

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4776845号
(P4776845)

(45) 発行日 平成23年9月21日(2011.9.21)

(24) 登録日 平成23年7月8日(2011.7.8)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
 G O 1 N 33/53 (2006.01)
 G O 1 N 33/577 (2006.01)
 C O 7 K 16/28 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02
 G O 1 N 33/53 Y
 G O 1 N 33/577 B
 C O 7 K 16/28
 C 1 2 P 21/08

請求項の数 21 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-538509 (P2001-538509)
 (86) (22) 出願日 平成12年11月15日(2000.11.15)
 (65) 公表番号 特表2003-523735 (P2003-523735A)
 (43) 公表日 平成15年8月12日(2003.8.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2000/011697
 (87) 国際公開番号 W02001/036630
 (87) 国際公開日 平成13年5月25日(2001.5.25)
 審査請求日 平成19年11月15日(2007.11.15)
 (31) 優先権主張番号 09/440,514
 (32) 優先日 平成11年11月15日(1999.11.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 2,288,307
 (32) 優先日 平成11年11月15日(1999.11.15)
 (33) 優先権主張国 カナダ(CA)

(73) 特許権者 502174298
 アンナート ファルマ エス. ア. エス.
 I N N A T E P H A R M A S . A . S
 .
 フランス国 エフー13009 マルセイ
 ユ アンシャン シェマン ド カシ イ
 ムモブル グラン プレ 121
 (73) 特許権者 502174302
 ウニヴェルシタ ディ ジェノヴァ
 U N I V E R S I T A D I G E N O V
 A
 イタリア国 イー16132 ジェノヴァ
 ヴィア エッレ. ピ. アルベルティ
 2

微生物の受託番号 CNCM I-2576

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトナチュラルキラー細胞によって媒介される天然細胞毒性に関連した新規トリガリングレセプターおよび同一の性質を有する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的サンプル中のNK細胞の存在を検出かつ／または定量化する方法において、
配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体と生物学的サンプルとを接触させ、

前記接触により形成される免疫複合体を検出しかつ／または定量化することを含むことを特徴とする、生物学的サンプル中のNK細胞の存在を検出しかつ／または定量化する方法。

【請求項2】

生物学的サンプルからNK細胞を検出するためのキットにおいて、
配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体を含み、
前記単離された抗体がコンテナ中に封入されている
 ことを特徴とする、生物学的サンプルからNK細胞を検出するためのキット。

【請求項3】

生物学的サンプルからNK細胞を選択的に除去するための方法において、
配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体と生物学的サンプルとを接触させ、

前記接触により形成される免疫複合体を前記生物学的サンプルから除去することを含むことを特徴とする、生物学的サンプルからNK細胞を選択的に除去するための方法。

【請求項 4】

生物学的サンプルからNK細胞をポジティブかつ選択的に精製するための精製方法において、

配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体と生物学的サンプルとを接触させ、

前記接触により形成される免疫複合体から細胞を回復する

ことを含むことを特徴とする、生物学的サンプルからNK細胞をポジティブかつ選択的に精製するための精製方法。

【請求項 5】

生物学的サンプルからNK細胞を除去しかつ／またはポジティブに精製するためのキットにおいて、

配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体を含み、前記単離された抗体がコンテナ中に封入されている

ことを特徴とする、生物学的サンプルからNK細胞を除去しかつ／またはポジティブに精製するためのキット。

【請求項 6】

NK細胞の細胞毒性をin vitroで刺激するための刺激方法において、

生理学的条件下にin vitroで、配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体と、前記NK細胞とを接触させる

ことを含むことを特徴とする、NK細胞の細胞毒性をin vitroで刺激するための刺激方法。

【請求項 7】

NK細胞の細胞毒性を刺激するためのキットにおいて、

配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体を含み、前記単離された抗体がコンテナ中に封入されている

ことを特徴とする、NK細胞の細胞毒性を刺激するためのキット。

【請求項 8】

抗NKp46抗体および抗NKp44抗体から成る群より選択される抗体をさらに含有することを特徴とする、請求項2、5及び7のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 9】

移植の改善、GvHの阻害、または、GvTおよびGvLの刺激を意図することを特徴とする、請求項2、5、7及び8のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 10】

NK細胞の細胞毒性のin vitro阻害のための方法において、

生理学的条件下にin vitroで、配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体とNK細胞とを接触させる

ことを含むことを特徴とする、NK細胞の細胞毒性のin vitro阻害のための方法。

【請求項 11】

NK細胞の細胞毒性を阻害するためのキットにおいて、

配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体を含有する

ことを特徴とする、NK細胞の細胞毒性を阻害するためのキット。

【請求項 12】

該単離された抗体は、標的細胞の存在下に、標的細胞と1：1の割合で置かれたNK細胞によって引き起こされる天然細胞毒性の、少なくとも5倍の毒性の増加を誘導できることを特徴とする、請求項6に記載の方法。

【請求項 13】

該単離された抗体は、標的細胞の存在下に、標的細胞と1：1の割合で置かれたNK細胞によって引き起こされる天然細胞毒性の、少なくとも5倍の毒性の増加を誘導できる

10

20

30

40

50

ことを特徴とする、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 14】

該単離された抗体は、NK 細胞により誘導される天然細胞毒性を阻害することを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

該単離された抗体は、NK 細胞により誘導される天然細胞毒性を阻害することを特徴とする、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 16】

該単離された抗体は、NK p 30 結合部位をマスキングすることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 17】

該単離された抗体は、NK p 30 結合部位をマスキングすることを特徴とする、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 18】

該単離された抗体は、NK 細胞により発現される NK p 30 レセプターの架橋を阻害することを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

該単離された抗体は、NK 細胞により発現される NK p 30 レセプターの架橋を阻害することを特徴とする、請求項 15 に記載のキット。

20

【請求項 20】

前記配列番号：4 のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体は、ハイブリドーマ I-2576 (C. N. C. M. インスティテュート パスツール、パリ、フランス) から生産される単離されたモノクローナル抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合することを特徴とする、請求項 1、3、4、6、10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記配列番号：4 のアミノ酸配列を有するポリペプチドと結合する単離された抗体は、ハイブリドーマ I-2576 (C. N. C. M. インスティテュート パスツール、パリ、フランス) から生産される単離されたモノクローナル抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合することを特徴とする、請求項 2、5、7、8、9、11 のいずれか一項に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、全ての成熟 NK 細胞により選択的に発現され、活性化レセプターとしてヒトの天然細胞毒性に関する、NK p 30 と呼称される新規化合物、NK p 30 構造体に結合する新規抗体、およびその薬剤および医薬品としての使用に関する。

【0002】

(発明の背景)

ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) は、免疫監視により腫瘍細胞またはウイルス感染細胞を除去する効果的なエフェクターのメカニズムを提供する。NK 細胞のよく知られた特徴は、標的細胞を溶解し、MHC クラス I 分子の発現を不十分にする能力である。この認識は、NK 細胞により発現される様々な阻害レセプターの定義付けの基礎となっている。標的細胞上に発現した MHC クラス I 分子と結合すると、これらのレセプターが細胞溶解機能をダウンレギュレートする阻害シグナルを発する。ヒトでは、HLA クラス I 分子の認識は 2 種類のレセプターで媒介される：これらはリガンドが HLA-A、-B および -C 対立遺伝子、および HLA-E 分子を認識する レクチン様 CD94/NKG2A レセプター複合体の種々の群により表される KIR および LIR-1/ILT-2 タンパ

40

50

ク質の両方を含む I g スーパーファミリーに属する。これらの阻害レセプターの発現は、NK細胞がHLA-A欠乏細胞と正常細胞とをいかに区別できるかを説明する。他方で、天然細胞毒性のトリガリングに応答可能なNK細胞の活性化について記載した情報には限りがある。ごく最近、HLA-クラスI欠乏標的細胞の認識および殺傷を介してNK細胞中で重要な役割を果たす、2種の別個のNK-特異的レセプターが同定された。これらのレセプターは、NKp46およびNKp44と呼称され、I g スーパーファミリーに属する。特異的mAbによって誘引されるこれらの架橋は、強いNK細胞活性化を誘導し、その結果、細胞内Ca⁺⁺レベルが上昇し、細胞毒性が引き起こされ、リンホカインが放出される。重要であるのは、mAb-媒介性のNKp46および／またはNKp44のマスキングが、全てではないがほとんどの標的細胞に対するNK細胞毒性を阻害することである。このことは、天然細胞毒性においてNKp46およびNKp44が中心的役割を果たすことが明らかにされている反面、他のレセプターが存在することを意味している。

10

【0003】

(発明の概要)

本発明の課題は、標的細胞の認識および殺傷に関する、NK細胞中に含まれる新規トリガリングレセプターを同定することである。SDS-PAGEから約30kDであるこの新規レセプターはNKp30と呼称され、単一のV-タイプドメイン、膜貫通部位での荷電残基、および細胞質尾中のITAMモチーフの不在により特徴付けられるI g スーパーファミリーの一員である。EMBL/Genbank/DBJデータベースを検索すると、クローン化NKp30cDNAが、以前に同定された任意選択的なスプライシング形の1C7遺伝子(寄託番号AF031138で入手可能)と一致することが分かった。しかし、これまで、特異的モノクローナル抗体がないので、1C7遺伝子の推定生成物の機能も表面分布も確認できなかった。NKp30はヒト成熟NK細胞の表面上に選択的に発現し、細胞活性化時にチロシンホスホリル化されるCD3ζシグナル伝達ペプチドに関連する。WO99/23867には、新規なトリガリングレセプターをコードするが、異なる生物学的活性のタンパク質、すなわち、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ファミリーのメンバーであるタンパク質としてのBMOGをコードする配列と相同性を有するヌクレオチド配列が開示されている。WO95/06247には、NK細胞に特異的であるが、PEN5-α及びPEN5-βに対する糖タンパク質からなる分子が開示されている。EMBLデータベース 01. Sept. 1999 アクセッションNo. AJ223153は、配列番号:1に特異的に相当するヌクレオチド配列のみを開示しており、SWISSPROTデータベース 01. Jan. 1998 アクセッションNo. 014932は、配列番号:2に特異的に相当するアミノ酸配列のみを開示している。AcNKp30は、多くの標的細胞に対するNK-媒介細胞毒性誘導時にNKp46および／またはNKp44といっしょに働くことができ、したがって標的細胞(例えばMEL15タイプのヒトメラノーマ)の殺傷時の主要トリガリングレセプターである。

20

30

【0004】

本発明の別の課題は、NKp30構造体と選択的に結合する抗体を提供することである。抗体-媒介性のNKp30の架橋はNK細胞の活性化を強力に誘導するのに対し、抗体-媒介性NKp30マスキングはNKの天然細胞毒性を阻害する。以下の「実施例」の項目のAZ20に参照されるようなモノクローナル抗体を生じるハイブリドーマは2000年11月8日にC. N. C. M.へ寄託されている(C. N. C. M. Institut Pasteur; 25, rue du Docteur Roux; F-75724 Paris Cedex 15; France)。

40

【0005】

本発明はしたがって、NK細胞のポジティブ精製およびNK細胞の天然細胞毒性の制御に有用なツールを提供する。本発明のツールは、特に同種異系の移植片/宿主反応または外科移植/宿主反応の制御(移植または外科移植の改善、移植片対宿主GvHだけでなく移植片対腫瘍GvTまたは移植片対白血球GvL)、および腫瘍細胞、微生物-感染またはウイルス感染細胞等の異常細胞の増殖の制御に役立つ。

50

【0006】

(発明の詳細な説明)

本発明は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、その任意の免疫原性フラグメントのアミノ酸配列、および配列番号：7配列から成る群より選択されるアミノ酸配列に対して、全長が少なくとも80%相同な少なくとも1種のアミノ酸配列を含有する、任意の単離された化合物に関する。

【0007】

これらの化合物のうち、前記群から選択されるアミノ酸配列に対して、全長が少なくとも90%相同な少なくとも1種のアミノ酸配列を有する化合物が有利であり、中でも少なくとも95%の前記相同性を有するものが特に有利である。さらに、少なくとも97%の前記相同性を有するものがより有利であり、中でも少なくとも98%および99%の前記相同性を有するものが非常に有利であり、特に少なくとも99%の前記相同性を有するものが好ましい。

【0008】

「相同性」は、従来技術において公知であるように、2種類以上のポリペプチド配列、または場合により2種類以上のポリヌクレオチド配列間の関係であり、配列を比較することにより判断される。従来技術において「相同性」は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列相関の度合いをも意味し、この際、このような一連の配列間の一致により判断される。「相同性」は、公知の方法によって簡単に算出でき、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988に記載される方法も含むがこれに限定はしない。相同性を決定する方法は、試験配列間で最大の一致を与えるように設定される。さらに、相同性を決定する方法は、公共使用可能なコンピュータープログラム、例えばGCGプログラムパッケージのGAPプログラム(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387(1984))、BLAST、BLASTN(Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403~410(1990))、およびFASTA(Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444~2448(1988))で体系化される。

【0009】

配列番号：2は、ヒトNKp30 190aaポリペプチド(SDS-PAGEにより約30kD)に関し、これはNK細胞、特に成熟NK細胞により選択的に発現され、配列番号：4はヒトNKp30レセプターの細胞外領域に関し、配列番号：5はヒトNKp30レセプターの膜貫通領域に関し、配列番号：6はヒトNKp30レセプターの細胞質尾に関し、配列番号：7は配列番号：2由来の15aa免疫原性ペプチドに関する。本発明はまた前記ポリペプチドのバリエーション、すなわち保存アミノ酸置換によるものとは異なり、残基が同様の特性を有する別のものでも置換されているポリペプチドをも含有する。このような置換で典型的なのは、Ala、Val、LeuおよびIle間；SerおよびThr間；酸性残基AspおよびGlu間；AsnおよびGln間；塩基性残基LysおよびArg間；または芳香族残基PheおよびTyr間である。より一般的に保存バリエーションは、NK細胞によりレセプターの適当な位置に発現される場合、レセプターのトリガリングとしてなお機能できる。これらの化合物をここでは「本発明のaa化合物」と称す。

【0010】

本発明は以下のものを含有する単離された化合物も提供する：

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、その任意の免疫原性フラグメントのアミノ酸配列、配列番号：7配列から成る群より選択されるアミノ酸配列に対して、全長の少なくとも80%相同である少なくとも1種のアミノ酸配列(有利に、この少なくとも1種のアミノ酸配列は、群から選択されるアミノ酸配列に対して、全長が100%相同である)、さらに少なくとも1つのCD3ζ鎖を含有する。

【0011】

「免疫原性フラグメント」は、ここで免疫応答を引き出すことのできる任意のポリペプチドまたはペプチドフラグメントを意味し、免疫応答とは例えば (i) 前記フラグメントと結合する抗体および／または膜レセプターおよびその突然変異体を含む、前記フラグメントを含有するNKp30分子の任意の形と結合する抗体の生成、(ii) T細胞が、任意のMHC分子と前記フラグメントに由来するペプチドとを含む二分子複合体と反応することによるT細胞応答の刺激、(iii) ほ乳類イムノグロブリンをコードする遺伝子を発現したバクテリオファージまたはバクテリアのような形質移入媒体の結合等である。さらに、免疫原性フラグメントは、先に定義したような免疫応答を引き出すことのできる任意の構造体をも意味し、例えば共有結合によりキャリアタンパク質へ結合した前記ペプチドフラグメント、そのaa配列中で前記ペプチドフラグメントを含有するキメラ組み換えポリペプチド構造体、特に配列が前記フラグメントをコードするタンパク質を含む、cDNAで形質移入された細胞が含まれる。

10

【0012】

本発明はまた、配列番号：1、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：13ポリヌクレオチド配列、および普遍的な遺伝子暗号をコードしかつその重複性を考慮したポリヌクレオチド配列、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6の配列、配列番号：2、配列番号：5および配列番号：6配列の任意の免疫原性フラグメントのアミノ酸配列、および配列番号：17配列から成る群より選択されるポリヌクレオチド配列に対して、全長が少なくとも80%相同である少なくとも1種のポリヌクレオチド配列を含有する、任意の単離された化合物に関する。これらの化合物のうち、前記群より選択されたポリヌクレオチド配列に対して全長が少なくとも90%相同なものが好ましく、前記相同性が少なくとも95%のものが特に好ましい。さらに、前記相同性が少なくとも97%のものがより好ましく、中でも前記相同性が少なくとも98%および少なくとも99%のものが特に好ましく、さらに前記相同性が少なくとも99%のものが非常に好ましい。好ましい形態は、配列番号：1、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：13のDNAによってコードされた成熟ポリペプチドと同様の生物学的機能または活性を十分に保持したポリペプチドをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチド配列を含有する、単離された化合物である。本発明の好ましい形態は、ストリンジェントな条件下に前記の単離された化合物とハイブリダイズする少なくとも1種のポリヌクレオチドを含有する化合物である。このようなハイブリダイズするヌクレオチドには、特に、配列番号：1、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：13のポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの群が含まれる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の特別な例は、以下のものを含有する溶液中の42℃での一晚のインキュベーション：50%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt's溶液、10%硫酸デキストラン、および変性し、切断したサケの精子DNA20マイクログラム/ml、その後のハイブリダイゼーション支持体の0.1×SSC中の約65℃での洗浄である。ハイブリダイゼーションと洗浄の条件は公知であり、Sambrook, et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989)の特に11章に例示されている。液体ハイブリダイゼーションも本発明のポリヌクレオチド配列に使用してよい。本発明はまた、人だけでなくほ乳類の任意の種、特にサル、ラット、マウス、イヌ、ウシ、ウサギで発現するNKp30バリエーションを包含する。実際このようなバリエーションは、種間で高く保存されて現れる。本発明は、A等の非荷電残基でR残基が置換されている膜貫通ドメインの部分的突然変異などの、NKp30非機能性突然変異も包括する。これらの化合物をここで「本発明のpln化合物」と称する。

20

30

40

【0013】

配列番号：1はヒトNKp30cDNA(約1kbのmRNA)に関し、配列番号：10は421bpのNKp30cDNAプローブ(配列番号：1の位置57～位置477)に

50

関し、配列番号：12は606bpのNKp30cDNA増幅生成物（配列番号：1の位置57～位置662）に関し、配列番号：13は配列番号：1の位置64～位置636の配列をコードするNKp30に関する。ここでポリヌクレオチドとは、オリゴヌクレオチドおよびDNA、ゲノムDNA、RNA、tRNA、mRNA、およびcDNAを含む任意のポリヌクレオチド素質に相当するものを意味する。本発明は、前記ポリヌクレオチド生成物から成る群より選択される少なくとも1種の単離された化合物を有する形質移入ベクター、およびこのような単離された化合物の少なくとも1種でまたは前記ベクターの少なくとも1種で形質移入された細胞をも提供する。

【0014】

本発明は、（配列番号：8；配列番号：9）対、（配列番号：8；配列番号：11）対、配列番号：10ポリヌクレオチド、配列番号：12ポリヌクレオチドから成る群より選択されるポリヌクレオチド化合物にも関する。このような化合物は特にサンプル中でのNKp30検出に有用である。（配列番号：8；配列番号：9）および（配列番号：8；配列番号：11）等の対は、例えば上向および下向PCRプライマー対として使用できる。配列番号：10および配列番号：12ポリヌクレオチド等のポリヌクレオチドは、NKp30プローブとして使用できる。配列番号：10配列は、配列番号：1プローブに由来する421bpのcDNAに相当する（配列番号：1の位置57～位置477）；これを例えば、生物学的サンプル中でNKp30遺伝子を同定および単離するためのNKp30プローブとして使用してよい。さらにこのNKp30遺伝子はほ乳動物種間で高く保存されて発現する。配列番号：12は配列番号：1に由来する606bpのcDNAに相当する（配列番号：1の位置57～位置662）；これは配列番号：8および配列番号：11プライマー対を用いたPCR増幅を介して得られる生成物に相当する。

【0015】

別の態様として、本発明は本発明の単離されたaa化合物（すなわちアミノ酸配列を含有するとして定義された本発明の任意の化合物、すなわち請求項1で定義したもの）の少なくとも1種では乳動物を免疫化し（ここで少なくとも1種のaa化合物は任意選択的に免疫原性エンハンサーと結合する）、これにより形成された抗血清を回収することにより得られるような抗血清タイプの組成物を提供する。

【0016】

本発明はまた、抗体-抗原タイプの少なくとも1種の本発明の単離されたaa化合物の反応中で確認できる、単離された化合物（ここで「本発明の単離された抗体-抗原タイプ化合物」と称す）、および単離された抗体、および本発明のaa化合物の少なくとも1種に直接対する単離されたモノクローナル抗体を提供する。

【0017】

本発明はさらに、本発明のaa化合物の少なくとも1種に直接対しかつT細胞表面分子だけでなく任意のB細胞表面分子にも結合しない、任意の単離された抗体に関する。好ましい抗体は単球、顆粒球に結合せず、好ましくはNK細胞以外の末梢血液由来の有核細胞と結合しない。最も好ましい単離された抗体は、任意のNKp46またはNKp44の細胞外部だけでなく、任意の別のNK細胞の細胞外部にも結合しない。

【0018】

このような結合反応は、ここで、抗体-抗原タイプ認識反応等に好適な実験条件下での抗体-抗原タイプの反応中に見出される結合反応を意味する。例えば末梢血液由来の白血球懸濁液を抗体と接触させ、それにより形成される免疫複合体を検出することにより、例えば蛍光ラベルを施した二次抗-イムノグロブリン試薬と接触させ、Beckman-CoulterXL等のフローサイトメーターを用いて抗体と結合した細胞を計数同定することにより、このような結合反応を達成できる。この実験で種々の白血球サブセットの同定は、様々な細胞サブセットの大きさおよび光学特性に基づく。また、前記したような抗体

との接触後に、同一の白血球懸濁液を、T細胞に特異的に結合するCD3抗体UCHT-1のような白血球サブセットへ特異的に結合する蛍光色素-結合抗体と接触させてよく、これにより目的の抗体と結合した白血球サブセットの表現型決定を行うことができる。前記した幾つかの2重標識実験を、サブセット-特異的抗体パネルを使用して実施し、目的の抗体の細胞反応性を明確に描写できるようにする。

【0019】

本発明の好ましい抗体は、(i) MHCクラスIネガティブ標的、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、同種異系細胞に対する天然細胞毒性、(ii) 抗体-被覆標的細胞に対する細胞毒性、(iii) 細胞質内Ca²⁺濃度の増加、(iv) ZAP70、Syk、LAT、SLP76、Shc、Grb2、ホスホリパーゼC-ガンマ酵素、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ等の細胞質アダプター/エフェクター分子のチロシンホスホリル化の誘導、(v) レセプター関連形質導入鎖KARAP/DAP12またはCD3ゼータまたはFcRガンマのホスホリル化、(vi) インターフェロンガンマ、腫瘍壊死因子、IL5、IL10、ケモカイン(例えばMIP-1アルファ)、TGFベータ等のサイトカイン分泌、(vii) NK細胞表面分子、例えばCD69およびPEN5それぞれのアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションから推定されるように、NK細胞活性化を統計的に顕著に増加させる(p<0.05)。

【0020】

本発明の好ましい単離された抗体の例には、本発明の単離されたaa化合物の少なくとも1種に直接対し、かつ標的細胞の存在下に1:1の割合で存在するNK細胞によって引き起こされる天然細胞毒性を少なくとも約4倍、好ましくは少なくとも約5倍、より好ましくは少なくとも約6倍に増加させることが可能な単離された抗体が含まれる。

【0021】

本発明の最も好ましい単離された抗体は、本発明の単離されたaa化合物の少なくとも1種と直接対し、任意のTまたはB細胞表面分子とは結合せず、標的細胞の存在下に1:1の割合で存在するNK細胞により引き起こされる天然細胞毒性を少なくとも約4倍、好ましくは少なくとも約5倍、より好ましくは少なくとも約6倍に増加させることができる。

【0022】

本発明の最も好ましい単離された抗体には、モノクローナル抗体が含まれる。このようなモノクローナル抗体の幾つかの例は、以下の「実施例」の項目に記載されている(例えばAZ20; A76; Z25モノクローナル抗体参照)。本発明のAZ20モノクローナル抗体を生じるハイブリドーマは、C. N. C. M. へ2000年11月8日付けで寄託されている(C. N. C. M. Collection Nationale de Microorganismes; Institut Pasteur; 25 rue du Docteur Roux; F-75724 Paris Cedex 15; France): C. N. C. M. 寄託番号はI-2576である。本発明はしたがって、ハイブリドーマI-2576により製造される単離されたモノクローナル抗体に関する。

【0023】

本発明の任意の単離された抗体は、視覚化の目的で適当な任意の標識と結合してよい。このような標識には、例えば蛍光標識、放射線標識、酵素標識が含まれる。

【0024】

本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体を生じる任意のハイブリドーマに関する。

【0025】

本発明のモノクローナル抗体は、連続した細胞系の培養により抗体分子を製造するための任意の技術を利用して製造できる。これらの技術には、Kohler and Milsteinオリジナルの技術、Nature、265:495~497(1975)、Anderson et alに記載される変法、J. Immunol.、143:1899(1989)が含まれるが、これに限定するものではなく、その内容は参照することによりここに組み込まれたものとする。免疫原として、本発明の任意のaa化合物が適当である。

【0026】

NK p 30に対する抗体を製造するハイブリドーマ細胞をスクリーニングするために使用できるスクリーニング法には(1)固相酵素免疫測定法(ELISA)、(2)免疫沈降法または(3)蛍光表示式細胞分取(FACS)分析が含まれるが、これに限定するものではない。当業者は、抗-NK p 30モノクローナル抗体をスクリーニングするために使用できる多くの様々なELISA法を想定できる。

【0027】

最初のスクリーニングは、そのNK細胞に対するがT細胞および単球に対ししない反応性に関してフローサイトメトリーによりハイブリドーマ上清をスクリーニングすることにより、実施されるのが好ましい。ハイブリドーマの別の特徴付けを、実施例に詳細する間接免疫蛍光アッセイおよびフローサイトメトリーによりリンパ系および非リンパ系細胞の精製集団を試験することにより実施できる。NK p 30エピトープを認識するモノクローナル抗体は、細胞の少なくとも約70~90%、例えば約80%の高率でNK細胞上に存在するエピトープと反応するが、CD3⁺T細胞またはCD20⁺B細胞とは十分に反応しない。好ましい形態において、抗体は単球、顆粒球、血小板および赤血球と非反応性である。

10

【0028】

当業者に公知の競合アッセイでこのような抗体と競合するモノクローナル抗体は、基本的に同一のエピトープを認識するようである。

【0029】

所望のハイブリドーマを選択、クローン化して得られた抗体は、2種類の主要な方法のうちの1種で製造されてよい。最も純度の高いモノクローナル抗体は、所望のハイブリドーマを好ましい培地中で適した時間長さ*in vitro*培養することにより製造され、その後、沈殿物の所望の抗体を回収した。時間長さおよび培地は公知であるか容易に決定できる。*in vitro*技術は、本質的に単一特異性モノクローナル抗体を生成し、実質的に他種抗-ヒトイムノグロブリンを含まない。しかし、生成される抗体の量がわずかに約50 μg/mlであるので、*in vitro*法ではある目的に対して十分量または十分濃度の抗体が製造されない。

20

【0030】

より多くの量のモノクローナル抗体を製造するために、所望のハイブリドーマをマウス等の動物へ接種してよい。

30

【0031】

好ましくは、マウスはモノクローナル抗体酸性ハイブリドーマが獲られた株と同系または半同系である。ハイブリドーマの接種は、適当なインキュベーション時間後に抗体産生腫瘍の形成を誘導し、その結果、所望の抗体が宿主動物の腹水中に高濃度で得られる(約5~20 mg/ml)。

【0032】

抗体分子は公知技術、例えば免疫吸収またはイムノアフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等のクロマトグラフィー法、またはそれらの組合せにより精製できる。

40

【0033】

これらのプロトコールに続き、この技術分野の当業者は、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、特にNK p 30に特異性を示すモノクローナル抗体を容易に単離できる。このようなハイブリドーマの例は、以下の「実施例」に記載され、記載のAZ20モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは2000年11月8日にC. N. C. M. に寄託された(C. N. C. M. 寄託番号: I-2576)。したがって、本発明はこのような任意のハイブリドーマ、およびその上清から得られる任意のモノクローナル抗体を包括すると考えられる。特に本発明は、所望の抗-NK p 30特性を示す任意のモノクローナル抗体、および特に以下による任意のモノクローナル抗体を包括する:

(i) 配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 5、配列番号: 6、その任意の免疫原性

50

フラグメントのアミノ酸配列、配列番号：17配列から成る群より選択されるアミノ酸配列に対して、全長が少なくとも80%相同である少なくとも1種のアミノ酸配列を有するaa化合物に対して動物を免疫化し、

(ii) 該動物の脾臓細胞からハイブリドーマを産生し、培養上清中にモノクローナル抗体を生成するために培養し、

(iii) 免疫原としてステップ(i)で使用したaa化合物に結合する抗体の存在を調べるために上清を測定し、

(iv) 所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択およびクローニングし、

(v) 前記クローンの上清からモノクローナル抗体を回収する。

【0034】

この方法の後、特に配列番号：17を免疫原としてステップ(i)で使用した場合、所望のハイブリドーマ数種を非常に高い見込みで連続して製造することができる。クローン化されたハイブリドーマは、所望のように、例えばNK細胞以外の末梢血液由来の任意の細胞と結合せず、かつ／または標的細胞の存在下に1:1の割合で存在するNK細胞によって引き起こされる天然細胞毒性を少なくとも5倍増加させることを含む、任意の所望の特性に応じて、さらにスクリーニングされかつ選択される。

【0035】

別の態様において、本発明は本発明の単離された抗体およびモノクローナル抗体から成る群より選択される任意の抗体の、単離された免疫反応性フラグメントに関する。このようなフラグメントには、特に、Fab、F(ab')₂およびCDR抗体フラグメントが含まれる。当業者は、特にヒトへ投与する目的で、所望に応じてそれらから本発明のヒトに使用可能な抗体を誘導できることを認識している。「抗体の免疫反応性フラグメント」とは、ここで特に抗原結合部位を有する任意の抗体フラグメントを意味する。したがってこのようなフラグメントには、当業者が公知のように、ペプシンまたはパパイニン等のタンパク分解酵素により前記抗体を酵素切断することによって得られるF(ab')₂フラグメントおよびヒンジ領域に位置するスルフヒドリル基の還元によりそこから誘導されるFabフラグメントが含まれる。免疫反応性フラグメントは、その配列が目的の抗体のCDR領域を含有する組み換え単鎖または二本鎖ポリペプチドを含んでよい。単離されたCDR領域自体も本発明の単離された免疫反応性フラグメントの定義の範疇であると考えられる。

【0036】

別の態様において、本発明は本発明の単離された抗体または免疫反応性フラグメントを少なくとも1種結合させた任意の固体支持体に関する。前記結合が成された任意の固体支持体が適当である。特に適当な固体支持体には、Dynal a.s.のDynabeads (Oslo, Norway)等の親和性マトリクスとして使用できる常磁性マイクロスフェア、Miltenyi Biotec GmbH (Gladbach, Germany)の微小なMACSマイクロビーズ、US5763194に記載される中空繊維のレーから成る半透膜物質、US5576185に記載される沈降による分離を可能にする緻密粒子が含まれる。

【0037】

本発明の固体支持体の有利な形態では、前記支持体上にさらに結合された抗-NKp46および／または抗-NKp44抗体、またはその免疫原性フラグメントまたは誘導体の支持体上での存在を含む。以下に詳細するように、本発明のNKp30レセプターは実際にNKp46および／またはNKp44レセプターと相加的にまたは相乗的に組み合わせることができる。

【0038】

別の態様では、本発明は本発明の抗血清タイプの組成物、本発明の単離された抗体-抗原タイプ化合物、本発明の抗体およびモノクローナル抗体から成る群より選択される少なくとも1種の物質では乳動物を免疫化し(ここで少なくとも1種の物質は免疫原性エンハンサーと任意に結合してよい)、こうして得られた抗-抗血清を回収することにより取得

10

20

30

40

50

されるような抗-抗血清タイプの任意の組成物に関する。本発明はまた、抗体-抗原タイプの反応で本発明の aa 化合物の少なくとも 1 種を認識できる、単離された抗-抗体およびモノクローナル抗-抗体、および同一のものを含有する医薬品組成物に関する。

【0039】

本発明の生成物は、様々に使用できる。有利な使用用途にはその医薬品としての使用が含まれる。NKp30 は全ての NK 細胞により選択的に発現され、いずれも IL-2、IL-12、IL-15、FLT-3 リガンド、SCF 等の 1 種、2 種または多種サイトカインの存在下に新に単離培養され、したがって NK 細胞同定のための至適マーカーを意味する。本発明は、特に、当業者が生物学的サンプル中の NK 細胞の存在を検出および／または定量化するための方法を実施できるようにし、該方法は、前記サンプル中に存在する NKp30 分子の検出および／または定量化から成る。本発明の方法は、特に、以下の工程を含む：

—生物学的なサンプルを、本発明の抗血清-タイプ組成物、本発明の単離された抗体-抗原タイプ化合物、本発明の単離された抗体、単離された免疫-反応性フラグメント、固体支持体、および本発明のハイブリドーマから成る群より選択される少なくとも 1 種の物質と接触させ、

—これにより形成される免疫複合体を検出および／または定量化する

または

生物学的サンプルを、本発明の単離されたポリヌクレオチド化合物、本発明の単離されたポリヌクレオチド対、本発明の配列番号：10 および／または配列番号：12 を含有する単離されたポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション生成物の形成に適した条件下に接触させ、

これにより形成されるハイブリダイゼーション生成物を検出および／または定量化する。

【0040】

本発明はまた、当業者が生物学的サンプルから NK 細胞を選択的に除去する方法を実施できるようにし、該方法は、NKp30⁺である細胞の選択的除去から成る。このような方法は特に以下の工程を含む：

—生物学的サンプルを、本発明の抗血清-タイプ組成物、本発明の単離された抗体-抗原タイプ化合物、本発明の単離された抗体、単離された免疫反応性フラグメント、固体支持体、および本発明のハイブリドーマから成る群より選択される少なくとも 1 種の物質と、免疫複合体形成に好適な接触下に接触させ、

—これにより形成される免疫複合体（ポジティブ細胞）を、このような複合体有さないもの（ネガティブ細胞）から除去する。

【0041】

本発明はまた、当業者が生物学的サンプルから NK 細胞の陽性かつ選択的精製方法を実施できるようにし、該方法は、NKp30⁺であるこのような細胞のポジティブかつ選択的精製から成る。このような方法は特に以下の工程を含む：

生物学的サンプルを、本発明の抗血清-タイプ組成物、本発明の単離された抗体-抗原タイプ化合物、本発明の単離された抗体、単離された免疫-反応性フラグメント、固体支持体、および本発明のハイブリドーマを、免疫複合体形成に好適な接触条件下に接触させ、その上に免疫複合体を形成した細胞を除去する。

【0042】

細胞回収の便利な方法は当業者に公知である。このような方法は特に以下を含む：(i) 細胞とポジティブ細胞に免疫複合体を形成させる物質との結合を機械的に切断する、(ii) ポジティブ細胞に免疫複合体を形成させる物質を酵素攻撃する（例えば US 5081030 に記載されるようなパパイニンによる攻撃）、または (iii) 免疫複合体と、ポジティブ細胞と結合するために免疫複合体中に含有される抗体と競合できる過剰量の可溶性分子とを接触させ、その結果免疫複合体が中断され、例えば US 5968753 に CD34⁺細胞の回収について例示される。

【0043】

本発明はまた、前記の少なくとも1種の（各）物質を含有する生物学的サンプルからNK細胞を検出、定量化、除去および／またはポジティブ精製するための任意のキットに関し、前記物質はコンテナー中に封入される。

【0044】

本発明の方法を実施するために、適当な生物学的サンプルは、末梢血液、血漿、骨髓穿刺液、リンパ系組織、ならびに血球分離、血漿分離および、滑液、脳脊髄液、気管支肺胞液および腹膜液等の合集液から単離された細胞を含む。

【0045】

特に有利な態様において、本発明はNK細胞の細胞毒性を刺激する方法に関し、該方法は以下から成る：

前記NK細胞を、生理学的条件下（*in vitro*または*in vivo*）に、本発明の抗血清－タイプ組成物、本発明の単離された抗体－抗原タイプ化合物、単離された抗体、固体支持体、および本発明のハイブリドーマから成る群より選択される少なくとも1種の生成物と接触させる。

【0046】

前記接触は、前記NK細胞上でNKp30が架橋できるように実施される（配列番号：2、配列番号：4、配列番号：5およびその保存バリエーションに対して、配列全長の少なくとも80%相同なaa配列を含有する、前記NK細胞の表面での、化合物の架橋）。好ましい架橋形態には、前記NK細胞を生理学的条件下に、少なくとも1種の選択された物質（例えば抗NKp30抗体）を飽和濃度の前記物質を用いて固定化した少なくとも1種の固体支持体と接触させることが含まれる。NKp30レセプター架橋には実際、NK細胞活性化刺激が含まれる。刺激を優先するネットNK細胞活性化制御平衡の獲得が求められる場合、当業者は明らかに優先してNKp30架橋条件を選択するであろう。このような条件には特に、自然に架橋する化合物の使用が含まれる。前記群に列挙される生成物は、そのような化合物、またはその可能な構築体の例に相当する。このような条件にはまた、適当な量、特に前記制御がNK細胞の細胞毒性刺激を優先してより強く平衡化する適当な密度での（例えば飽和濃度）、このような架橋化合物の使用が含まれる。刺激を、記載のように、*in vitro*または*in vivo*で実施してよい。

【0047】

本発明の刺激法は、有利にIL-2、IL-12、IL-15のようなインターロイキン中でのNK細胞インキュベーションの通常のステップを必要としない。これらのステップはしかしもちろん排除されない：当業者は、本発明の方法にこれらの通常のステップを付け加えるかを選択できる。

【0048】

本発明はまた、NK細胞の細胞毒性を刺激するためのキットに関し、該キットは前記生成物の少なくとも1種をコンテナー中に封入して含有する。

【0049】

検出、定量化、除去、完全精製、および／またはNK細胞の細胞毒性刺激のために、本発明の前記方法はさらに、前記生物学的サンプル、または前記NK細胞を、抗-NKp46または抗-NK44抗体と接触させることを含んでよく；前記キットはさらに抗-NKp46または抗-NKp44抗体を含有してよい。本発明はしたがって、前記群から選択される少なくとも1種の生成物を含有するNK細胞の細胞毒性を刺激するための任意のキットに関し、ここで前記少なくとも1種の生成物はコンテナー中に封入されている。このようなキットはさらに抗-NKp46抗体および抗-NKp44抗体から成る群より選択される1種または数種の抗体を含有してよい。

【0050】

有利には本発明の精製法をNK細胞活性化と同時に実施でき、逆も可能である。本発明の実施形態である、同時のNK細胞ポジティブ精製およびNK細胞細胞毒性刺激は、生物学的サンプル、特にヒトに由来のサンプルに適用する場合、すなわち治療後に人患者へ再投与する場合に興味深い。

10

20

30

40

50

【0051】

また、本発明はNK細胞の細胞毒性を阻害する方法をも提供し、該方法は、生理学的条件下に前記NK細胞を少なくとも1種の化合物と接触させることから成る：

(a) 例えばNKp30結合部位をマスキングすることにより、前記NK細胞上に発現するNKp30レセプターへのNKp30の天然リガンドの結合を阻害できる化合物、および／または前記NK細胞により発現されるNKp30レセプターの架橋を阻害できる化合物、および／または

(b) 前記NK細胞により発現されるNKp30分子、その形質移入エレメント、特にCD3ζ鎖間の相互反応を阻害する化合物。この方法は望みに応じて*in vivo*または*in vitro*で行うことができる。

10

【0052】

(a) の化合物は特に、本発明の免疫反応性フラグメントを含有する（例えばFab；F(ab')₂フラグメント）。種々のイソタイプの好適なNKp30モノクローナル抗体（IgMおよび好ましくはIgG）、またはその免疫反応性の1価または2価フラグメントを、NK細胞上に発現するNKp30をマスクするための各分離定数の10倍を越える飽和濃度で使用できる。

【0053】

(b) の化合物は特に、NKp30膜貫通荷電アミノ酸（配列番号：1の位置143のアミノ酸R）と前記形質導入エレメント間の相互作用を阻害できる化合物である。このような(b)化合物は、特に、生理学的条件下にNKp30膜貫通領域（配列番号：1の位置138～157）へ結合できる脂溶性分子に相当するので、前記膜貫通アミノ酸（位置143のR）の機能（CD3ζへの結合）を阻害または遮断できる。ここで生理学的条件とは、*in vivo*条件、または*in vivo*条件に類似した*in vitro*条件を意味する。本発明はまた、前記生成物の少なくとも1種、例えば本発明の免疫反応性フラグメントを含有する、NK細胞の細胞毒性を阻害するための任意のキットに関する。

20

【0054】

NK細胞を生物学的サンプルから検出／定量化／選択／除去／ポジティブかつ選択的な精製するための、ならびにNK細胞の細胞毒性を刺激するための方法は、さらに、前記サンプルまたは各NK細胞と、前記条件下に、NKp30以外のNKレセプターの活性を刺激できかつNKp30に加えてまたは相乗的に機能する化合物、例えばNKp46および／またはNKp44レセプターと接触させることを含む。刺激は、例えば前記条件下に別のNKレセプター、特にNKp46および／またはNKp44を架橋できる化合物を使用することにより達成できる。

30

【0055】

もちろんその逆を、本発明のNK細胞の細胞毒性を阻害する方法に適用する、例えば本発明の阻害法はさらに、例えばリガンド結合阻害および／または形質移入／エフェクターエレメント結合阻害により、前記の別のNKレセプターの活性を阻害出来る化合物の使用を含む。

【0056】

本発明の非常に有用な態様は、移植される細胞、移植される組織、移植される器官および宿主有機体から成る群より選択される有機体と、本発明の抗血清タイプ組成物、本発明の単離された抗体－抗原タイプ化合物、単離された抗体、固体支持体、本発明のハイブリドーマ、本発明の精製法で得られるNK細胞、本発明の刺激法で得られるNK細胞から成る群より選択される少なくとも1種の生成物とを接触させることを含む、新規移植法に相当する。ここで「移植」とは「外科移植」をも包括する。前記宿主有機体は人間を含む任意のほ乳動物であってよい。

40

【0057】

この新規移植法は特に同種異系移植に有用であり、例えば骨髄／幹移植に利用できる。特にGvH阻害、またはGvTおよび特にGvL刺激に有利である。本発明の新規移植法の本質は、前記移植片から精製されかつ本発明の方法およびキットにより活性化されるNK

50

細胞を患者に提供することである。これは特にMHC一一致または一不一致造血系移植（骨髄／末梢幹細胞）へ利用される。この活性化された同種異系NK細胞は、特に移植片の注入に近い時間帯で：同時に、および約2日後で、例えば移植される患者に静脈投与されてよい。活性化されたNK細胞の量および患者への投与頻度は病状に依存する。

【0058】

本発明の新規移植法はまた、抗一腫瘍および／または抗一感染治療、予防または軽減に特に関連がある。この場合、固形または液体腫瘍またはウイルスやその他の微生物感染症を患う患者の、本発明の方法およびキットで精製かつ活性化された自己NK細胞は、前記NK細胞を前記腫瘍および／または感染症の原因に対して反応性の飽和濃度のmAbの存在下にインキュベートすることにより、特に腫瘍および／または感染症に対して「武装」することができる。精製し、活性化され、かつ「武装」した本発明のNK細胞を、次に、患者へ静脈投与してよい。「武装」NK細胞の量および患者への投与頻度は病状に依存する。

10

【0059】

本発明の新規移植法は、したがって、NKp30トリガリングを介したNK細胞活性化に基づく、新規のNK細胞をベースとする免疫療法を構築する。本発明の方法は、さらに、NKp30と相加的にまたは相乗的に機能できる別のレセプター、例えばNKp46および／またはNKp44のNKp46および／またはNKp44による架橋化合物の同時活性化も含んでいてよい。

【0060】

本発明はしたがって、以下から成る群より選択される少なくとも1種の生成物を含有する任意の医薬品組成物をも包括する：

本発明の抗血清－タイプ組成物、本発明の単離された抗体－抗原タイプ化合物、単離された抗体、固体支持体、本発明のハイブリドーマ、本発明の精製法により得られる単離されたNK細胞（および特に本発明の精製法により移植ドナーから精製された、単離されたNK細胞）、本発明の刺激法により得られるNK細胞（本発明の刺激法により細胞毒性を刺激した、単離されたNK細胞）を、製薬学的に利用可能な賦形剤といっしょに含有する。

20

【0061】

前記の単離されたNK細胞は、ヒト、特に移植ドナーから集められるか（医薬品組成物が移植片をもらう宿主有機体へ投与されることを意図する場合）、または特にメラノーマ等の腫瘍を有する患者から集められる（医薬品組成物を抗一腫瘍剤として患者へ投与することを意図する場合）。本発明のこのような医薬品組成物は、有利に、さらに抗－NKp46および／または抗－NKp44抗体、またはその免疫原性フラグメントまたは誘導体を含有する。本発明の医薬品組成物は薬剤として使用できる。製薬学的に利用可能な種々の賦形剤は当業者に入手可能であり；主にガレヌス製剤形および所望の投与経路に応じて、適当な1種を選択する。ここで「医薬品組成物」とは錠剤、粉末、ペースト、パッチ、顆粒、微粒子、ナノ粒子、コロイド溶液、水溶液、注射用液、スプレー、リポソーム等の任意のガレヌス製剤形を意味する。In vivo治療形式における投与経路には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内または皮下投与、鼻腔内経路および外科的経路が含まれる。ガレヌス製剤形は徐放形および／または制限放出形であってもよい。

30

40

【0062】

前記の少なくとも1種の生成物を適当に配合し、前記組成物を投与される患者にとって認容性かつ効果的にする。このような適当な配合は当業者に公知である；患者が人間である場合、これらには、前記生成物の人体に適用可能なものまたはキメラ類似体である。またこれには、溶解度および／または化学的および／またはガレヌス製剤特性が所望の投与経路および目的の効果レベルに適応した、製薬学的に使用可能な賦形剤が含まれる。このような賦形剤には、例えば生理食塩水またはデキストロース溶液が含まれる。本発明の組成物はさらに任意のバッファー、および／または任意の安定化剤を含有してよく、当業者は場合に応じて適切なものを見出す。

【0063】

50

前記した少なくとも1種の生成物の有効量は、使用する特定の生成物、患者の付加的なまたは相乗的な治療薬（例えば抗-NKp46および／または抗-NKp44抗体、またはそのフラグメントあるいは誘導体）の存在および性質、患者の病状に相関する。有効量は典型的に体重1kgに対して1ng～100mgの範囲である。

【0064】

このような医薬品組成物は例えば、移植／外科移植の改善、抗腫瘍的予防、軽減、治療、例えばメラノーマ、肝癌、肺の腺癌の予防、軽減、治療、抗微生物的予防、軽減、治療、例えば抗ウイルス的予防、軽減、治療を意図できる。ここで「軽減」とは、患者の健康を向上させることに相当する任意の生物学的結果を意味する；これは特に異常細胞の増殖を任意に遅延させることを含む。

10

【0065】

有利な態様において、本発明の医薬品組成物は標的のNK細胞毒性を容認する。このような組成物は、本発明の抗血清タイプ組成物、本発明の単離された抗体-抗原タイプ化合物、単離された抗体、固体支持体、本発明のハイブリドーマ、本発明の精製法により得られる単離されたNK細胞、本発明の刺激法により得られる単離されたNK細胞から選択される少なくとも1種の生成物（前記生成物は生理学的条件下に所望の標的と結合できる物質と直接または間接的に結合している）を、製薬学的に使用可能な賦形剤といっしょに含有する。

【0066】

前記標的物質の例には、抗腫瘍抗体、抗微生物抗体、抗ウイルス抗体、および同等の機能を有するものが含まれる。標的であるNK細胞毒性のためのこのような医薬品組成物はより有利に、抗腫瘍的予防、軽減、治療を意図し（メラノーマ、肝癌または肺の腺癌）、抗微生物的予防、軽減、治療を意図する。

20

【0067】

本発明はまた、NKp30天然リガンドを同定する方法を提供する。この方法は、抗体、抗体フラグメント、またはNK細胞上の本発明の固体支持体の使用を含む。本発明はしたがって、NKp30天然リガンドの類似体および／または拮抗体のための、化学的および／または生物学的ライブラリーのスクリーニングが可能である。

【0068】

本発明の抗体、抗体フラグメント、または固体支持体も、NK-感受性標的細胞により発現される表面NKp30リガンドのレベルの評価、および測定レベルの標準生理学的レベルに対する比較を可能にする。この評価は、腫瘍細胞および／または微生物感染細胞の診断、および適切な予防、軽減、治療ツールの指定を特に意図する。本発明の抗体、抗体フラグメント、または固体支持体は、したがって、腫瘍または感染症の診断のための試薬として使用できる。

30

【0069】

本発明の特徴を以下の実施例により詳細にする。これらの実施例は例証を目的とするだけであって本発明の概要を制限するものではない。当業者が意図する種々の形態も本発明に包含される。

【0070】

これらの実施例において、図1A～9Bを参照する（19枚の図面シート）。

40

【0071】

実施例1：NKp30の同定および分子特徴付け

材料および方法

モノクローナル抗体（mAb）

以下のmAbを実験室で製造した：JT3A（IgG2a、抗-CD3）、BAB281（Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta, 1997, p46, a novel Natural Killer cell-specific surface molecule which

50

mediates cell activation. J. Exp. Med. 186:1129~1136) およびKL247 (それぞれIgG1およびIgM、抗-NKp46)、Z231 (Vitale. M.、C. Bottino、S. Sivori、L. Sanseverino、R. Castriconi、R. Marcenaro、R. Augugliaro、L. Moretta、and A. Moretta. 1998. NKp44、a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated Natural Killer cells is involved in non-MHC restricted tumor cell lysis. J. Exp. Med. 187:2065~2072) およびKS38 (それぞれIgG1およびIgM、抗-NKp44)、KD1およびc127 (それぞれIgG2aおよびIgG1、抗-CD16)、c218およびGPR165 (それぞれIgG1およびIgG2a、抗-CD56)、A6-136 (IgM、抗-HLAクラスI) (Ciccone E.、D. Pende、M. Vitale、L. Nanni、C. Di Donato、C. Bottino、L. Morelli、O. Viale、A. Amoroso、A. Moretta、and L. Moretta. 1994. Self Class I molecules protect normal cells from lysis mediated by autologous Natural Killer Cells. Eur. J. Immunol. 24:1003~1006)、GL183 (IgG1、抗-p58. 2) (Moretta A.、G. Tambussi、C. Bottino、G. Tripodi、A. Merli、E. Ciccone、G. Pantaleo、and L. Moretta. 1990. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ Natural Killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. J. Exp. Med. 171:695~714)、EB6 (IgG1、抗-p58. 1) (Moretta A.、C. Bottino、D. Pende、G. Tripodi、G. Tambussi、O. Viale、A. M. Orengo、M. Barbaresi、A. Merli、E. Ciccone、and L. Moretta. 1990. Identification of four subset of human CD3-CD16+ NK cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules. Correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. J. Exp. Med. 172:1589~1598)、Z199 (IgG2b、抗-NKG2A) (Sivori S.、M. Vitale、C. Bottino、E. Marcenaro、L. Sanseverino、S. Parolini、L. Moretta、and A. Moretta. 1996. CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA-CLASS-I alleles. Identification of the inhibitory form of CD94 by the use of novel monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol. 26:2487~2492)。D1. 12 (IgG2a) mAbおよびHP2. 6 (IgG2a) mAbを、それぞれ抗-HLA-DRおよび抗-CD4として使用した。

【0072】

新規mAbは、一般的に、NKクローン (EC1およびSA260、それぞれA76およびZ25mAbに対する) またはポリクローナルNK細胞群 (AZ20mAbに対する) のいずれかの活性化 (CD3-、CD56+、CD16+) NK細胞で5週齢のBalb

10

20

30

40

50

／Cマウスを免疫化することにより、最初に誘導された。種々の細胞融合の後、FcγR＋P815標的細胞に対する転嫁殺傷アッセイで溶解を誘導する能力によって、mAbを選択した。適当なmAbには、(i) MHCクラスIネガティブ標的、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、同種異系細胞に対する天然細胞毒性、(ii) 抗体－被覆標的細胞に対する細胞毒性、(iii) 細胞質内Ca²⁺濃度の増加、(iv) ZAP70、Syk、LAT、SLP76、Shc、Grb2、ホスホリパーゼC－ガンマ酵素、ホスファチジルイノシトール3－キナーゼ等の細胞質内アダプター／エフェクター分子のチロシンホスホリル化の誘導、(v) レセプター－関連形質移入鎖KARAP／DAP12またはCD3ゼータまたはFcRガンマのホスホリル化、(vi) インターフェロンガンマ、腫瘍壊死因子、IL5、IL10、ケモカイン(MIP-1アルファ)、TGFベータ等のサイトカイン分泌、(vii) CD69およびPEN5等のNK表面分子の、それぞれアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションにより推定されるNK細胞活性化を統計的に顕著に増加(p<0.05)させるmAbが含まれる。好ましいmAbは、例えば前記mAbの不在下にエフェクターNK細胞が起こす塩基性標的細胞の溶解と比較して、エフェクター：標的(E/T)比1：1で、標的細胞の溶解を少なくとも約5倍に増加させる。したがって3種類のmAbが選択された：A76；Z25；AZ20。ハイブリドーマ産生AZ20は、2000年11月8日にC. N. C. M.へ寄託された(1-2576)。

10

【0073】

末梢血液リンパ球(PBL)の精製およびポリクローナルまたはクローナルNK細胞群の生成

20

末梢血液リンパ球(PBL)は、フィコールハイパーク勾配およびプラスチック付着細胞の除去により健康なドナーから誘導された。多くのNK細胞を得るために、PBLを抗-CD3(JT3A)、抗-CD4(HP2.6)および抗-HLA-DR(D1.12)mAbと(4℃で30分)、さらにヤギ抗-マウス被覆Dynabeads(Dynal、Oslo、Norway)と(4℃で30分)インキュベートし、イムノマグネティック除去した(Pende, D.、L. Accame, L. Paret, A. Mazzocchi, A. Moretta, G. Parmiani, and L. Moretta. 1998. The susceptibility to Natural Killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of HLA class I alleles. Eur. J. Immunol. 28:2384~2394; Sivori, S.、M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1997. p46, a novel Natural Killer cell-specific surface molecule which mediates cell activation. J. Exp. Med. 186:1129~1136; Vitale, M.、C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, R. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta. 1998. Nkp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated Natural Killer cells is involved in non-MHC restricted tumor cell lysis. J. Exp. Med. 187:2065~2072)。CD3⁻4⁻DR⁻細胞は、細胞溶解アッセイに使用されるかまたは100 U/ml rIL-2(Proleukin, Chiron Corp.、Emeryville、USA)および1.5 ng/ml PHA(Gibco Ltd. Paisley、Scotland、in order to obtain polyclonal NK cell populations or, after limiting

30

40

50

dilution)、NK細胞クローン (Moretta, A. 1985. Frequency and surface phenotype of human T lymphocytes producing interleukin-2. Analysis by limiting dilution and cell cloning. Eur. J. Immunol. 151:148~155) の存在下に、照射供給細胞上で培養される。

【0074】

蛍光フローサイトメトリー分析

細胞を適当なmAbとPEーまたはFITCー結合イソタイプー特異的ヤギ抗ーマウス2次試薬で染色した (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)。サンプルを1色ーまたは2色細胞蛍光分析 (FACScan Becton Dickinson & Co, Mountain View, CA) により、以前に記載されるようにして (例えばMoretta A.、G. Tambussi、C. Bottino、G. Tripodi、A. Merli、E. Ciccone、G. Pantaleo、and L. Moretta. 1990. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ Natural Killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. J. Exp. Med. 171:695~714) 分析した。

【0075】

細胞系および細胞溶解アッセイ

使用されるFcγRーネガティブ標的は以下のものである: MEL15 (MEL15392、ヒトメラノーマ) (Pende, D.、L. Accame、L. Pareti、A. Mazzocchi、A. Moretta、G. Parmiani、and L. Moretta. 1998. The susceptibility to Natural Killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of HLA class I alleles. Eur. J. Immunol. 28:2384~2394); M14 (ヒトメラノーマ) (Pessino, A.、S. Sivori、C. Bottino、A. Malaspina、L. Morelli、L. Moretta、R. Biassoni、and A. Moretta. 1998. Morecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. J. Exp. Med. 188:953~960); SMMC (ヒト肝癌) (Sivori, S.、D. Pende、C. Bottino、E. Marcenaro、A. Pessino、R. Biassoni、L. Moretta、and A. Moretta. 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human natural killer cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. Eur. J. Immunol. 29:1656~1666); A549 (ヒト肺の腺癌; ATCC番号CCL-185. 1); FO-1および1174mel (ヒトメラノーマ); AUMA (ヒトメラノーマ)。

【0076】

使用されるFcγRーポジティブ標的はP815 (マウスの肥満細胞腫) であった。正常

10

20

30

40

50

標的細胞として使用される PHA-Blasts は、PBL を PHA (Gibco) 1.5 ng/ml と培養することにより得られた。

【0077】

細胞を、前記されるような $4\text{-h}^{51}\text{Cr}$ 放出アッセイにより、種々の mAb の不在または存在下に、細胞溶解活性を試験した (Moretta A.、C. Bottino、D. Pende、G. Tripodi、G. Tambussi、O. Viale、A. M. Orenge、M. Barbaresi、A. Merli、E. Ciccone、and L. Moretta. 1990. Identification of four subset of human CD3-CD16+ NK cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules. Correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition, J. Exp. Med. 172:1589~1598; Sivori, S.、D. Pende、C. Bottino、E. Marcenaro、A. Peschino、R. Biassoni、L. Moretta、and A. Moretta. 1999. Nkp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human natural killer cells. Correlation between surface density of Nkp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. Eur. J. Immunol. 29:1656~1666)。種々の mAb の濃度はマスキング実験のために $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ であり、転嫁殺傷実験のために $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ である。E/T 比は本文中に示される。適当な mAb には、その不在下に観察される細胞溶解活性を顕著に増加させる mAb が含まれる。顕著な増加の適当な例には、前記 mAb の不在下での細胞溶解活性と比較した場合の、前記 mAb の存在下のエフェクター：標的比 1：1 での細胞溶解活性を少なくとも約 5 倍増加させることが含まれる。

【0078】

細胞内遊離カルシウム $[\text{Ca}^{++}]$ i 増加の測定

$[\text{Ca}^{++}]$ i の測定を前記のようにして実施した (Poggi A.、R. Pardi、N. Pella、L. Morelli、S. Sivori、M. Vitale、V. Revello、A. Moretta、and L. Moretta. 1993. CD45-mediated regulation of LFA1 function in human natural killer cells. Anti-CD45 monoclonal antibodies inhibit the calcium mobilization induced via LFA1 molecules. Eur. J. Immunol. 23:2445~2463)。Fura-2 ラベル NK 細胞を飽和量の抗-NKp30 mAb (AZ20) または培地単独と 4°C で 30 分インキュベートした。親和精製したヤギ抗-マウス抗血清 (GAM) (ICN Biomedicals、Aurora、Ohio) $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ を含むキュベット中へ添加することにより、このレセプターの架橋が起こる。

【0079】

NKp30 分子の生物学的特徴付け

内在性 NK 細胞膜タンパク質 (Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J. Biol. Chem. 256:1604~1606) を以下のようにして調製した： 25×10^6 個の細胞を、TX バッファー中 (20 mM リン酸ナトリウムバッファー、 1% Triton X-114、 10 mM

10

20

30

40

50

EDTA、pH8)で、4℃で30分溶解し、遠心分離した(5'、10,000RPM)。上清を37℃で10分放置し、遠心分離し、下層をTXバッファー中に1:2で再懸濁し、溶解液を透明にするために4℃で10分放置した。その後、懸濁液を37℃で10分放置し、遠心分離し、下層をEB(0.0625M Tris pH6.8、10%グリセロール、2.3% SDS)中に1:3で再懸濁した。サンプルを不連続SDS-PAGEで分析し、Immobilon P(Millipore Corp. Bedford, MA)へ移行させ、AZ20mAb、次いでウサギ抗マウスHRPO(DAKO A/S、Denmark)またはNKp30-特異的抗血清、さらにロバ抗ウサギHRPO(Amersham、Buckinghamshire、UK)で調査した。Renaissance Chemiluminescence Kit(NEN、Boston、MA)を検出のために使用した。

10

【0080】

NKp30ポリクローナル抗血清

2.5kgのHY/Cr雄ウサギ(Charles River)を、KLHと結合した(Pende D.、R. Biassoni、C. Cantoni、S. Verdiani、M. Falco、C. DiDonato、L. Accame、C. Bottino、A. Moretta、and L. Moretta、1996. The Natural Killer cell receptor specific for HLA. A allotypes; a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140kD disulphide-linked dimer. J. Exp. Med. 184:505~518)15aaペプチドWVSQPPEIRTLGSC(配列番号:7:NKp30タンパク質配列配列番号:2中のアミノ酸位置20~位置33由来、加えてKLHへ結合するためのCアミノ酸)100μg/100μlで免疫化した。最初に100μlの完全フロイントアジュバントで、それ以外は全て100μlの不完全フロイントアジュバントで、4週間処理を行った。最後の処理から1週間後に、血液10mlを採り、免疫化したペプチドおよび無関係なペプチドに対するELISAにより、血清を試験し力価測定した。

20

30

【0081】

NKp30シグナル伝達複合体の分析

NK細胞(10^8)をナトリウムペルバナデート100μMで刺激するかまたは刺激せず(Cantoni、C.、C. Bottino、M. Vitale、A. Pessino、R. Augugliaro、A. Malaspina、S. Parolini、L. Moretta、A. Moretta、and R. Biassoni、1999. NKp44、a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human Natural Killer cells, is a novel membrane of the immunoglobulin superfamily. J. Exp. Med. 189:787~796)、1%ジギトニン溶解物をSepharose Protein A-coupled KD1(抗-CD16)mAbで5回前処理した。次に溶解物をSepharose-CNBr-結合Z231およびBAB281mAbまたはSepharose Protein A-coupled NKp30-特異的ウサギ抗血清およびウサギ免疫前血清で免疫沈降させた。サンプルを還元条件下に(5%、2Me)15%SDS-PAGEで分析し、Immobilon P(Millipore)へ移行し、抗-ホスホチロシンmAb(PY20-HRPO、Transduction Laboratories、Lexington、KY)または抗-CD3ζmAb(2H2、Immunotech、Marseille、France)、次いでウサギ抗マウスHRPO(DAKO)で調査した。Renaissance Chemiluminesc

40

50

ence Kit (KEN) を検出のために使用した。

【0082】

COS-7細胞中でのcDNA発現によるライブラリースクリーニング

2人の健康なドナーから前記のようにして得たIL-2-活性化ポリクローナルNK細胞から抽出したRNAを使用して、発現cDNAライブラリーをVR1012プラスミド中で (Vical Inc.、san Diego、CA) 調製した (Pessino, A.、S. Sivori、C. Bottino、A. Malaspina、L. Morelli、L. Moretta、R. Biassoni、and A. Moretta. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. J. Exp. Med. 188:953~960、Cantoni, C.、C. Bottino、M. Vitale、A. Pessino、R. Augugliaro、A. Malaspina、S. Parolini、L. Moretta、A. Moretta、and R. Biassoni. 1999. NKp44、a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human Natural Killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. J. Exp. Med. 189:787~796)。

【0083】

ライブラリースクリーニング法は記載の通りである (Pessino, A.、S. Sivori、C. Bottino、A. Malaspina、L. Morelli、L. Moretta、R. Biassoni、and A. Moretta. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity, J. Exp. Med. 188:953~960、Cantoni, C.、C. Bottino、M. Vitale、A. Pessino、R. Augugliaro、A. Malaspina、S. Parolini、L. Moretta、A. Moretta、and R. Biassoni. 1999. NKp44、a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human Natural Killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. J. Exp. Med. 189:787~796、Brakenhoff, R. H.、M. Gerretsen、E. M. C. Knippels、M. van Dijk、H. van Essen、D. O. Weghuis、R. J. Sinke、G. B. Snow、and G. A. M. S. van Dongen. 1995. The human E48 antigen, Highly homologous to the murine Ly-6 antigen ThB, is a GPI-anchored molecule apparently involved in keratinocyte cell-cell adhesion. J. Cell. Biol. 129:1677~1689)。手短に言えば、cDNAライブラリーをCOS-7細胞へ一時的に形質移入し、ポジティブプールの選択を、特異的抗-NKp30mAb A76を使用した免疫細胞化学染色およびsib-選択により実施した。

【0084】

DNAシーケンシング

DNAシーケンシングを、d-Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitおよび377 Applied Biosystems Automatic Sequencer (Perkin Elmer-Applied Biosystems、Foster City、CA) を用いて実施した。

【0085】

一時的移入

COS-7細胞 (5×10^5 /プレート) を、VR1012-NK-A1 (クローン5C) またはベクター単独を用いて、記載のようなDEAE-デキストランまたはエレクトロポレーション法により形質移入した (Pende D.、R. Biassoni、C. Cantoni、S. Verdiani、M. Falco、C. DiDonato、L. Accame、C. Bottino、A. Moretta、and L. Moretta. 1996. The Natural Killer cell receptor specific for HLA A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140 kD disulphide-linked dimer. J. Exp. Med. 184: 505~518)。48時間後、形質移入細胞を細胞蛍光分析のために使用した。

10

【0086】

ノーザンブロッティングによるNKp30転写発現の分析

造血器起源の様々な細胞系でのNKp30転写発現を分析するために、RNAを未変性アガロースゲル電気泳動により大きさで細分し、プラスに荷電したナイロン膜上 (NEN) に移行した。特に、CsCl勾配を用いて調製した全RNA $10 \mu\text{g}$ またはOligodT磁気ビーズ分離 (Dyna1) を用いて調製したポリA⁺RNA $2 \mu\text{g}$ を、各レーンに負荷した。非常にストリンジェントな条件下に、記載のようにしてノーザンブロッティングを実施した (Biassoni, R.、S. Ferrini、I. Prigione、A. Moretta、and E. O. Long. 1988. CD3-negative lymphokine-activated cytotoxic cells express the CD3 epsilon-gene. J. Immunol. 140: 1685~1689)。各プライマー 25 pmol を用いてPCR増幅を30サイクル実施し (94°C で30秒、 60°C で30秒、 72°C で30秒)、次いで 72°C で7分インキュベートすることにより、NKp30の421bp cDNAプローブ (配列番号: 10) を得た。プライマーの配列は以下の通りである: CAG GGC ATC TCG AGT TTC CGA CAT GGC CTG GAT GCT GTT G (NKp30上向、配列番号: 8) およびGAC TAG GAT CCG CAT GTG TAC CAG CCC CTA GCT GAG GAT G (NKp30下向; 配列番号: 9)。cDNAフラグメント配列番号: 10はランダムプライミングにより³²P-標識された (Maniatis, T.、E. F. Fritsch & J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

20

30

【0087】

NKp30 cDNAのRT-PCR増幅

ポリクローナルNKおよびT細胞群およびクローンならびに種々の造血細胞系由来のRNAzol (Cinna/Biotecx, Houston, TX) を用いて抽出した全RNAを、オリゴdTプライミングを使用して逆転写した。NKp30のcDNA増幅のために使用したプライマー (606 bp ; 配列番号: 12) は以下の通りである: 5' CAG GGC ATC TCG AGT TTC CGA CAT GGC CTG GAT GCT GTT G (NKp30上流; 配列番号: 8) および5' GAT TTA TTG GGG TCT TTT GAA G (リバースプライマー; 配列番号: 11)。各プライマー 25 pmol で30サイクル (94°C で30秒、 60°C で30秒、 72°C で30秒)、次いで 72°C で7分のインキュベーションにより、増幅を実施した。増幅産物をTOPO-TAクローニングキット (Invitrogen, Carlsbad, C

40

50

A) により pCR2. 1 中でサブクローニングし、次いで配列決定した。

【0088】

Zoo-ブロット分析

NKp30 遺伝子の種間保存 (cross-species conservation) の分析を、Zoo-ブロット (Clontech, Palo Alto, CA) により実施した。サザンブロッティングは、ヒト、アカゲザル、SDラット、BALB/cマウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリ、Saccharomyces cerevisiae イースト菌由来のゲノムDNAを含有する。ハイブリダイゼーションプローブは、ノーザンブロッティングのハイブリダイゼーションに使用したのと同じの 421bp の cDNA フラグメントであった (配列番号: 10)。記載のようにして、あまりストリンジェントでない条件で洗浄を実施した (Maniatis, T., E. F. Fritsch & J. Sambrook, 1982, Molecular cloning; A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

【0089】

結果

新規NK-特異的トリガリング表面分子の同定

マウスを CD3⁻、16⁺、56⁺ NK 細胞クローンまたは集団で免疫化した。エフェクター細胞としてポリクローナル NK 細胞群またはクローンをを用いた転嫁殺傷アッセイ中で、その FcγR + P815 標的細胞の溶解を誘導する能力に応じて、様々な融合体由来のモノクローナル抗体を最初に選択した。3種類の mAb、A76、AZ20 および Z25 (全て IgG1 イソタイプ) が選択され、これらは、CD16、NKp46 および NKp44 を含む公知のトリガリング NK レセプターに特異的な他の mAb で導かれるのと同様の強い細胞溶解活性を誘導する (図 1A) (E:T = 1:1 で、mAb の不在下に観察される細胞溶解活性の 5 倍以上の細胞溶解活性増加)。図 1B において、様々な量の AZ20 mAb で誘導される NK 細胞の細胞毒性を、抗-CD16 または抗-CD56 mAb に相当するイソタイプの場合と比較する。AZ20 mAb に対する細胞溶解応答は、抗-CD16 mAb により誘導されるものと類似するが、抗-CD56 mAb では効果が見られない。さらに、図 1C に示すように、AZ20 mAb で刺激した後に、代表的なクローン 3M16 中で、顕著な細胞内 [Ca⁺⁺] の増加が認められた。特に、この抗体で誘導される [Ca⁺⁺] i の増大は、活性化レセプターを効果的に架橋するヤギ抗-マウス 2 次試薬の存在下によりのみ誘起される。

【0090】

A76、AZ20 および Z25 mAb により認識できる分子の細胞表面分布の分析を間接的免疫蛍光法および FACS 分析で実施したところ、異なるドナー由来の種々の活性化されたポリクローナルまたはクローナル NK 細胞群により反応性が見出された (下記参照)。これらには稀少な CD16-ネガティブ NK 細胞クローンも含まれる。これとは異なり、PHA-誘導ポリクローナル T 細胞群または TCRα/β および γ/δ T 細胞クローン (異なるドナー由来) では mAb の反応性は検出されなかった。EBV-誘導 B 細胞系、単球および DC 系ならびに HL60、U937、Eo/A3、THP-1、Daudi、Jurkat、IGROV および標的細胞として使用される様々な腫瘍細胞系の全種類を含む種々の造血および非-造血腫瘍細胞系でも反応性は検出されなかった。

【0091】

近年、数人のドナー由来のポリクローナル NK 細胞群が NKp46 分子の蛍光強度の複峰性分布 (NKp46^{bright} および NKp46^{dull}) により特徴付けられ、これらの個人に由来する NK クローンが安定な NKp46^{bright} および NKp46^{dull} 表現型を発現することが見出された。重要なのは、NK 感受性の標的細胞に対する NK 細胞クロンの細胞溶解活性がその NKp46 表現型に強く相関することである。異なるパターンの NKp46 発現を示す個人に由来するポリクローナル NK 細胞群および NK 細胞クローン上の新規 mAb の反応性を分析した。図 2A に示すように、代表的ドナー AM に由来するポリクロ

10

20

30

40

50

ーナルNK細胞群は、AZ20または抗-NKp46mAbで染色すると均質的にブライトな表現型を示す。これと異なり、ドナーCBに由来するポリクローナルNK細胞では、同一のmAbで染色した結果、蛍光は複峰性の分布を示した。特に、CBドナーでは、同一の蛍光強度パターンが、新に精製したNK細胞中でも検出された（図2A）。さらに、ドナーCB由来の幾つかのクローンの分析で、NKp46^{bright}クローンは一貫してAZ20^{bright}であり、これに対してNKp46^{dull}クローンは常にAZ20^{dull}表現型を示すことが明かとなった（図2B）。

【0092】

新たに単離されたリンパ球中での新規mAbの反応性のパターンを決定するために、異なる個人に由来するPBLを有益なmAbを使用して二重蛍光分析することにより評価した。代表的ドナーを図3Aに示す：AZ20mAbにより認識される表面分子は選択的にCD56⁺細胞上で発現した。さらに多くのAZ20⁺細胞はCD16分子を同時発現した。これと異なり、AZ20mAbはCD3⁺Tリンパ球またはHLA-DR⁺Bリンパ球を染色しなかった。このドナー中で検出されるCD56⁺AZ20⁺細胞群も表面CD3分子を発現することが見出された。したがって、新たに誘導されたリンパ球でも、AZ20mAbの反応性は抗-NKp46mAbの反応性とオーバーラップする。NKp46およびAZ20mAb-反応性分子の表面発現の直接比較分析を図3Aに示す。2種類の分子が同一の細胞サブセットにより明らかに同時発現した。しかし、AZ20および抗-NKp46mAbにより染色された細胞中で対角分布は検出できず、これに対して、細胞を異なるイソタイプの2種類の抗-NKp46mAbで同時に染色した場合にこの種の蛍光分布が起きた。

【0093】

特に、AZ20mAbに関して記載されたのと同じの結果がA76およびZ25mAbで得られた。これらのデータは、新規mAbで認識される分子がNKp46とは異なることを示唆した。この可能性を直接評価するために、NKp46cDNAで一時的に形質移入したCOS-7細胞を、そのAZ20、A76およびZ25mAbとの反応性について分析した。種々の抗-NKp46mAbと反応させる間、細胞形質移入体はAZ20、A76およびZ25mAbにより染色されなかった。A76、AZ20およびZ25mAbはしたがって全ての成熟ヒトNK細胞を規定するが、NKp46とは異なる新規表面分子に特異的であることが分かる。

【0094】

AZ20、A76およびZ25mAbにより認識される表面分子の生物学的特徴付けを分析するために、NK群を¹²⁵Iまたはビオチンで表面標識し、1種のまたは別のmAbで免疫沈降し、SDS-PAGEで分析した。このような条件下に、特異的バンドは検出されなかった。したがって、内在性膜タンパク質をNK細胞から調製し、さらにウェスタンブロッティングで種々のmAbの可能な反応性を分析した。図3Bに示すように、AZ20mAbは特異的に~30kDの分子と反応し、以後NKp30と名付けた。同一の条件下に、A76およびZ25mAbの双方はより低い反応性を示した。

【0095】

NKp30の架橋は、新たに誘導されたNK細胞中でも細胞溶解活性を誘導するNKp30分子が新たなNK細胞上に発現したので、これが細胞の細胞溶解活性を誘起できるかどうかを分析した。図4Aに示すように、AZ20、A76およびZ25mAbはP815標的細胞に対する細胞溶解活性を著しく増加させ、これに対して抗-CD56mAbに相当するイソタイプは効果を示さなかった。このトリガリング効果は抗-NKp46mAbで得られる効果に匹敵した。さらに、この実験で、AZ20F(ab')₂フラグメントの使用は、細胞溶解活性のトリガリングを誘導せず、このことはmAb-依存性NKp30刺激が、標的細胞上でFcγRにより媒介される効率的な架橋を必要とすることを示している。

【0096】

正常または腫瘍細胞に対する天然細胞毒性の誘導へのNKp30の関与

先のデータは、NK p 4 6 または NK p 4 4 の m A b - 媒介性のマスキングが活性化NK細胞による非MHC-制限腫瘍細胞溶解を阻害することを示した。さらに、NK p 4 6 のマスキングはまた、新たに単離された末梢血液NK細胞により媒介される天然細胞毒性を阻害した。NK p 3 0 のマスキングが新たに誘導されたNK細胞またはNKクローンにより媒介される、FcγR-ネガティブ腫瘍標的細胞のパネルに対する細胞溶解活性に影響を及ぼすことが出来るかどうかを調べた。図4Bに示すように、抗-CD56 m A b に相当するイソタイプではなくて、抗NK p 3 0 m A b が、HLAクラスIネガティブ1174 m e l、AUMAおよびFO-1メラノーマ細胞系に対する、新たなNK細胞によって媒介される天然細胞毒性を阻害した。抗-NK p 3 0 m A b を抗-NK p 4 6 m A b と組み合わせ使用した場合に付加的なより優れた阻害効果が認められた。NK p 3 0 およびNK p 4 6 はしたがって、新たなNK細胞の天然細胞毒性をトリガリングする際に相互に依存して働くレセプターである。

【0097】

これらのデータから、活性化NK細胞により殺傷される腫瘍細胞上のNK p 3 0 の m A b - 媒介性のマスキングの効果をさらに分析した。図5は、2種のメラノーマ(MEL15およびM14)、肝癌(SMMC)および肺の腺癌(A549)を含む種々の腫瘍標的に対する細胞溶解アッセイで分析された3種類の代表的NK細胞クローンを示す。これまでの研究で、M14メラノーマに対する細胞溶解活性が、NK p 4 6^{bright}表現型を示すNKクローンに限定されかつNK p 4 6 レセプターの m A b - 媒介性のマスキングにより阻害できることを示した。これに対してNK p 4 6^{bright}クローンはMEL15をも殺傷するが、NK p 4 6 またはNK p 4 4 のマスキングはその細胞溶解活性をそれほど阻害しなかった。前記のように、NK p 3 0 はNK p 4 6^{bright}クローン中で明かに発現する；したがってNK p 3 0 がMEL15標的細胞の殺傷に重要な役割を果たしているかもしれないと考えられる。実際、図5に示すように、抗-NK p 3 0 m A b はMEL15細胞のNK-媒介性の溶解を明かに阻害した(>50%の阻害)。抗-NK p 4 6 m A b は僅かな効果を示すが、抗-CD56 m A b に相当するイソタイプでは効果を示さなかった。これとは異なり、M14メラノーマは抗-NK p 4 6 m A b により阻害されるが、抗-NK p 3 0 m A b は実際には効果がなかった。したがって、NK p 4 6 がM14の溶解に関する腫瘍レセプターとして現れるのに対して、NK p 3 0 はMEL15の殺傷に中心的役割を果たす。

【0098】

SMMCおよびA549等の別の腫瘍標的細胞に対する細胞溶解アッセイに関する同一NKクローンの分析(図5)は、細胞毒性誘導に対してNK p 4 6 とNK p 3 0 とが同等に寄与することを明かにした。実際、NK p 4 6 またはNK p 3 0 単独の m A b - 媒介性マスキングではある程度の阻害効果しか起こらないのに対して、2分子を同時にマスキングすると顕著に阻害された。これらの結果は、2種類のレセプターが特定の標的細胞に対する細胞毒性の誘導に相乗効果を持って影響を及ぼすことを示している。更なる分析により、NK p 3 0 が、NK-媒介性細胞毒性の誘導において、NK p 4 6 だけでなくNK p 4 4 とも相加効果的または相乗効果的に働くことが分かった。図6Aは、代表的NKクローンであるMIL69のFO-1またはA549腫瘍細胞に対する細胞溶解活性を示している。標的細胞の溶解はNK p 3 0、NK p 4 4 またはNK p 4 6 レセプターの m A b - 媒介性マスキングにより部分的にのみ阻害された。しかし、2種類のレセプターを組み合わせマスキングするとより高い効果が得られ、3種類のレセプターを同時にマスキングすると最大の阻害が得られた。抗-CD56 m A b に相当するイソタイプは、単独でまたは他の m A b と組み合わせ使用しても、阻害効果を示さなかった。NK p 3 0 単独または他のレセプターを組み合わせた場合の役割を、正常標的細胞源としてPHA-誘導T細胞芽細胞を使用した細胞溶解アッセイにおいて分析した。この実験で、NK細胞クローンによる自己細胞の溶解は、標的細胞上のHLAクラスI分子の m A b - 媒介性マスキングでNK細胞上に発現したHLAクラスI特異的阻害レセプターとの相互作用を混乱させることにより達成される。これらの実験条件でも、1種類のレセプターの m A b - 媒介性マスキング

キングでは細胞毒性に対して部分的な効果しか得られなかった（図6B）。これに対して、NKp30、NKp46およびNKp44レセプターの同時のマスキングは標的細胞の溶解を顕著に抑制した（または実際に阻止した）（代表的クローンMX361またはP9参照）。

【0099】

これらのデータは、これらのレセプターによって認識されるリガンドが腫瘍だけでなく正常細胞中でも発現することを意味している。

【0100】

最後に、マウスの標的細胞の認識におけるNKp30の可能な関与について分析した。NKp30のmAb-媒介性マスキングはBW1502およびYAC-1のマウス胸腺腫瘍細胞のいずれの溶解にも効果を示さなかった。

10

【0101】

前記のデータを考え合わせると、主要レセプターであるNKp30の機能が、正常標的細胞および多くのしかし全てではない腫瘍細胞に対するNK媒介性細胞毒性に関与することを示している。さらに、NKp30はNKp46およびNKp44と協力して働いてもよく、これは多くの場合、分析される標的細胞による特異的なリガンドの発現に応じてなされると考えられる。

【0102】

NKp30分子をコードするcDNAの分子クローニング

NKp30分子をコードするcDNAを同定するために、ヒトポリクローナルNK抗体のmRNAからcDNA発現ライブラリーを精製した（Passinomi A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni, and A. Moretta, 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. J. Exp. Med. 188: 953~960）。種々のcDNAライブラリープールで形質移入したCOS-7細胞を免疫細胞化学的な検出法によりA76mAbで染色した。573bpの単一の読みとり枠（ORF）（配列配列番号：13をコードする）を含む674bpのcDNA（NKp30クローン5C、配列番号：1）を単離した。クローン5C cDNA構築体によるCOS-7細胞の形質移入の結果、細胞蛍光分析により推定されるように、抗-NKp46mAbではなく全ての種類の抗-NKp30mAb（図7A）により認識される分子が表面発現した。図7Bに示すように、推定190アミノ酸ペプチド（配列番号：2）をコードするクローン5C ORFは、免疫グロブリンスーパーファミリー（Ig-SF）に属し、18アミノ酸のシグナルペプチド（配列番号：3）およびV-タイプのIg-様ドメインを形成する120アミノ酸の細胞外領域（配列番号：4）により特徴付けられる。細胞外部には2つの潜在的なN-結合グリコシル化部位とO-結合グリコシル化のための非共通配列が含まれる。疎水性アミノ酸に富む領域な潜在的にタンパク質-タンパク質相互作用に関連し、膜貫通領域でIgV-様ドメインと結合する。19アミノ酸膜貫通領域（配列番号：5）は+に荷電したアミノ酸、Argを含有し、33アミノ酸細胞質部（配列番号：6）は典型的なITAM共通配列に欠けている。膜貫通ドメイン中の荷電アミノ酸の存在は、NK細胞上に発現する別のトリガリングレセプターに共通の特徴である。これらの荷電残基は、通常、シグナリングポリペプチドを含むITAMとの関連性が考えられる。

20

30

40

【0103】

EMBL/GenBankデータベース検索は、クローン5C cDNA（配列番号：1）がこれまでに規定された別の1C7遺伝子のスプライシング形（寄託番号AF031138）に76.8%相同であることを明らかにした。この遺伝子は、ヒトクロモソーム6上、MHC遺伝子複合体のTNFクラスター中にマップしている（Nalabolu, S. R., H. Shukla, G. Nallur, S. Parimoo and S. M. W

50

eissman, 1996. Genes in a 220-kb region spanning the TNF cluster in human MHC. Genomics 31: 215~22)。とはいえしかし、1C7遺伝子の推定生成物の機能も表面分布も特定できず；1C7に特異的なmAbを入手できなかった。さらに1C7転写産物は、種々の組織および細胞系のノーザンブロットングでは明らかにできなかった。これに対して、RT-PCRにより1C7転写産物を脾臓（しかしそれ以外の組織からではない）または特定のリンパまたは骨髄細胞系から単離されたRNAにより増幅できた。これらのデータは、1C7転写産物がそれほど重要でなく、細胞種の狭い範囲でのみ十分なレベルで発現できることを示唆した。ノーザンブロットングによるNKp30発現の最近の分析は、ポリクローナルNK細胞群およびNKLおよびNK3.3を含むNK細胞系中の約1kbのmRNAを明かにした。これとは異なり、抗-NKp30mAbによる反応性の欠如に密接して、ヒト単球またはU937、Jurkat、HL60およびLCL721.221細胞を含む種々のヒストタイプの細胞中でNKp30mRNAは検出できなかった（図8A）。ノーザンブロットングではmRNAを発現しない（および抗-NKp30mAb表面染色にネガティブである）このような細胞系は、RT-PCR技術によって分析した場合に転写産物を検出できる。この発見は、NKp30転写産物の低いレベルがNKp30表面発現を欠如させる結果を招くことを示唆する。さらに、人間の様々な組織のノーザンブロットング分析により、脾臓でのみNKp30転写産物の選択的発現が認められた。これらのデータは全て、NKp30発現がかなりNK-特異的であるという事実に一致する。

10

20

【0104】

最後に、ヒトNKp30cDNAプローブを、サル、ラット、マウス、犬、ウシおよびウサギのゲノムDNAでハイブリダイズした。このデータは、NKp30をコードする遺伝子が異なる種に高く保存されているという事実を支持するものである（図8B）。

【0105】

NKp30複合体の生化学的特徴付け

N-末端NKp30ペプチドでウサギを免疫化して、NKp30-特異的抗血清を生成した。図9Aに示すように、ウェスタンブロットングで見られる抗血清分子は、AZ20mAbにより先に検出されたものと同一である。AZ20mAbと異なり、ポリクローナルNK細胞群由来の抗血清免疫沈降NKp30分子をビオチンでラベルした。したがって、ナトリウムペルバナデートで処理したまたは処理していないポリクローナルNK細胞群を、NKp30-特異的抗血清で免疫沈降させ、抗-ホスホチロシンmAbで調べた。ウサギ免疫グロブリンのCD16分子への非特異的な結合を回避するために、細胞溶解物を抗-CD16mAbで徹底的に前処理した。さらに、全ての実験で、ウサギ免疫前血清をネガティブコントロールとして使用した。これらの実験で、NKp30レセプターのチロシンホスホリル化は検出されなかった。これに対してNKp30レセプターは、ナトリウムペルバナデート処理時にチロシンホスホリル化される分子に関与し（図9B）、NKp46-関連CD3ζ鎖と一緒に移動する。NKp30-関連分子とCD3ζポリペプチド間の同一性は、その抗-CD3ζmAbによる反応性で直接実証された（図9B）。

30

【0106】

したがって、CD16およびNKp46を含む他のNKトリガリングレセプターに類似したNKp30は、ITAM-含有CD3ζポリペプチドと共同して活性化シグナルを伝達できる。これらのデータは、NKp30細胞質尾中のITAMの欠如およびその膜貫通部位中の荷電残基の存在と一致している。

40

【0107】

議論

この研究では、特異的mAbの生成により、休止および活性化ヒトNK細胞のいずれの天然細胞毒性で重要な役割を果たす新規トリガリングレセプターであるNKp30を同定しかつ特徴付けた。NKp46に類似して、NKp30は、新たに単離されたおよびIL-2中で培養した両方の全てのNK細胞により選択的に発現し、したがってNK細胞同定の

50

ための至適マーカーである。Ig スーパーファミリーに属するにもかかわらず、NK p 30 はこれまでに同定されたNK レセプターと任意に十分な相同性を示さない。多くの点で、NK p 30 はNK p 46 と類似している。実際それらの（稀少なCD 16-細胞を含む）全てのNK 細胞上での同等の発現、両方の分子におけるそれらの類似した機能的特性と合わせた表面発現の高密度または低密度発現パターンの存在は、新規mAb によって認識される表面分子がNK p 46 と同一であるかまたは非常に類似していることを想起させた。しかし、NK p 30 およびNK p 46 は異なる分子量を示し、機能的には天然細胞毒性の誘導では相補的役割を果たす。さらに、分子クローニングにより、NK p 30 がNK p 46 と非常に制限された相同性を有するタンパク質であり、2 種類の分子はたった13%の同一性と15%の類似性を示し、異なるクロモソーム上に位置する遺伝子でコードされていることが明らかとなった。

10

【0108】

天然細胞毒性および腫瘍細胞溶解においてNK 細胞トリガリングに応答するレセプターはこれまで定義されないままであった。得られたデータが、天然細胞毒性に関する種々のトリガリングNK レセプターの存在の仮説に一致した。ここで、最近NK p 46 およびNK p 44 が同定され、この2 種類のレセプターは種々の腫瘍標的の認識および溶解に関連する。いずれもIg スーパーファミリーに属するが、あまり同一性はない。これらは、NK 細胞活性化時にチロシンホスホリル化される、異なるシグナル形質移入ポリペプチドに関連する（それぞれ、CD 3 ζ / Fc ε R I γ およびKARAP / DAP 12）。NK p 46 およびNK p 44 は、ヒトNK 細胞による腫瘍細胞溶解の過程で共に働くことが見出された。しかし、特定の標的細胞の溶解はほとんどNK p 46-および/またはNK p 44-依存性ではなく、というのも、これらの分子をmAb-媒介性マスキングしても細胞毒性は十分に阻止されないからである。さらに、明らかにNK p 46-および/またはNK p 44-依存性であっても、他の腫瘍細胞系に対する細胞溶解活性はいずれの分子をmAb-媒介性マスキングしても阻止できず、このことはNK p 46 およびNK p 44 と共に働く別のレセプターの存在を再び示唆する。実際ここで、NK p 30 が種々の標的細胞に対する細胞毒性の誘導に、NK p 46 およびNK p 44 と共に働くレセプターであることが示される。おそらく、より重要なのは、NK p 30 が、溶解がほぼNK p 46 / NK p 44-非依存的な特定の腫瘍標的細胞（例えばMEL 15 タイプのメラノーマ）のNK-媒介性の殺傷誘導における主要なレセプターであることである。NK p 46 と非常に類似したNK p 30 も、NK 細胞活性化および新たなNK 細胞による標的細胞殺傷に関連する。

20

30

【0109】

先に論じたように、NK p 30 の表面発現はNK p 46 のそれと同等である。実際、NK p 46^{dull}またはNK p 46^{bright}表現型を示すNK 細胞は、NK p 30^{dull}またはNK p 30^{bright}蛍光によっても特徴付けられた。NK p 46^{dull}表現型が一貫して少ない量のNK p 44 を発現することによりNK 細胞クローンが特徴付けられることは前に述べた。NK 細胞が異なるトリガリングレセプター同等の密度で発現するという発見は、異なる「自然（天然）」細胞溶解活性を示す別のNK 細胞サブセットの存在を説明するものである。例えば、かなりNK p 46-非依存性であるにもかかわらず、ある標的細胞（例えばMEL 15）に対する細胞溶解活性が、何故、NK p 46^{bright}表現型を発現するNK クローンに実質的に限定されるのかを理解するのは困難であった。現在は、NK p 46^{bright}細胞のみが高濃度でNK p 30 レセプターを発現するという発見により、これらの結果を説明できる。したがって、NK p 46^{dull}およびNK p 46^{bright}細胞の細胞用か活性における最大の相違点に関する先の証拠は、現在、異なるNK p 30 表現型を示すNK 細胞にも当てはめることができる。この主張の通り、NK p 30^{dull} NK 細胞クローンの細胞溶解活性は、NK p 30^{bright}クローンのそれと比較して著しく低下した。

40

【0110】

NK p 46 と類似したNK p 30 は、レセプター複合体を介したシグナリングに大きく関連すると思われるCD 3 ζ に関係を有する。しかしCD 3 ζ は、少なくともCOS-7 細胞

50

胞中では、いずれのレセプターの表面発現にも必須ではない。分子クローニングにより、NKp30が、ヒトクロモソーム6上、HLAクラスII領域中に予めマップされた遺伝子である、ヒト1C7の生成物であることが明らかとなった(Nalabolu, S. R., H. Shukla, G. Nallur, S. Parimoo and S. M. Weissman, 1996. Genes in a 220-kb region spanning the TNF cluster in human MHC. Genomics 31: 215~22; Neville, M. J. and R. D. Campbell, 1999. A new member of the Ig superfamily and a V-ATPase G subunit are among the predicted products of novel genes close to the TNF locus in the human MHC. J. Immunol. 162: 4745~4754)。

10

【0111】

しかし、1C7遺伝子の推定生成物の機能も細胞分布も知られておらず、その天然細胞毒性における役割についての記載もない。さらに、ノーザンブロットング分析では検出できないので、1C7転写産物発現の分析はRT-PCRに限られた。特異的mAbが欠如しているために、転写産物と表面産物間で相関関係をうち立てられなかったことも強調すべきである。本発明において、3種類の異なるmAbで染色することにより測定したNKp30の表面発現と、ノーザンブロットングにより評価されたmRNA発現との間の明らかな相関関係を示す。逆に、RT-PCRによる1C7転写産物の検出から1C7/NKp30分子の表面発現は予測できない。

20

【0112】

最後に、NKp30分子は、非-HLAリガンドを認識する際にNK細胞トリガリングに関与するレセプターの新規ファミリー(天然細胞毒性レセプター(NCR))の3番目のメンバーである。これらのレセプターは、NK細胞による標的細胞溶解の誘導において、相補的に出現する。各レセプターの相対的な寄与は、標的細胞上の特異的リガンドの発現/密度に反映されると考えられる。この主張の通り、CD16もまた天然細胞毒性に関連していることが近年明らかとなり、このことから、Fc結合およびADCCに加えて、CD16がNK細胞機能の制御に働いていることが示唆される。CD16および異なるNCRの他に、NK細胞トリガリングを媒介できる幾つかの別の表面分子が人間および齧歯類で同定された。これらには、CD2、CD69、CD28、2B4およびNKRP1が含まれる。しかし、多くの場合、これらの活性化構造体はNK-制限されないので、天然細胞毒性でのそれらの実際の役割をさらに明確にする必要がある。

30

【0113】

最後に、種々のNCRの同定が、NK細胞の生理学に関する我々の理解の先にある主要ステップを構成するにもかかわらず、標的細胞上のNCR天然リガンドの性質および分布の両方をさらに明らかに決定する必要がある。入手したデータに基づいて、NK-特異的トリガリングレセプターにより特異的に認識されるリガンド分子の(腫瘍細胞における)ダウンレギュレーションから成る、腫瘍回避の新規メカニズムを予測することができる。したがって、このようなリガンドの同定は、正常細胞対腫瘍細胞でのそれらの分布を分析することを可能にし、かつリガンド発現と種々の腫瘍細胞によるNK-媒介性溶解への感受性との間に相関関係が存在するかを定義することが可能になる。

40

【0114】

実施例2：抗-NKp30抗体の製造

前記実施例1に詳細したようにしてNKp30タンパク質配列配列番号：2が得られれば、抗-NKp30抗体は常用の抗体生成法により製造できる。これらの方法には、マウスまたはラット等の動物を、ここで定義したNKp30免疫原性フラグメントで免疫化することが含まれる。反復して免疫化を実施できる。抗体応答は、ELISAまたはフローサイトメトリー等の種々の技術でモニターでき、免疫化した動物の血清中の、免疫原に結合した免疫グロブリンの存在が実証される。顕著な抗体応答が検出される場合、動物は犠牲

50

となり、ケラーミルステイン法 (Koehler and Milsten procedure, Nature 1975、256:495~497; Antibodies, a laboratory manual、1988、Harlow and David Lane, Ed. Cold Spring Harbor laboratory) または免疫脾臓細胞を回収しかつそれをハイブリドーマ細胞系へ融合する (Anderson、1989、J. Immunol. 143:1889) 等の常用の方法に記載されるようにしてモノクローナル抗体が生成される。

【0115】

抗体で染色された細胞サブセットを、前記したフローサイトメトリーにより図式化し、生物学的サンプル中でNK細胞を選択的に認識する所望の能力を有する抗体を同定する。得られたモノクローナル抗体の刺激能をさらに特徴付けるために、実施例1に記載したように、以下の任意の項目をバイオアッセイに利用できる：(i) MHCクラスIネガティブ標的、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、同種異系細胞に対する天然細胞毒性の誘導、(ii) 抗体-被覆標的細胞に対する細胞毒性の刺激、(iii) 細胞質内Ca²⁺濃度の増加、(iv) ZAP70、Syk、LAT、SLP76、Shc、Grb2、ホスホリパーゼC-ガンマ酵素、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ等の細胞質アダプター/エフェクター分子のチロシンホスホリル化の誘導、(v) レセプター関連形質導入鎖KARAP/DAP12またはCD3ゼータまたはFcRガンマのホスホリル化、(vi) インターフェロンガンマ、腫瘍壊死因子、IL5、IL10、ケモカイン (例えばMIP-1アルファ)、TGFベータ等のサイトカイン分泌、(vii) NK細胞表面分子、例えばCD69およびPEN5それぞれのアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション。

【0116】

NKp30免疫原性フラグメントと結合でき、その表面にオリゴマー形で免疫グロブリンフラグメントのレパートリーを発現するファージライブラリーを特異的にスクリーニングできる抗体を製造するために、別の方法を利用できる。このスクリーニングは、固層上で組み換えNKp30分子をパニングし、ファージ懸濁液をこの被覆表面と接触させ、維持された結合ファージを洗浄し、これらのファージを複製し、その表面により少ない免疫フラグメントを発現するファージ構築体でこのスクリーニング法を数回反復し、免疫原性分子に最も高い親和性を示すフラグメントを選択することにより、実施できる。最終的に得られたフラグメントを、生物学的サンプル中のNK細胞を選択的に染色する能力および前記したような任意の機能性アッセイで任意に刺激した抗体と競合する能力について試験してよい。

【0117】

実施例3：NK細胞の精製および活性化

抗-NKp30抗体等の抗-NKp30反応体は有利に、血漿交換法または細胞交換法で回収したサンプル等の複合体生物学的サンプルからのNK細胞精製に適したNK細胞特異性を示す。当業者は種々の細胞精製形態を決定できる。

【0118】

例えば、抗-NKp30抗体NKp30は、Miltenyi Biotec gmbh (Gladbach、ドイツ) の極微小MACSマイクロビーズへ共有結合できる。次いで、細胞交換法またはドナーの末梢血液サンプルの傾瀉により得られるドナー血液由来の百万~十億個の細胞の懸濁液を磁気ビーズと接触させ、MiltenyiのMACSセルソーター等の磁気分離装置へ導入した。また、抗-NKp30抗体はDynal (Oslo、Norway) のDynabeads (登録商標) 粒子へ結合できる。ドナー細胞の懸濁液をビーズとインキュベートし、Baxter社製Isoplex装置の磁場へ置き、NKp30抗原と競合して細胞の放出を可能にするペプチド分子とインキュベートすることにより回復させる。

【0119】

精製直後ポジティブ細胞を適当な等張媒質中で回復し、10万~1億個の用量で患者に与

10

20

30

40

50

えることができる。この細胞を精製ステップの後、臨床使用の前に凍結させることも可能である。自家移植法では、NK細胞を患者自身の血液から取得する。この場合、抗一腫瘍治療は、精製NK細胞をさらに、腫瘍により発現した抗原（例えばB細胞リンパ腫ではCD20）と結合した抗体とインキュベートし、処理細胞を抗一腫瘍抗体といっしょに患者へ再度与えることにより、実施される。また、骨髄外科移植等の同種異系外科移植で見られるGvHD（移植体対宿主疾患）を回避するための方法では、NK細胞をドナー血液から精製し、受容者へ再導入できる。

【0120】

NK細胞のポジティブ精製物をベースとするNKp30は実際、特定の状況下に、同時にNK細胞を活性化できるという利点を有する。これらの状況には特に、ある密度での抗-NKp30反応物の使用および／またはNK細胞上でNKp30分子の架橋を可能にする天然物の使用が含まれる。典型的に、このようなマトリクスは飽和量の抗-NKp30抗体で被覆された固層、例えば中空繊維、デキストラン粒子または磁気粒子を含む。

10

【0121】

本発明の同時精製－活性化法により、NK細胞のために常用されるインキュベーションステップ（例えばIL-2、IL-12、IL-15などのinterleukineの存在下に精製NK細胞をインキュベートする）は、もう必須のステップではない。このような常用のステップはしかしながら任意に実施できると理解すべきである：当業者はこのような常用のステップを、例えば最適化の目的で、本発明の方法に付け加えることを選択できる。

20

【0122】

略号：NK、ナチュラルキラー、KIR、キラー阻害レセプター、NCR、天然細胞毒性レセプター、ITAM、免疫レセプターのチロシンを基礎とする活性化モチーフ、SDS-PAGE、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、Ig-SF、免疫グロブリンスーパーファミリー、RTPCR、逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応、ORF、読みとり枠、mAb、モノクローナル抗体。

【0123】

本明細書において、参考文献は、免疫学、細胞生物学、分子生物学および薬理学の当業者に公知の様々な方法論を提示している。参考文献が提示した方法論等に記載される出版物および他の材料は、参照によりここにその全てを包括して組み込んだものとする。

30

【図面の簡単な説明】

【図1A】 本発明の3種の新規mAbで誘導されるNK－媒介性細胞溶解活性（抗-NKp30mAb）のトリガリングを示す図である。図1Aにおいて、c127（抗-CD16）、BAB281（抗-NKp46）、Z231（抗-NKp44）、AZ20、A76、Z25（抗-NKp30mAb）およびc218（抗-CD56）mAbの不在または存在下に、FcγR－ポジティブP815標的細胞系に対する転嫁殺傷アッセイで、細胞溶解活性について代表的なポリクローナルNK細胞群を分析した（%特異的⁵¹Cr放出）。使用したE/T（エフェクター対標的）比は1：1であった。

【図1B】 本発明の3種の新規mAbで誘導されるNK－媒介性細胞溶解活性（抗-NKp30mAb）のトリガリングを示す図である。図1Bにおいて、段階的な量のAZ20（黒四角）、c127（抗-CD16）（白三角）またはc128（抗-CD56）（白丸）mAbの存在下に、P815標的細胞（E/T比1：1）に対する転嫁殺傷アッセイで、代表的NKクローン3M16を分析した（%特異的⁵¹Cr放出）。使用した全てのmAbはIgG1イソタイプであった。

40

【図1C】 本発明の3種の新規mAbで誘導されるNK－媒介性細胞溶解活性（抗-NKp30mAb）のトリガリングを示す図である。図1Cにおいて、AZ20mAbの存在下でヤギ抗－マウス2次試薬（GAM）を用いて、[Ca⁺⁺]_i誘発（秒時間の関数としての[Ca⁺⁺]_inM）について、クローン3M16を分析した。ネガティブコントロールはGAM単独で処理した細胞である。

【図2A】 休止または活性化、ポリクローナルまたはクローナル、NK細胞の細胞蛍光

50

分析を示す図である。図 2 A において、ドナー A M および C M 由来のポリクローナル N K 細胞群（上側および中程の水平なグラフ線）、ドナー C B 由来の新しく単離された N K 細胞（下側の水平なグラフ線）を、c 2 1 8（抗-C D 5 6；2 つ目の垂直柱）、B A B 2 8 1（抗-N K p 4 6；3 つ目の垂直グラフ柱）または A Z 2 0（抗-N K p 3 0；最後の垂直グラフ柱）m A b と P E－結合ヤギ抗-マウス I g G 1 とを使用して、免疫蛍光および F A C S 分析により分析した。コントロール（最初の垂直グラフ柱）は第 2 の試薬だけを用いてインキュベートした細胞である。

【図 2 B】 休止または活性化、ポリクローナルまたはクローナル、N K 細胞の細胞蛍光分析を示す図である。図 2 B において、ドナー C B 由来の N K 細胞クローンを、B A B 2 8 1（抗-N K p 4 6；垂直な中程のグラフ柱）または A Z 2 0（抗-N K p 3 0；垂直な右側のグラフ柱）m A b と P E－結合ヤギ抗-マウス I g G 1 とを用いて、免疫蛍光および F A C S により分析した（コントロールは、垂直な左側のグラフ柱である）。

【図 3 A】 末梢血液リンパ球中での N K p 3 0 の発現パターンとウェスタンブロッティング分析を示す図である。図 3 A において、各ドナーから新に単離した末梢血液リンパ球を、G P R 1 6 5（I g G 2 a、抗-C D 5 6）、K D 1（I g G 2 a、抗-C D 1 6）、J T 3 A（I g G 2 a、抗-C D 3）、D 1－1 2（I g G 2 a、抗-H L A－D R）、K L 2 4 7（I g M、抗-N K p 4 6）m A b と組み合わせた A Z 2 0 m A b とイソタイプ-特異的 F I T C または P E－結合ヤギ抗-マウス 2 次試薬を用いて（上側の左および右、中程の左および右、ならびに下側の左のグラフ）、二色免疫蛍光および F A C S 分析により分析した。異なるイソタイプの 2 種類の抗-N K p 4 6 m A b を用いた二重免疫蛍光（K L 2 4 7、I g M 対 B A B 2 8 1、I g G 1）も示す（下側の右）。輪郭プロットを、それぞれ非染色細胞（下側左）、赤色蛍光のみでの細胞（上側左）、赤色および緑色蛍光での細胞（上側右）および緑色蛍光のみでの細胞（下側右）の四分区分画に分割した。

【図 3 B】 末梢血液リンパ球中での N K p 3 0 の発現パターンとウェスタンブロッティング分析を示す図である。図 3 B において、D a u d i（バーキットリンパ腫、ネガティブコントロール）由来のおよびポリクローナル N K 細胞群由来の内在性膜タンパク質を、非-還元条件下に A Z 2 0 m A b をプローブとして 1 1 % の S D S－P A G E で分析した。分子量マーカ（k D a）を左に示す。

【図 4 A】 N K p 3 0 が新たな N K 細胞中でレセプター活性化に働き、その天然細胞毒性に関連することを示す図である。図 4 A において、各ドナーから新に単離された末梢血液 N K リンパ球を、c 1 2 7（抗-C D 1 6）、B A B 2 8 1（抗-N K p 4 6）、A Z 2 0、A 7 6、Z 2 5 および c 2 1 8（抗-C D 5 6）m A b の不在または存在下に、F c γ R－ポジティブ P 8 1 5 標的細胞系に対する転嫁殺傷アッセイで、細胞溶解活性について分析した（% 特異的 51 C r 放出）。使用した E / T 比は 2 0 : 1 であった。

【図 4 B】 N K p 3 0 が新たな N K 細胞中でレセプター活性化に働き、その天然細胞毒性に関連することを示す図である。図 4 B において、新に単離した末梢血液 N K 細胞を、規定分子に対する m A b の不在または存在下に（c 2 1 8（抗-C D 5 6）、A Z 2 0（抗-N K p 3 0）、B A B 2 8 1（抗-N K p 4 6）m A b を使用した）、規定の F c γ R－ネガティブ / H L A クラス I－ネガティブメラノーマ細胞系に対する細胞溶解活性について分析した。E / T 比は 2 0 : 1 であった。

【図 5】 N K 細胞クローンによって媒介される腫瘍細胞溶解における、N K p 3 0 および N K p 4 6 の関与を示す図である。3 種の N K 細胞クローンを、A Z 2 0（抗-N K p 3 0；黒色バー）、B A B 2 8 1（抗-N K p 4 6；ストライプバー）あるいは A Z 2 0 と B A B 2 8 1 の両方（点画バー）m A b の不在（白色バー）または存在下に、M E L 1 5、M 1 4、S M M C および A 5 4 9 F c γ R－ネガティブ標的細胞系に対する細胞溶解活性について分析した。E / T 比は 4 : 1 であった。

【図 6 A】 N K p 3 0 が、腫瘍または正常自己標的細胞に対する N K－媒介性細胞毒性の誘導において、N K p 4 6 および N K p 4 4 と共同で機能することを示す図である。図 6 A において、代表的 N K クローン M I L 6 9 を、規定分子に対する m A b の不在または

10

20

30

40

50

存在下に、F O - 1 または A 5 4 9 F c γ R - ネガティブ標的細胞系に対する細胞溶解活性について分析した（%特異的⁵¹C r 放出）。以下のm A b を使用した：K L 2 4 7（抗-NK p 4 6）、A Z 2 0（抗-NK p 3 0）、K S 3 8（抗-NK p 4 4）。E / T 比は2 : 1（F O - 1）および3 : 1（A 5 4 9）であった。

【図6 B】 NK p 3 0 が、腫瘍または正常自己標的細胞に対するNK - 媒介性細胞毒性の誘導において、NK p 4 6 およびNK p 4 4 と共同で機能することを示す図である。図6 Bにおいて、2種類のNK細胞クローン（M X 3 6 1 およびP 9）を、規定分子に対するm A b の不在（白色バー）または存在（黒色バー）下に、自己P H A B l a s t に対する細胞溶解活性について分析した（%特異的⁵¹C r 放出）。使用したm A b はA 6 - 1 3 6（抗-H L A クラスI）、K L 2 4 7（抗-NK p 4 6）、K S 3 8（抗-NK p 4 4）、A Z 2 0（抗-NK p 3 0）であった。E / T 比は1 0 : 1 であった。

10

【図7 A】 C O S - 7 細胞形質導入物で発現したNK p 3 0 分子の細胞蛍光分析、NK p 3 0 のアミノ酸配列（配列番号：2）および疎水性プロットを示す図である。図7 Aにおいて、クローン5 C c D N A 構築対で形質導入したC O S - 7 細胞を、抗-NK p 3 0（左から右へ：A 7 6、A Z 2 0、Z 2 5）または抗-NK p 4 6（B A B 2 8 1）m A b とP E - 結合ヤギ抗-マウスI g G 1 とで染色し、フローサイトメトリーで分析した。白色プロファイルは第2試薬のみでインキュベートした細胞である（すなわちネガティブコントロール）。

【図7 B】 C O S - 7 細胞形質導入物で発現したNK p 3 0 分子の細胞蛍光分析、NK p 3 0 のアミノ酸配列（配列番号：2）および疎水性プロットを示す図である。図7 Bにおいて、シグナルペプチド（配列番号：3）を小文字で示し、膜貫通領域（配列番号：5）に下線を引く。NK p 3 0 細胞外領域配列（配列番号：4）はシグナルペプチドと膜貫通領域の間の配列に相当する。NK p 3 0 細胞内領域配列（配列番号：6）は膜貫通配列（C - 末端）の後ろの配列に相当する。I g - 様の折り畳中に存在するシステインを丸で囲み、推定N - グリコシル化部位を四角で囲む。K y t e e - D o o l i t t l e 疎水性プロットを下方に示す。GeneWorks、MacVector suites、NetOGlyc 2. 0（www. c b s . d t u . d k / s e r v i c e s / N e t O G l y c）およびP S O R T P r e d i c t i o n S e r v e r s（www. p s o r t . n i b b . a c . j p : 8 8 0 0 /）を使用してDNAおよびタンパク質配列を分析した。

20

30

【図7 C】 C O S - 7 細胞形質導入物で発現したNK p 3 0 分子の細胞蛍光分析、NK p 3 0 のアミノ酸配列（配列番号：2）および疎水性プロットを示す図である。図7 CにNK p 3 0 c D N A 配列を示す（配列番号：1）。NK p 3 0 コード配列は位置6 4 ~ 位置6 3 6 である（配列番号：1 3）。NK p 3 0 のための4 2 1 b p のc D N A プローブ（配列番号：1 0）は配列番号：1 の位置5 7 ~ 位置4 7 7 の配列に相当する。p C R 2 . 1 中でのクローニングのためにNK p 3 0 から増幅された6 0 6 b p のc D N A（配列番号：1 2）は配列番号：1 の位置5 7 ~ 位置6 6 2 の配列に相当する。

【図8 A】 NK p 3 0 転写発現のノーザンブロッティング分析およびZ o o - ブロット分析を示す図である。図8 Aにおいて、全RNAを起源の異なる細胞から単離した。レーン1および2：ポリクローナルNK細胞群；レーン3：ブランク；レーン4：NK細胞系（N K L）；レーン5：NK細胞系（N K 3 . 3）；レーン6：ヒト単球；レーン7：細網肉腫細胞系（U 9 3 7）；レーン8：Tリンパ腫細胞系（J u r k a t）；レーン9：急性前骨髄球性白血病細胞系（H L 6 0）；レーン1 0：E B V - 形質転換B細胞系（L C L 7 2 1 . 2 2 1）。各RNA調製物1 0 μ g（レーン1および2のポリクローナルNK細胞群からポリA⁺RNA 2 μ g）を4 2 1 b p のNK p 3 0 c D N A プローブとハイブリダイズさせた。2 8 S および1 8 S リボゾームRNAサブユニットの位置を左に示す。

40

【図8 B】 NK p 3 0 転写発現のノーザンブロッティング分析およびZ o o - ブロット分析を示す図である。図8 Bにおいて、ヒト、アカゲザル、S D ラット、B A L B / c マウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリおよびS a c c h a r o m y c e s c e r e v i

50

s i a e イースト菌由来のゲノムDNAを、それほどストリンジェントでない条件下に、421bpのNKp30cDNAプローブとハイブリダイズさせることから成る、サザンブロットを示す図である。

【図9A】 特異的抗血清を使用することによりNKp30レセプター複合体の生物学的分析を示す図である。図9Aにおいて、Dauidi由来の（ネガティブコントロール）およびポリクローナルNK細胞群由来の内在性膜タンパク質を、非還元条件下にNKp30-特異的ウサギ抗血清（I）をプローブとして11%SDS-PAGEで分析した。分子量マーカー（kDa）を左に示す。

【図9B】 特異的抗血清を使用することによりNKp30レセプター複合体の生物学的分析を示す図である。図9Bにおいて、ナトリウムペルバナデートで処理していない（-）または処理した（+）ポリクローナルNK細胞群に由来する1%ジギトニン細胞溶解物を、Z231mAb（抗-NKp44）、BAB281mAb（抗-NKp46）、NKp30-特異的ウサギ抗血清（I）および前免疫ウサギ血清（pI）で免疫沈降させた。還元条件下に抗-ホスホチロシン（抗-PTyr）または抗-CD3ζ（抗-ζ）mAbをプローブとして、サンプルを15%SDS-PAGEで分析した。Ig軽鎖（Ig（L））、Tyr-ホスホリル化CD3ζ（P-ζ）、Tyr-ホスホリル化KARAP/DAP12（P-KARAP/DAP12）およびCD3ζの非ホスホリル化形を矢印で示す。分子量マーカー（kDa）を右に示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> INNATE PHARMA S.A.S.
UNIVERSITA DI GENOVA

<120> Novel triggering receptor involved in natural
citotoxicity mediated by human Natural Killer cells,
and antibodies that identify the same.

<130> NKp30

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 674

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
ccttcctcct ccacccagac ctcactgctc agatccctt cgcacactgg gacatcttcc 60
gacatggcct ggatgctggt gctcatcttg atcatggctc atccaggatc ctgtgctctc 120
tggtgtgtcc agcccccctga gattcgtacc ctggaaggat cctctgcctt cctgccctgc 180
tccttcaatg ccagccaagg gagactggcc attggctcog tcacgtgggt ccgagatgag 240
gtggttccag ggaaggaggt gaggaatgga accccagagt tcaggggccc cctggcccca 300
cttgcttctt ccgctttcct coatgaccac caggetgagc tgcacatccg ggacgtgcga 360
ggccatgaog ccagcatcta cgtgtgcaga gtggaggtgc tgggccttgg tgtcgggaca 420
gggaatggga ctoggctggt ggtggagaaa gaacatcctc agctaggggc tggtagctc 480
ctcctccttc gggctggatt ctatgctgtc agctttctct ctgtggccgt gggcagcacc 540
gtctattacc agggcaaatg ccactgtcac atgggaacac actgccactc ctcagatggg 600
ccccgaggrg tgattccaga gccagatgt ccctagtctt ctcaaaaaga cccaataaa 660
tctgccccac cact                                     674
```

<210> 2

<211> 190

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Ala Trp Met Leu Leu Leu Ile Leu Ile Met Val His Pro Gly Ser
1           5           10           15
```

```
Cys Ala Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly
```

10

20

30

20

30

40

```
<210> 4
<211> 120
```

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Leu Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Pro Cys Ser Phe Asn Ala Ser Gln Gly Arg Leu Ala Ile
 20 25 30

Gly Ser Val Thr Trp Phe Arg Asp Glu Val Val Pro Gly Lys Glu Val
 35 40 45

Arg Asn Gly Thr Pro Glu Phe Arg Gly Arg Leu Ala Pro Leu Ala Ser
 50 55 60

Ser Arg Phe Leu His Asp His Gln Ala Glu Leu His Ile Arg Asp Val
 65 70 75 80

Arg Gly His Asp Ala Ser Ile Tyr Val Cys Arg Val Glu Val Leu Gly
 85 90 95

Leu Gly Val Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Val Val Glu Lys Glu
 100 105 110

His Pro Gln Leu Gly Ala Gly Thr
 115 120

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Leu Leu Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Ala Val Ser Phe Leu Ser Val
 1 5 10 15

Ala Val Gly

<210> 6

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

10

20

30

Ser Thr Val Tyr Tyr Gln Gly Lys Cys His Cys His Met Gly Thr His
1 5 10 15

Cys His Ser Ser Asp Gly Pro Arg Gly Val Ile Pro Glu Pro Arg Cys
20 25 30

Pro

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:peptide derived
from natural sequence, useful for antiserum
production

<400> 7

Trp Val Ser Gln Pro Pro Glu Ile Arg Thr Leu Glu Gly Ser Cys
1 5 10 15

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:up primer for
NKp30 cDNA amplification

<400> 8

cagggcatct cgagtttccg acatggcctg gatgctgttg 40

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:down primer for
NKp30 cDNA amplification

<400> 9

10

20

30

gactaggatc cgcattgtga ccagccccta gctgaggatg

40

<210> 10

<211> 421

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ttccgacatg gcctggatgc tgttgctcat cttgatcatg gtccatccag gatcctgtgc 60
 tctctgggtg tcccagcccc ctgagattcg taccctggaa ggatcctctg ccttccctgcc 120
 ctgctccttc aatgccagcc aaggagagact ggccattggc tccgtcacgt ggttccgaga 180
 tgaggtgggt ccagggaagg aggtgaggaa tggaaaccca gacttcaggg gccgcctggc 240
 cccacttgct tcttcccggt tctcccatga ccaccaggct gagctgcaca tccgggacgt 300
 gcgaggccat gacgccagca tctacgtgtg cagagtggag gtgctgggcc ttggtgtcgg 360
 gacagggaat gggactcggc tgggtgtgga gaaagaacat cctcagctag gggctggtag 420
 a 421

10

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:down primer for
 NKp30 cDNA amplification

20

<400> 11

gattttattgg ggtcttttga ag

22

<210> 12

<211> 606

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ttccgacatg gcctggatgc tgttgctcat cttgatcatg gtccatccag gatcctgtgc 60
 tctctgggtg tcccagcccc ctgagattcg taccctggaa ggatcctctg ccttccctgcc 120
 ctgctccttc aatgccagcc aaggagagact ggccattggc tccgtcacgt ggttccgaga 180
 tgaggtgggt ccagggaagg aggtgaggaa tggaaaccca gacttcaggg gccgcctggc 240
 cccacttgct tcttcccggt tctcccatga ccaccaggct gagctgcaca tccgggacgt 300
 gcgaggccat gacgccagca tctacgtgtg cagagtggag gtgctgggcc ttggtgtcgg 360
 gacagggaat gggactcggc tgggtgtgga gaaagaacat cctcagctag gggctggtag 420
 agtctctctc cttcgggctg gattctatgc tgtcagcttt ctctctgtgg ccgtgggcag 480
 caccgtctat taccagggca aatgccactg tcacatggga acacactgcc actcctcaga 540
 tgggccccga ggrgtgattc cagagcccag atgtccctag tctcttcaa aagaccccaa 600

30

taaatc

606

<210> 13

<211> 573

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

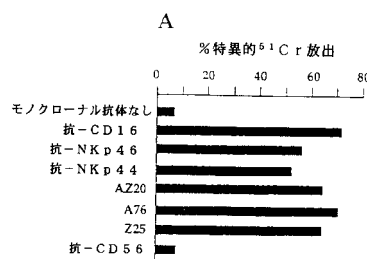
```

atggcctgga tgctgttget catcttgatc atggtccatc caggatcctg tgctctctgg 60
gtgtcccagc cccctgagat tcgtaccctg gaaggatcct ctgccttccct gccctgctcc 120
ttcaatgccg gcccaaggag actggccatt ggctccgtca cgtggttccg agatgaggtg 180
gttccaggga aggaggtgag gaatggaacc ccagagttca ggggcccgcct ggccccactt 240
gcttcttccc gtttctccca tgaccaccag gctgagctgc acatccggga cgtgcgaggg 300
catgacgccg gcattctacgt gtgcagagtg gaggtgctgg gcttgggtgt cgggacaggg 360
aatgggactc ggctgggtgt ggagaaagaa catcttcagc taggggctgg tacagtcctc 420
ctccttcggg ctggattcta tgctgtcagc tttctctctg tggccgtggg cagcacccgc 480
tattaccagg gcaaatgccg ctgtcacatg ggaacacact gccactcctc agatggggcc 540
cgaggrgtga ttccagagcc cagatgtccc tag

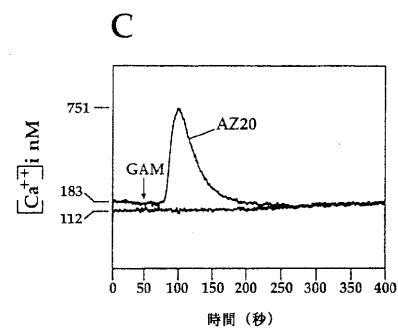
```

10

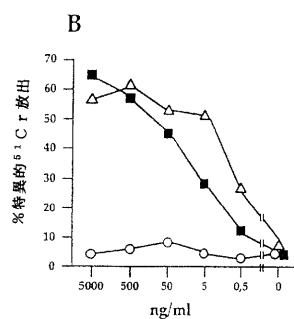
【図 1 A】



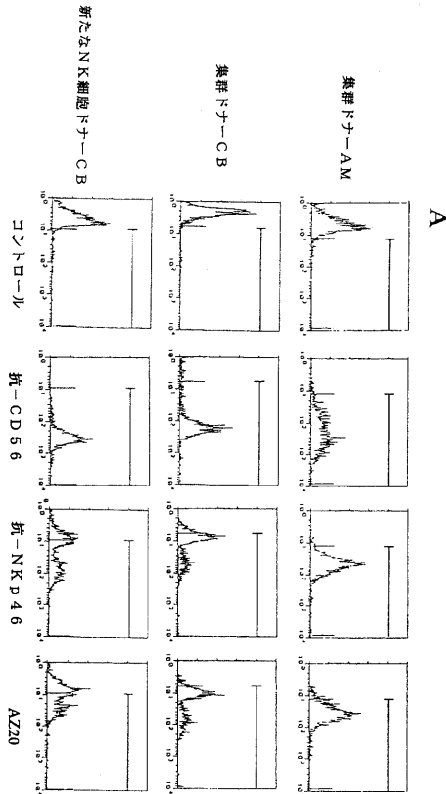
【図 1 C】



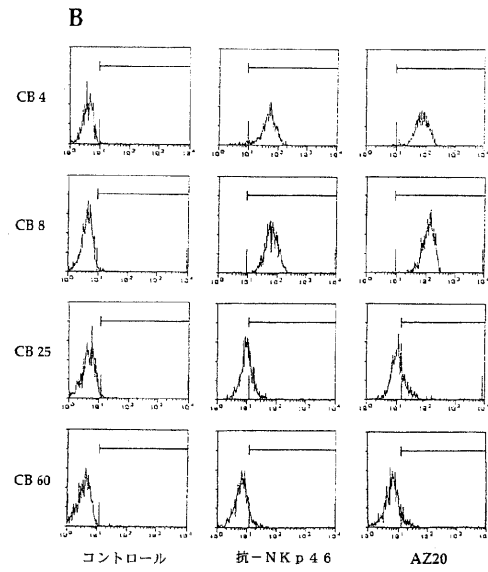
【図 1 B】



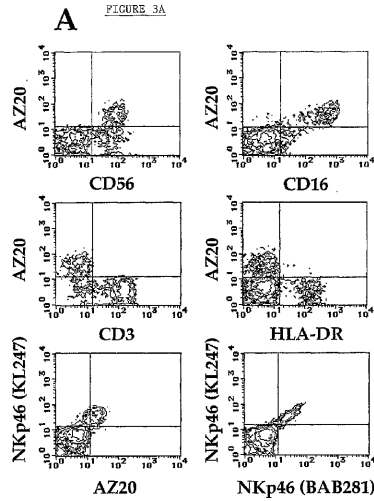
【図 2 A】



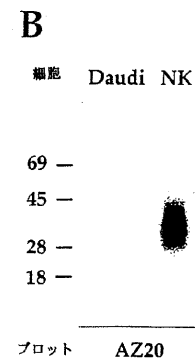
【図 2 B】



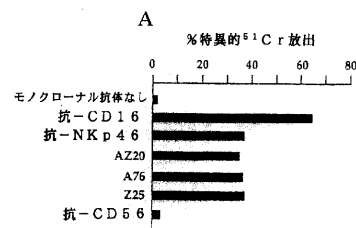
【図 3 A】



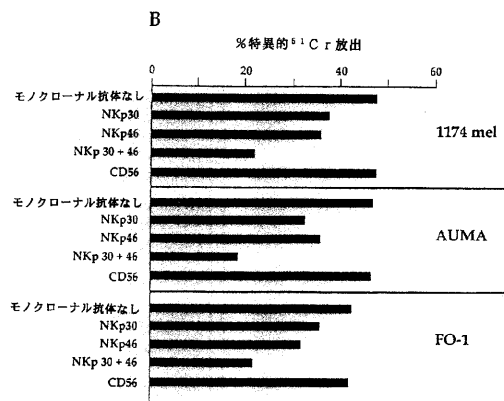
【図 3 B】



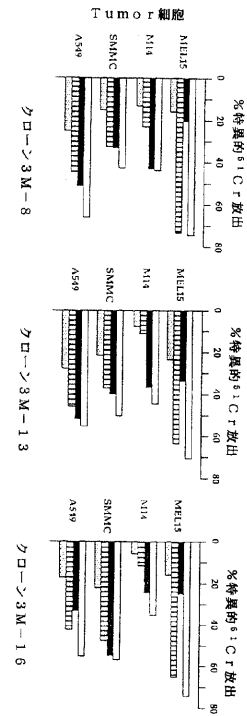
【図 4 A】



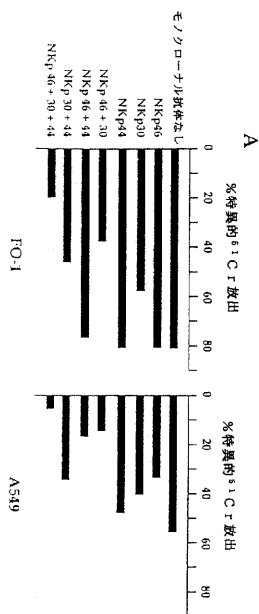
【図 4 B】



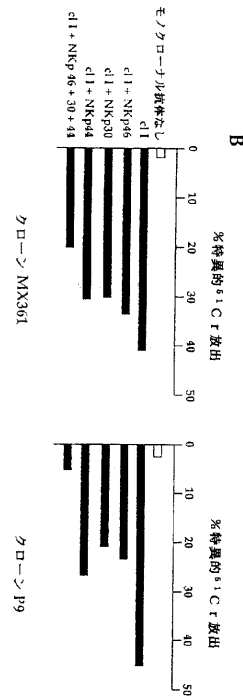
【図 5】



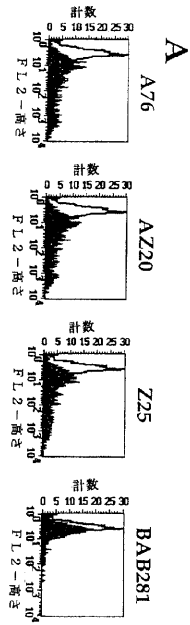
【図 6 A】



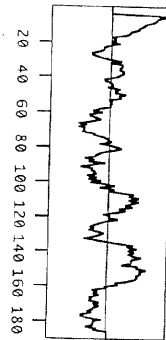
【図 6 B】



【図 7 A】



【図 7 B】



B

配列番号: 2

maxmlllilimhyppscclwvsqpeirltEGSSAFIPQS FHASQRLAI 50

GSVTWREDEVVPKEVRNGTPEFRGLAPLASSRFLHDHQAEIHIDVRG 100

HDASTYVQRYEVLGLGVGTG NGTRLVEKEHPQLGAGTVALLRAGFYAYS 150

FLSVAGSTVYYQKCHIDMGTHCHSSDGRGVIPERRCP 190

【図 7 C】

1 cccctccctcc ccccccagac cccactgtctc agactccctcc cgcacactcgg gacactccctcc

61 gacactggccc ggcctgcctgc gc cgc actactcctcc actccaggacc cctgtgcctcc

121 cgggtgcctcc agccccctga gc cc cctggaaaggac cccctgcctcc cctgtgcctgc

181 cccctccaatg cccagcccaagg gagactcggcc attcggccccc cccctgcctcc cctgtgcctgc

241 gctgtccctcc ggaagcaggc gaggaatggc accccagagt cccagggccgc cctgtgcctcc

301 cctgtccctcc ccccccctcc cccagaccac caggtctgag cgcacactccg ggcactgcga

361 ggcactgacg cccagatctca cctgtgcaga ggtgtgctgc cggccctcgc cctgtgcctcc

421 ggcactgga cctgtgcctgc ggcaggaaga gacacccctc agctcggggc cgtgcactgc

481 ccccccctcc ggcctgcctcc ctactcctgc agctccctcc cctgtgcctcc cctgtgcctcc

541 cctactcacc agggccaatg cccctgtcac atgggaacac actgcactcc cctgtgcctcc

601 cccagaggcg cgtctccaga gcccagctgc cccagctcc cctccaaaaga ccccaatcaa

661 cctgtccctcc cact

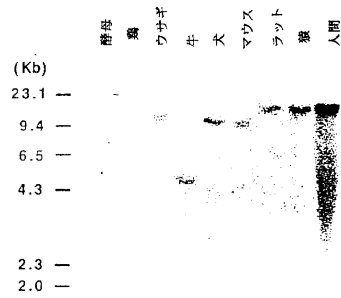
配列番号: 1

【図 8 A】



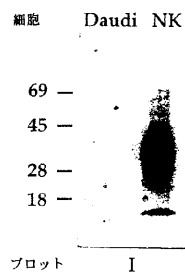
【図 8 B】

B



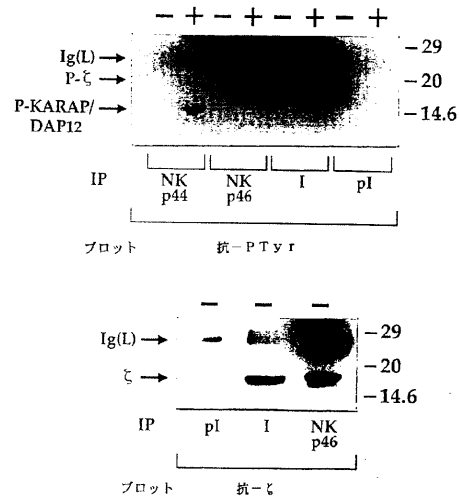
【図 9 A】

A



【図 9 B】

B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	5/07	(2010.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	14/705	(2006.01)
A 6 1 K	35/12	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	37/02	(2006.01)

C 1 2 N	5/00	2 0 2
C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	14/705	
A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	37/02	

(74)代理人 100123788
弁理士 宮崎 昭夫

(74)代理人 100106138
弁理士 石橋 政幸

(74)代理人 100127454
弁理士 緒方 雅昭

(72)発明者 モレッタ、 アレッサンドロ
イタリア国 イー 1 6 1 3 3 ジェノヴァ ヴィア ニッツァ 1 8 / 8

(72)発明者 ボッティーノ、 クリスティーナ
イタリア国 イー 1 6 1 3 3 ジェノヴァ ヴィア ニッツァ 1 8 / 8

(72)発明者 ブラッソーニ、 ロベルト
イタリア国 イー 1 6 1 3 3 ジェノヴァ ヴィア トレ ピーニ 4 3 / 5

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 2 3 8 6 7 (WO, A 1)
国際公開第 9 9 / 0 4 9 8 8 1 (WO, A 1)
特表平 0 9 - 5 0 2 0 8 9 (J P, A)
J. Immunol., Vol. 162, No. 8 (1999. Apr.) p. 4745-4754
Genomics, Vol. 31, No. 2 (1996) p. 215-222
J. Exp. Med., Vol. 186, No. 7 (1997) p. 1129-1136
J. Exp. Med., Vol. 187, No. 12 (1998) p. 2065-2072
J. Exp. Med., Vol. 190, No. 10 (1999. Nov.) p. 1505-1516
Transplantation, Vol. 61, No. 9 (1996) p. 1387-1392

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed

专利名称(译)	新的触发受体与人类天然杀伤细胞和具有相同特性的抗体介导的天然细胞毒性有关		
公开(公告)号	JP4776845B2	公开(公告)日	2011-09-21
申请号	JP2001538509	申请日	2000-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	伊纳特医药公司 海胆威赛迪悉热那亚 热那亚大学		
申请(专利权)人(译)	An'nato制药上课.A.居. Univerushita迪热那亚		
当前申请(专利权)人(译)	An'nato制药上课.A.居. Univerushita迪热那亚		
[标]发明人	モレッタアレッサンドロ ボッティーノクリスティーナ ブラッソーニロベルト		
发明人	モレッタ、アレッサンドロ ボッティーノ、クリスティーナ ブラッソーニ、ロベルト		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/577 C07K16/28 C12P21/08 C12N5/07 C12N15/09 C07K14/705 A61K35/12 A61K39/395 A61P37/02 A61K35/14 A61K38/00 A61P1/16 A61P11/00 A61P17/00 A61P31 /00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/735 C07K16/46 C07K17/00 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/12 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 A61P11/00 A61P17/00 C07K14/70503 C07K16/2803 C07K2317/34		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N33/577.B C07K16/28 C12P21/08 C12N5/00.202 C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 A61K35/12 A61K39/395.D A61P37/02		
代理人(译)	宫崎昭雄 绪方明		
优先权	09/440514 1999-11-15 US 2288307 1999-11-15 CA		
其他公开文献	JP2003523735A5 JP2003523735A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及称为NKp30的新化合物，其被所有成熟NK细胞选择性表达并且作为活化受体参与人类天然细胞毒性，涉及结合NKp30结构的新抗体，及其药物和医药用途。

C】

C

