と予後を決定するための重要なマーカーとして使用することが考えられる。

【0098】

実験例5：血液試料の種類に応じた、正常者およびがん患者のNK細胞活性の比較

正常者からの血液試料の種類に応じた、IL2によるインターフェロン - 分泌能力の違いを決定するために、以下の実験を行った。(a) T細胞からのIL2 1 ng/ml に対するNK細胞のインターフェロン - 分泌能力、(b) NK細胞からのIL2 1 ng/ml に対するNK細胞のインターフェロン - 分泌能力、(c) 全血からのIL2 1 ng/ml に対するNK細胞のインターフェロン - 分泌能力、および(d) PBMC からのIL2濃度に応じたNK細胞のインターフェロン - 分泌能力を測定した。結果を図7に示す。インターフェロン - は上記と同じ方法で測定した。結果として、T細胞におけるIL2の活性化によって分泌されたインターフェロン - の量は変化したが、未処理群のインターフェロン - のものと大きく違わなかったため、T細胞は血液試料として使用するには適さなかった。全血、PBMCsおよびNK細胞において、未処理群のインターフェロン - の量と比較して、インターフェロン - の量に有意な差があった。そのため、全血、PBMCsおよびNK細胞は、本発明による方法およびキットに適用するための好適な血液試料であると評価された。

【0099】

実験例6：LPSによる、正常者から提供されたNK細胞活性の比較

血液試料中のNK細胞を刺激し、人為的にNK細胞を活性化してインターフェロン - を生成させる役目をする作用物質の他の例として、LPSを、ヒト全血からのインターフェロン - の量を測定するために使用した。図8に示すように、インターフェロン - の分泌が50 ng/mlのLPSによって誘導されたことが明らかとなり、これはNK細胞がLPSなどの非特異的アゴニストで刺激される場合であっても、NK細胞が人為的に活性化し、インターフェロン - を生成し得ることを示すものである。

【0100】

実験例7：安定化ペプチドと融合したhIL12およびhIL15によるNK細胞の刺激

NK細胞をインキュベートするチューブとして、抗凝固剤であるヘパリンナトリウムを含有するチューブ(BD)を購入し、血液の凝固を防ぐために使用した。5 mlの全血を採取し、抗凝固剤(ヘパリンナトリウム)を含有するチューブの中に入れた。得られた全血の1 mlをRPMI 1640培地と混合し、NK細胞アクチベーターであるSP-hIL2/hIL12をそれに加えた。得られた混合物を37℃で16~24時間インキュベートした。安定化ペプチドが融合したSP-hIL2およびhIL12による、全血におけるNK細胞の刺激は、上記実験例において記載された方法に従ってインキュベートした血液中のインターフェロン - の量を測定することにより決定した。

【0101】

また、全血の培養条件に応じて分泌されるインターフェロン - の量を測定した。図9に示すように、NK細胞を、ウシ血清アルブミンなどの担体タンパク質が添加されたPBS中でインキュベートした場合、NK細胞をPBS中でインキュベートした場合と比較して、NK細胞のインターフェロン - 分泌能力が上昇したことが明らかとなった。

【0102】

実験例8：がんの進行段階に応じたインターフェロン - 分泌の違い

がんの進行段階に応じた分泌インターフェロン - の量を決定するために、がん患者1(乳癌から完全に回復した患者)、がん患者2(脳腫瘍を患っている疑いのある患者)および正常者からの全血を、IL12 100 ng/mlおよびIL15 1000 ng/mlが添加されたRPMI 1640培地中で24時間インキュベートし、分泌されたインターフェロン - の量を上記のとおり測定した。全血はフローサイトメトリーにも供した。

。

10

20

30

40

50

【0103】

結果として、図10に示すように、インターフェロン- γ の分泌能力が、正常者、がん患者1およびがん患者2の順に確認された。そのため、分泌されるインターフェロン- γ の量は、がんの進行段階に応じて異なることが確認された。これらの事実から、本発明による方法が、血液試料中のNK細胞によって分泌されるインターフェロン- γ の量を測定し、それによって、がんの罹患および進行段階の予測、または、がんの再発を予測するために使用できることが分かった。

【0104】

実験例9：NK細胞の刺激により生成されるインターフェロン- γ の定量化

NK細胞をインキュベートするチューブとして、抗凝固剤であるヘパリンナトリウムを含有するチューブ(BD)を購入し、血液の凝固を防ぐために使用した。5mlの全血を8人の正常者から採取し、抗凝固剤(ヘパリンナトリウム)を含有するチューブの中に入れた。得られた全血の1mlをRPMI1640培地と混合し、安定化ペプチドと結合したSP-hIL12/hIL15-SPをそれに加えた。得られた混合物を37℃で16~24時間インキュベートした。

10

【0105】

37℃でインキュベートした8人の正常者からの全血を1500~2000gで遠心分離し、上清としての血清を得た。その後、血清の150~200 μ lを採取し、インターフェロン- γ ELISAに供した。0.05% Tween-1次抗体(抗ヒトインターフェロン- γ モノクローナル抗体、ATGen, Cat# ATGK02)をコーティングバッファー(0.1炭酸ナトリウム、pH9.5)で1:1000の比率に希釈した。希釈した一次抗体を、100 μ l/ウェルの量で96ウェルマイクロタイターELISAプレート(Nunc Maxisorp, NUNC, Naperville, IL)に分け、16~18時間、4℃で維持した。その後、プレート内の溶液を除去し、プレートを400 μ l/ウェルの量の洗浄溶液(0.05% Tween 20を含有するPBS)で洗浄した。この場合、洗浄は3回行った。その後、10%ウシ胎児血清(FBS)を含有するPBSを300 μ l/ウェルの量で分け、室温で1時間維持した。その後、プレート内の溶液を除去し、プレートを400 μ l/ウェルの量のPBST(0.05% Tween 20を含有するPBS溶液)で洗浄した。この場合、洗浄は3回行った。一次抗体でコーティングした96ウェルマイクロタイターELISAプレートをシールし、使用するために4℃で保管した。

20

30

【0106】

インターフェロン- γ 標準溶液(組換えヒトインターフェロン- γ (ATGen, Cat# IFG4001) 200ngおよび0.05% Proclon300を含有するPBS)を希釈し、一次抗体でコーティングした96ウェルマイクロタイターELISAプレートに100 μ l/ウェルの量で分け、実験段階で調製した患者の血清を100 μ l/ウェルの量で分け、その後室温で2時間維持した。

【表 2】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
B	Blank	Blank	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
C	S1	S1	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
D	S2	S2	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
E	S3	S3	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
F	S4	S4	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
G	S5	S5	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
H	S6	S6	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK

10

Blank : バッファーのみ、S1-S6 : 標準溶液の連続希釈、および UK (未知) : 患者の血清

【 0 1 0 7 】

2 時間後、96 ウェルマイクロタイター E L I S A プレート内の溶液を除去し、プレートを 400 μ l / ウェルの量の洗浄溶液で洗浄した。この場合、洗浄は3回行った。その後、2次抗体 (ピオチン化抗ヒトインターフェロン - モノクローナル抗体 (ATGen Cat# ATGK03)) を希釈溶液で 1 : 500 の比率に希釈し、100 μ l / ウェルの量で分け、その後室温で1時間維持した。その後、プレート内の溶液を除去し、プレートを 400 μ l / ウェルの量の洗浄溶液で3回洗浄した。HRP 結合ストレプトアビジン溶液 (Thermo Scientific, Cat# 21130) を、希釈溶液で 1 : 3000 の比率に希釈し、100 μ l / ウェルの量で分け、その後室温で30分維持した。その後、希釈した HRP 結合ストレプトアビジン溶液を E L I S A プレートに分け、1時間インキュベートした。1時間の培養の後、96 ウェルマイクロタイター E L I S A プレート内の溶液を除去し、プレートを 400 μ l / ウェルの量の洗浄溶液で3回洗浄した。

20

【 0 1 0 8 】

テトラメチルベンジジン (TMB) 1 mg を、ジメチルスルホキシド (DMSO) 1 ml に溶解し、得られた混合液を 0.05 M クエン酸リン酸塩バッファー 9 ml で希釈して基質溶液を調製した。その後、基質溶液を 100 μ l / ウェルの量でプレートに分け、室温で30分間維持した。

30

【 0 1 0 9 】

反応停止溶液 (2 N 希硫酸溶液) を 100 μ l / ウェルの量で分けて反応を停止させ、得られた反応液を E L I S A リーダーを使用して 450 nm で測定した。

【 0 1 1 0 】

8人の正常者からの全血を使用して測定したNK細胞のインターフェロン - 分泌能力を図11に示す。これらの結果は、全血がサイトカインによって刺激されると、血液中に存在する免疫細胞がインターフェロン - の分泌を誘導するために効果的に活性化されることを示す。

40

【 0 1 1 1 】

さらに、8人の正常者からの全血をサイトカインによって刺激した後、全血をフローサイトメトリーに供した。結果を図12に示す。これらの結果から、NK細胞が全血の刺激によって活性化されたときに、NK細胞が細胞毒性を示したことが明らかとなった。CD56はNK細胞のマーカーであり、CD107aはNK細胞が細胞傷害性顆粒を分泌していることを示すマーカーである。図11のインターフェロン - 分泌結果が、図12のNK細胞による細胞傷害性の結果と顕著に相関することから、全血の刺激によるNK細胞のインターフェロン - 分泌能力は、間接的にNK細胞の細胞傷害性を表すことが分かった。

【 0 1 1 2 】

50

本発明によると、がんの罹患または再発は、例えば、がんを患っている、または、がんの疑いのある対象においてin vivo免疫システムにおける変化をモニタリングすること、および、血液中のNK細胞活性を測定することによって診断することができる。そのため、本発明は、対象からの血液試料を使用して、がんの罹患または再発を予測することに有用たり得る。

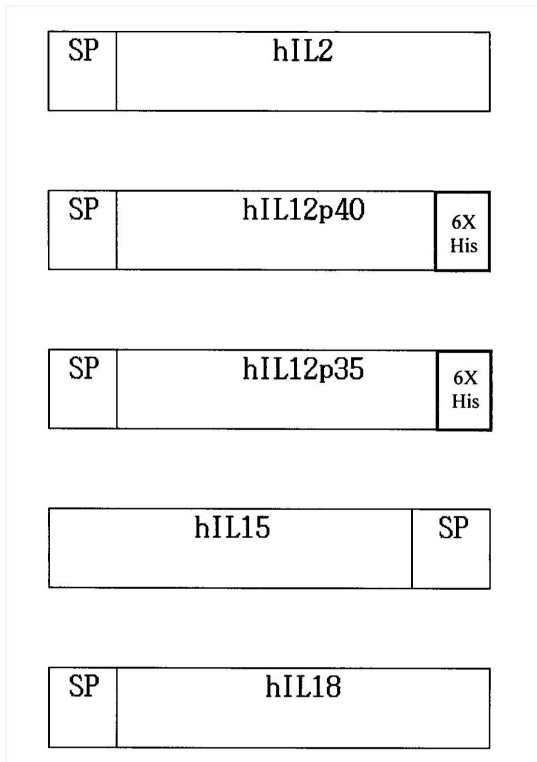
【0113】

本明細書に例示的な態様を開示したが、他のバリエーションが可能であることを理解すべきである。そのようなバリエーションは、本発明の例示的な態様の範囲からの逸脱としてみなされるべきではなく、当業者にとって明らかであるようなすべてのそのような改変は以下の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

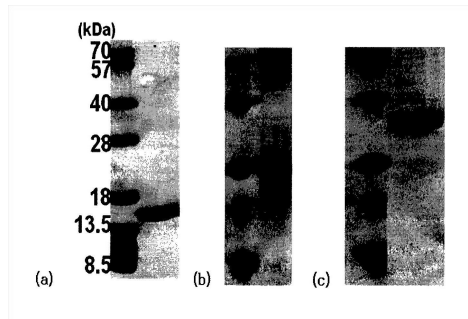
【0114】

本明細書で引用されるすべての文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

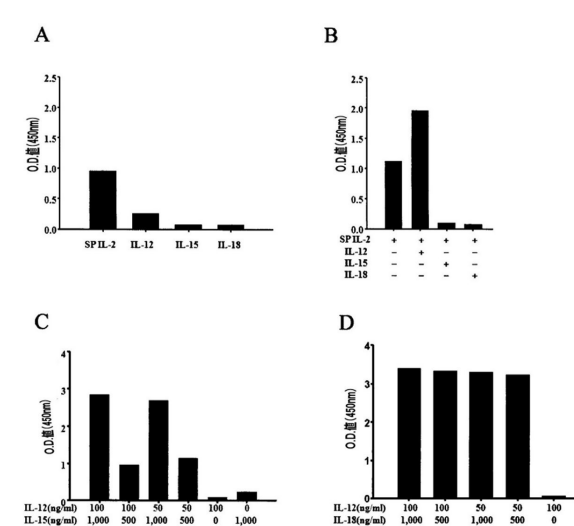
【図1】



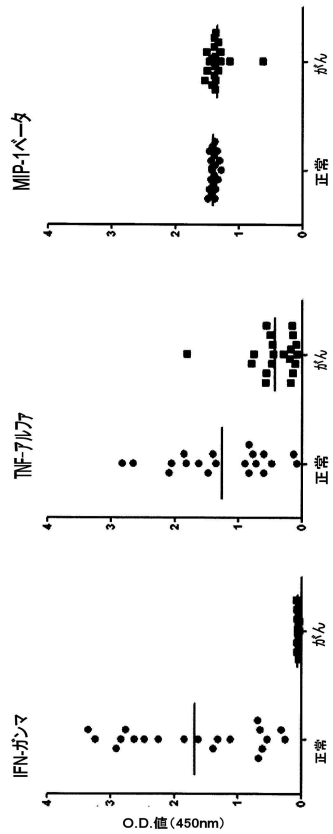
【図2】



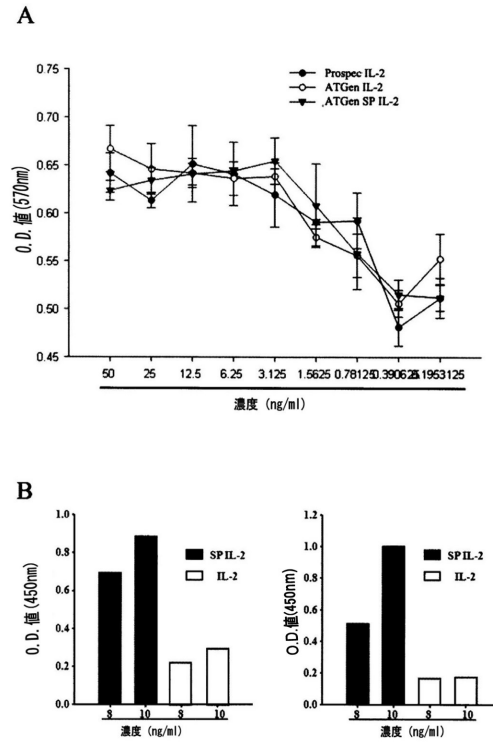
【図3】



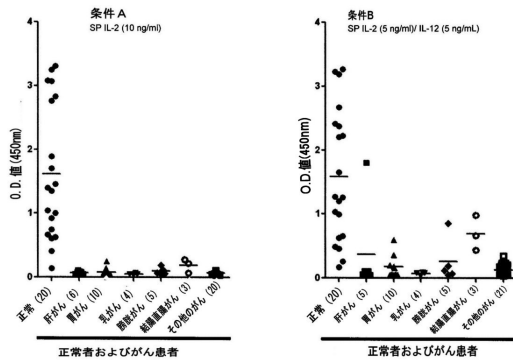
【 図 4 】



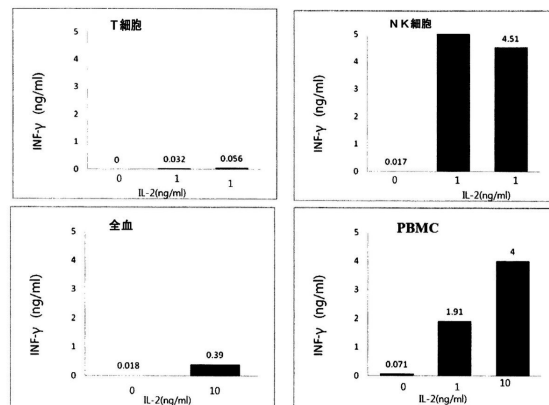
【 図 5 】



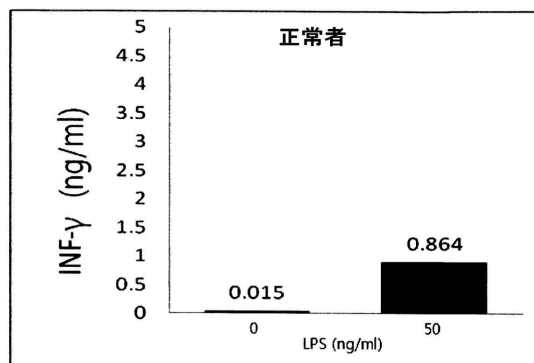
【 図 6 】



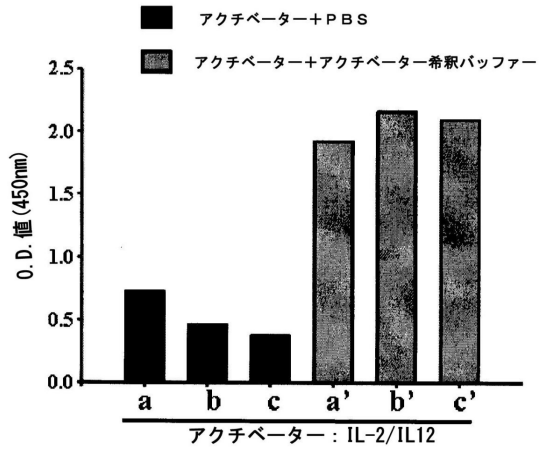
【 図 7 】



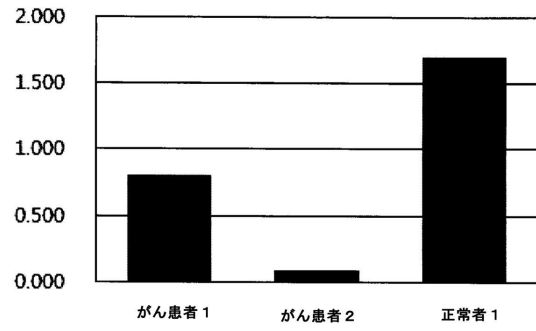
【 図 8 】



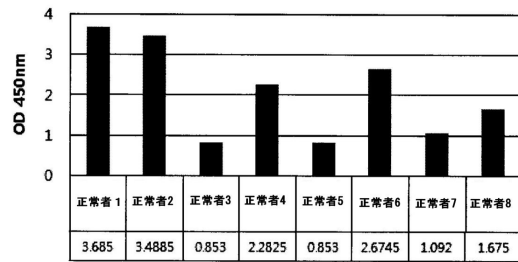
【図9】



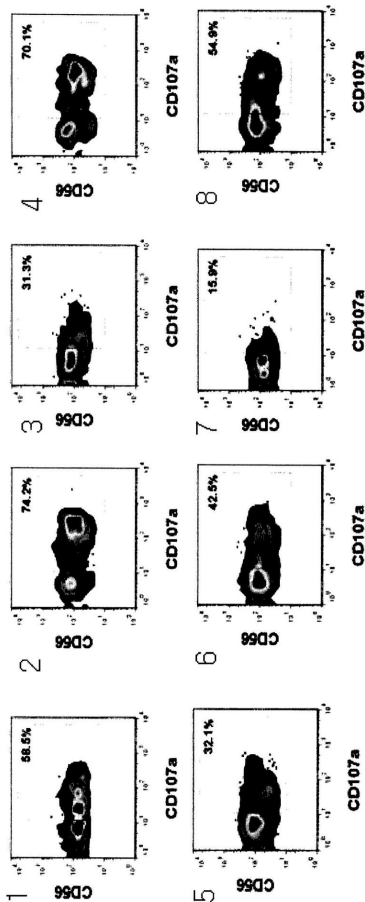
【図10】



【図11】



【図12】



【配列表】

0006629497000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/543 (2006.01) G 0 1 N 33/543 5 0 1 A
 G 0 1 N 33/574 (2006.01) G 0 1 N 33/574 Z

(72)発明者 ユン, ジュ チョン
 大韓民国 138-240 ソウル、ソンパ-グ、シンチョン-ドン、17、パークリオ アパー
 ト、112-2003

(72)発明者 パク, サン ウ
 大韓民国 138-842 ソウル、ソンパ-グ、ソクチョン-ドン、1-1、シンドン-ア、ロ
 ジャンビュー アパート、1003

(72)発明者 キム, ジョン ソン
 大韓民国 158-050 ソウル、ヤンチョン-グ、モク6-ドン、モクドン アパート、12
 3-1206

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 中島 庸子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0203010号明細書
 国際公開第2006/110577号
 Current Protocols in Immunology, 2010年, UNIT
 7.39.1-7.39.17
 Journal of Immunological Methods, 2009年, Vol.
 341, p.154-164
 The Journal of Clinical Investigation, 2002年
 , Vol.110, No.7, p.983-992
 Journal of Leukocyte Biology, 2008年, Vol.83, p.
 .774-784
 The Journal of Immunology, 2001年, Vol.167, No.
 1, p.497-504

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12Q 1/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/WPIDS/BIOSIS/MEDLINE(STN)

GeneSeq/UniProt

专利名称(译)	使用nk细胞活性的诊断方法和诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP6629497B2	公开(公告)日	2020-01-15
申请号	JP2013553044	申请日	2012-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	81 - 仁有限公司 埃特根有限公司		
申请(专利权)人(译)	81 - 仁有限公司		
[标]发明人	イジェミヨン ユンジュチョン パクサンウ キムジョンソン		
发明人	イ,ジェ ミヨン ユン,ジュ チョン パク,サン ウ キム,ジョン ソン		
IPC分类号	C12Q1/02 C07K14/47 C07K14/54 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	C07K14/47 C07K14/54 C07K14/5434 C07K14/5443 C07K14/55 C07K2319/00 C07K2319/21 G01N33/574 G01N33/6866 G01N2800/54 G01N33/53		
FI分类号	C12Q1/02 C07K14/47 C07K14/54 C07K19/00 G01N33/53.P G01N33/543.501.A G01N33/574.Z		
优先权	1020110012983 2011-02-14 KR		
其他公开文献	JP2014510517A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供用于诊断癌症的方法，诊断试剂盒和可用于测量NK细胞活性的组合。癌症的发生率可以通过测量血液中NK细胞活性来监测体内免疫系统的变化来诊断。因此，如本文所述，使用来自受试者的血液样品可以容易地预测癌症的发病率。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6629497号 (P6629497)
(45) 発行日 令和2年1月15日 (2020.1.15)	(24) 登録日 令和1年12月13日 (2019.12.13)	
(51) Int. Cl. F I		
C 1 2 Q 1 / 0 2 (2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 0 2	
C 0 7 K 1 4 / 4 7 (2006. 01)	C 0 7 K 1 4 / 4 7	
C 0 7 K 1 4 / 5 4 (2006. 01)	C 0 7 K 1 4 / 5 4	
C 0 7 K 1 9 / 0 0 (2006. 01)	C 0 7 K 1 9 / 0 0	
G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2006. 01)	G 0 1 N 3 3 / 5 3	
請求項の数 17 (全 24 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特許2013-553044 (P2013-553044)	(73) 特許権者 513205259 エヌケーマックス カンパニー リミテッド NKMAX CO., Ltd. 大韓民国 13605 キョンギードソ ンナム-シ、プンダン-グ、ドルマ-ロ 172、エヌエヌエーエイチ エイチアイ ビー Gエフ	
(86) (22) 出願日 平成24年2月10日 (2012.2.10)	(74) 代理人 100102842 弁理士 葛和 清司 イ,ジェ ミヨン	
(65) 公表番号 特表2014-510517 (P2014-510517A)	(72) 発明者 大韓民国 140-744 ソウル、ヨン サン-グ、イチョン 1-ドン、コロ ン アバート、104-1902	
(43) 公表日 平成26年5月1日 (2014.5.1)		
(88) 国際出願番号 PCT/182012/000259		
(87) 国際公開番号 W02012/110878		
(87) 国際公開日 平成24年8月23日 (2012.8.23)		
審査請求日 平成27年2月10日 (2015.2.10)		
審判番号 不服2017-4516 (P2017-4516/11)		
審判請求日 平成29年3月31日 (2017.3.31)		
(31) 優先権主張番号 10-2011-0012983		
(32) 優先日 平成23年2月14日 (2011.2.14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 がんを診断する方法およびNK細胞活性の測定を使用した診断キット		