

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 516130

(P2003 - 516130A)

(43)公表日 平成15年5月13日(2003.5.13)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395			N 4 B 0 6 3
		A 6 1 L 27/00	U 4 B 0 6 4
A 6 1 L 27/00		A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 1
A 6 1 P 37/02		C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 61数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 537364(P2001 - 537364)

(86)(22)出願日 平成12年11月10日(2000.11.10)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月10日(2002.5.10)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/03137

(87)国際公開番号 W001/034653

(87)国際公開日 平成13年5月17日(2001.5.17)

(31)優先権主張番号 99/14241

(32)優先日 平成11年11月12日(1999.11.12)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 コミッサリア ア レネルジ アトミック
COMMISSARIAT A L ' E
NERGIE ATOMIQUE
フランス、エフ - 75015 パリ、リュ ド
ラ フェデラシオン 31 - 33

(72)発明者 キルスゼン - バウム , マレク
フランス、エフ - 75005 パリ、リュ ドゥ
グリル 2

(72)発明者 ル ディスコルデ , マゲリ
フランス、エフ - 75011 パリ、リュ サン
- サビ 66

(74)代理人 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リンパ系線の造血幹細胞及びN K細胞の表面に存在するタンパク質ならびにその使用

(57)【要約】

この発明は、リンパ球様細胞系及び成熟NK細胞の造血幹細胞表面に存在するタンパク質、その相当する単離されたcDNA配列及び細胞のマーカーならびに該タンパク質に対する抗体を調製するためのその使用に関する。また、この発明は、該タンパク質を表面で発現する細胞を選択するための抗体の使用に関する。単離されたタンパク質は、配列SEQ ID NO:2に対して、位置21~152に局在する細胞外ドメイン、位置153~295に局在する5個のトランスメンブランドメイン及び位置296~350に局在する細胞質ドメインからなり、約36~38 kDaの見かけ分子量を有する構造(a)、及び構造(a)のN末端に、20アミノ酸シグナル配列を含み、SEQ ID NO:2のタンパク質及び配列SEQ ID NO:2と少なくとも 70%の同一性又は少なくとも 85%の類似性、好ましくは少なくとも95%の同一性又は少なくとも 99%の類似性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質からなる群から選択されるその前駆体を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 - 全てのリンパ始原細胞と全ての成熟NK細胞の表面に存在し、

- 配列SEQ ID NO:2に対して、位置21～152に局在する細胞外ドメイン、位置153～295に局在する5個のトランスメンブランドメイン及び位置296～350に局在する細胞質ドメインからなる構造(a)を有し、
- 約36～38 kDaの見かけ分子量を有し、かつ
- 構造(a)のN末端に20アミノ酸シグナル配列を含むその前駆体が、SEQ ID NO:2のタンパク質、及び配列SEQ ID NO:2と少なくとも70%の同一性又は少なくとも85%の類似性、好ましくは少なくとも95%の同一性又は少なくとも99%の類似性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質からなる群から選択されることを特徴とする、単離されたタンパク質。

【請求項2】 式SEQ ID NO:25のタンパク質、及びその細胞外ドメインが配列SEQ ID NO:6、7又は24のフラグメントからなる他の哺乳動物タンパク質からなる群から選択されることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】 請求項1又は2に記載されるタンパク質の細胞外ドメインについて7～132個の連続的なアミノ酸を含むフラグメント、該タンパク質のトランスメンブランドメイン内に含まれる7～143個の連続的なアミノ酸からなるフラグメント、該タンパク質の細胞質ドメインに含まれる7～54個の連続的なアミノ酸からなるフラグメント及び配列SEQ ID NO:4のフラグメントからなる群から選択されることを特徴とする、タンパク質フラグメント。

【請求項4】 配列SEQ ID NO:6、7、8、9及び24からなる群から選択されることを特徴とする、請求項3に記載のタンパク質フラグメント。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1つに記載されるタンパク質、又はこのタンパク質のフラグメントに対するものであることを特徴とする抗体。

【請求項6】 請求項3及び4のいずれか1つに記載のフラグメントの1つ、好ましくは配列SEQ ID NO:7のフラグメントに対するものであることを特徴とする、請求項5に記載の抗体。

【請求項7】 モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体から選択される

ことを特徴とする請求項5又は請求項6に記載の抗体。

【請求項8】 請求項1～4のいずれか1つに記載のタンパク質、又はそのタンパク質フラグメントをエンコードすることを特徴とする、単離及び精製されたcDNA。

【請求項9】 配列SEQ ID NO:1、3、5、10、11、12、13ならびに23及びSEQ ID NO:16-20からなる群から選択されることを特徴とする請求項8に記載の単離及び精製されたcDNA。

【請求項10】 - 生物学的試料を、請求項5～7のいずれか1つに記載の抗体と接触させ、かつ
- 抗体に結合する細胞を除くこと
からなる、異種細胞群からなる生物学的試料からKLIP-1+細胞を選択的に除く方法。

【請求項11】 抗体が固体支持体に結合されていることを特徴とする、請求項10に記載の除去方法。

【請求項12】 - 異種細胞群からなる試料を、請求項5～7のいずれか1つに記載の抗体と接触させ、かつ
- 細胞-抗体複合体の形成を検出すること
からなることを特徴とする、異種細胞群においてNK細胞及び/又はリンパ細胞始原細胞を検出及び/又は定量及び/又は単離する方法。

【請求項13】 試料が骨髄、臍帯血、胎児肝又はいずれかの他の胎児もしくは成体の造血組織からなるときに、抗体と複合体を形成した細胞を、プレ-B細胞に特異的な抗体(抗-CD19抗体又は抗-CD10抗体)及び/又はプレ-T細胞に特異的な抗体(抗-CD3抗体、抗-CD4抗体又は抗-CD8抗体)と接触させてもよいことを特徴とする、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 医薬品、特に自己免疫疾患の治療に用いるための請求項5～7のいずれか1つに記載の抗体。

【請求項15】 移植可能な製品を製造するための、請求項10又は請求項11に記載の方法を用いて得られる、NK細胞及び/又はリンパ始原細胞を涵濁した骨髄、臍帯血、胎児肝又はいずれかの他の胎児もしくは成体の造血組織の細胞

の使用。

【請求項16】 請求項8及び9のいずれか1つに記載される核酸配列を生物学的試料中に検出することからなることを特徴とする、良性及び悪性の血液疾患の診断方法。

【請求項17】 検出を行うのに適した有用な量の緩衝液に加えて、免疫吸着固体支持体に任意に接合した、請求項5～7のいずれか1つに記載のKLIP-1抗原又はこの抗原のフラグメントに対する適当な用量の抗体及び形成された可能性のある細胞-抗体複合体を示す適当な用量の試薬からなることを特徴とする、NK細胞及び/又はリンパ球様始原細胞(プレ-B、プレ-T及びプレ-NK)の検出及び/又は定量及び/又は単離のためのキット。

【請求項18】 細胞外ドメインの少なくとも7個の連続的なアミノ酸からなる、NK細胞の検出用試薬としての請求項1又は請求項2に記載のタンパク質フラグメントの使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

この発明は、リンパ系線の造血幹細胞(プレ-T細胞、プレ-B細胞及びプレ-NK細胞)及び成熟NK細胞の表面に存在するタンパク質、相当する単離されたcDNA配列、及び該細胞のマーカースとしてのならびに該タンパク質に対する抗体を調製するためのその使用に関する；この発明は、表面で該タンパク質を発現する細胞を選択する上での該抗体の使用にも関する。

このような抗体は、骨髄移植の拒絶及びGVHDを低下させるため、骨髄移植前にNK細胞の潤滑している骨髄又は臍帯血で特に用いられる。

NK細胞は、末梢血単核細胞の10～15%を占める。それらは、B及びT細胞とともに第三リンパ球性線を構成することが認められている；それらは、CD3分子錯体やTレセプターの、鎖のいずれの表面でも発現せず、ヒトでCD16及びCD56のマーカース、マウスでNK1.1/NK2.1を有し、標的細胞表面でクラスIもしくはIIのMHC抗原の発現を要しない細胞溶解作用を発揮する、大きな顆粒状リンパ球(LGL)として明らかにされている。

【0002】

リンパ系線の祖先(プレ-T細胞、プレ-B細胞及びプレ-NK細胞)及び成熟NK細胞によってのみ発現される表面抗原は、知られていない。2つのマーカースが、特に他のリンパ球群からNK細胞を識別するのに使用される。それらはCD56抗原及び免疫グロブリンFcフラグメントに対して親和性の低いレセプター、つまりCD16である。

大部分のNK細胞はCD3-、CD16+、CD56+であると考えられるが、表現型と機能上の大きな異種がこの細胞群に存在する；大部分の末梢血CD56+リンパ球も、CD16分子を発現する；約10%の末梢血NK細胞はCD16-であるが、同時に高密度でCD56を発現する。CD16-、CD56^強リンパ球は、CD16+、CD56^弱NKリンパ球の前駆体であることが示唆されている。

【0003】

しかし、幾つかのT細胞はCD16分子とCD56分子の双方を発現するので、これらの2分子は末梢血NK細胞群に特異的ではない。

NK細胞は天然の細胞溶解活性を示す。これは、事前の免疫化なしに直接発揮され、標的細胞上での主要な組織適合性複合抗原の存在及び抗体依存性細胞媒介細胞毒性(ADCC)を要しない。ADCCは、標的細胞に結合した抗体がエフェクター細胞のFcレセプター(CD16)と結合することによって生じる。したがって、NK細胞は、ウイルス感染に対する宿主の防御及び腫瘍細胞に対する免疫サーベイランスにおいて重要な役割を果たす。

NK細胞は、同種異系移植での移植片拒絶、また移植片対宿主疾患(GVHD)の一因となる異質認識(allorecognition)の始原形態を誘発し得る。これらの理由のため、単核細胞群におけるNK細胞及びリンパ系線前駆体細胞全体についての信頼性ある同定が、重要である。

【0004】

幾つかの文献は、骨髄のNK細胞を潤渇させるための方法を提案している；これらの種々の方法で、NK細胞は、CD56、CD16、PEN5 又は NKB1のようなマーカーを用いて選択されている：

* PCT国際出願WO 95/20604 は、NK細胞とT細胞に存在する抗原を記載している。この抗原は、NKB1と命名された。この抗原に対するモノクローナル抗体も記載されている(DX9 抗体)。このNKB1マーカーは、以下の特性を有する：

- DX9抗体に特異的に結合する、
- 約50 kDaの分子量を有する、
- グリコシル化タンパク質である；グリコシル化タンパク質の分子量は、約70 kDaである、
- 天然形態のタンパク質はシアル酸残基を含み、特にリン酸化される、
- NKB1マーカーは、NK細胞のサブセット及びT細胞のサブセットによって発現される。

【0005】

* PCT国際出願 WO 95/06247 は、それぞれ120-150及び210-245 kDaの見かけ分子量を有し、PEN5 及び PEN5 と示される、一対の糖タンパク質形態のNK細胞-特異的抗原を記載している。

糖タンパク質のPEN5 /PEN5 対のユニークエピトープは、好ましくは表現型C

D16+、CD56^{dim}の末梢血NK細胞の亜群によって発現される；それらは、CD3+ Tリンパ球又はCD20+ Bリンパ球に存在しない。

これらの方法は、CD56+、CD16+ 成熟NK細胞又はPEN5、NKB1早熟NK細胞を淘汰させるが、移植後、移植片拒絶を引起す成熟細胞に分化し得る始原細胞を淘汰しない。

他の文献は、特異的なマーカーの欠落を追認している；例えば、E. Dominguezらによる文献(Immunol., 1998, 94, 109-114)では、NK細胞に対するユニークなマーカーがはまだ同定されておらず、通常は、それらがCD56を発現するという事実によって識別されることが述べられている。

【0006】

まずNK細胞に対して、次に全てのリンパ系線始原細胞に対して特異的なマーカーがないことは、この一連の文献から明らかである。

したがって、出願人は、特に骨髄移植前に、骨髄移植の拒絶及びGVHDを低下させることを目的として、骨髄のリンパ系線前駆体細胞(プレ-NK、プレ-T及びプレ-B細胞)及び成熟NK細胞を特に淘汰させるため、成熟NK細胞及びリンパ系線の全ての未分化細胞に特異的なマーカーを提供することを目的とした。

実際、驚くべきことに、発明者らは、全てのリンパ始原線(プレ-T、プレ-B及びプレ-NK線)及び成熟NK細胞の双方に特異的なマーカーが存在することをここに見出した。

【0007】

この発明の対象は、

- 全てのリンパ始原細胞と全ての成熟NK細胞の表面に存在し、
- 配列SEQ ID NO:2に対して、位置21～152に局在する細胞外ドメイン、位置153～295に局在する5個のトランスメンブランドメイン及び位置296～350に局在する細胞質ドメインからなる構造(a)を有し、
- 約36～38 kDaの見かけ分子量を有し、かつ
- 構造(a)のN末端に20アミノ酸シグナル配列を含むその前駆体が、SEQ ID NO:2のタンパク質、及び配列SEQ ID NO:2と少なくとも70%の同一性又は少なくとも85%の類似性、好ましくは少なくとも95%の同一性又は少なくとも99%の類似

性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質からなる群から選択されることを特徴とする、単離されたタンパク質である。

【0008】

用語「前駆体」は、シグナル配列を含むタンパク質を意味する。

基準配列に対する配列の「同一性」は、互いに最大に一致するように2つの配列をアラインした際に、同一のアミノ酸残基の割合の関数として評価する。

基準配列との同一性が少なくとも X%のアミノ酸配列を有するタンパク質は、この発明において、配列が基準配列の100アミノ酸当り100-X個までの修飾を含みうるタンパク質として定義される。この発明の目的のため、用語「修飾」は、基準配列におけるアミノ酸の連続的な又は散在する欠失、置換もしくは挿入を含む。

基準配列に対する配列の「類似性」は、互いに最大に一致するように2配列をアラインした際に、同一であるか、又は同類置換によって異なるアミノ酸残基の割合の関数として評価する。この発明の目的のため、用語「同類置換」は、あるアミノ酸を、一般的にはタンパク質の機能特性を変えない、類似の化学特性(大きさ、電荷又は極性)を有する別のアミノ酸で置換することを意味する。

【0009】

基準配列との類似性が少なくとも X%のアミノ酸配列を有するタンパク質は、この発明で、配列が基準配列の100アミノ酸当り100-X個までの非保存修飾を含み得るタンパク質として定義される。この発明の目的のため、用語「非保存修飾」は、基準配列におけるアミノ酸の連続的な又は散在する欠失、非保存置換又は挿入を含む。

幾つかの文献は、この発明によるタンパク質とあるホモロジーを有するタンパク質を記載している：

- PCT出願WO 98/39448 (Human Genome Sciences Inc)は、潜在的に分泌タンパク質(核酸配列: SEQ ID NO:187、ペプチド配列: SEQ ID NO:489)をエンコードする、遺伝子177、クローンHE9CM64を記載している；しかし、mRNAは、脳に、より少量で腎臓、胎盤、平滑筋、心臓及び肺に認められるにすぎない。mRNAで潜在的にエンコードされるタンパク質は単離されておらず、変化し得るN-及びC-末端で

明らかにされていない実際の機能はこのタンパク質に伴っていない。

【0010】

- PCT国際出願 WO 98/25959(Chiron Corp.) とWO 99/31236 (Genset)、また No. Q9Y3U9でSWALL DATABASEにアクセス可能な配列に関する情報、又はNo. AW106427で EMBL DATABASEにアクセス可能な配列に関する情報は、配列SEQ ID NO:2のフラグメントとホモロジーを有する配列フラグメントを記載している;しかし、係属中の出願では、ホモロジーは完全な配列SEQ ID NO:2に対して明らかにされている;さらに、これらの文献は、初期リンパ系線始原細胞及び成熟NK細胞に対する表面マーカーであるタンパク質を全く開示していない。

具体的には、この発明によるタンパク質は以下の特性を有する:

- 極めて初期の始原細胞から成熟細胞毒性細胞までにわたるNK細胞の分化線(differentiation line)の細胞、及びリンパ系線の他の初期始原細胞(プレ-B及びプレ-T)の表面に存在する、
- 還元条件下12%ゲルのSDS-PAGE電気泳動によって測定される約 36~38 kDaの見かけ分子量を有する、
- 少なくとも 配列SEQ ID NO:6、7 又は24を有する細胞外ドメインを含む、及び
- 細胞外ドメイン、5個のトランスメンブランドメイン及び細胞質ドメインからなる構造を有する;式SEQ ID NO:25 を有するタンパク質(330アミノ酸からなるヒトタンパク質)、及び細胞外ドメインが配列SEQ ID NO:6、7 又は24のフラグメントからなる他の哺乳動物タンパク質からなる群から選択することが好ましい。

【0011】

したがって、KLIP-1 抗原と命名される表面の分子又はタンパク質は、極めて初期の始原細胞から細胞毒性成熟細胞までにわたるNK細胞分化線、またリンパ線の他の初期始原細胞(プレ-B及びプレ-T)に特異的に存在する。

ヒトSEQ ID NO:2に対して、アミノ酸1-20はシグナル配列に一致し;アミノ酸21-152 (ヒトSEQ ID NO:7; マウスSEQ ID NO:24; ブタ SEQ ID NO:6)は細胞外ドメインに一致し; アミノ酸153-295 (SEQ ID NO:8)は5個のトランスメンブランドメイン(143アミノ酸) に一致し、アミノ酸296-350 (SEQ ID NO:9)は細胞質ドメイ

ン(54アミノ酸)に一致する。

以下の細胞が、KLIP-1+である：

- . 骨髄、臍帯及び胎児肝のCD34+、CD38- 初期造血始原細胞、
- . CD34+、CD38+ 分化始原細胞
- . CD4+、CD8+ プレ-T 始原細胞 (新生児胸腺)
- . CD19+、CD10-、CD20- プレ-B 始原細胞
- . CD56+、CD16+、CD19-、CD3-、D33- 成熟NK細胞。

【0012】

このKLIP-1抗原が最も初期の始原細胞と分化始原細胞及び成熟NK細胞のいずれにも存在するという事実から、抗-KLIP-1抗体の存在下で骨髄のNK-細胞涸渴を生じさせ、移植片拒絶についてのより良い予防と、自己免疫疾患に対する潜在的な治療を行うことができる。

上記の KLIP-1 抗原は、NK細胞(初期及び成熟)に特異的なマーカー、特に成熟細胞に特異的なマーカーであると考えられる。というのは、末梢血では、リンパ系線の他の細胞(成熟B細胞及びT細胞)は、このような抗原を示さないからである。

【0013】

また、この発明の対象は、タンパク質の細胞外ドメインについて7~132個の連続的なアミノ酸を含むフラグメント、タンパク質のトランスメンブランドメイン内に含まれる7~143個の連続的なアミノ酸からなるフラグメント、及びタンパク質の細胞質ドメインに含まれる7~54個の連続的なアミノ酸からなるフラグメント及び配列SEQ ID NO:4のフラグメントからなる群から選択されることを特徴とするタンパク質のフラグメントである；フラグメントのうち、配列SEQ ID NO:6、7、8、9 及び24が挙げられる。

この発明の対象は、ヒト又は動物由来の、上記のようなタンパク質又はそのフラグメントをエンコードする単離された核酸配列(特に、cDNA配列)、また相補的な核酸配列である。

【0014】

これらの配列には、以下が挙げられる：

- 配列SEQ ID NO:1 を有し、1501 bp からなる、ヒトKLIP-1抗原をエンコードするcDNA; それは、第6染色体に、領域6p21.2-6p21.1で局在するklip-1遺伝子から得られる;
- 配列SEQ ID NO:1 の116~1165塩基のあいだのヒトKLIP-1 タンパク質をエンコードする配列(SEQ ID NO:10);
- ヒト(SEQ ID NO:11)、マウス(SEQ ID NO:3 及び SEQ ID NO:23) 又はブタ(SEQ ID NO:5)のKLIP-1 タンパク質の細胞外ドメインをエンコードする配列;
- ヒトKLIP-1タンパク質のトランスメンブランドメインをエンコードする配列(SEQ ID NO:12); 5個のトランスメンブランヘリックスの位置は153-169、181-209; 218-237、243-261 及び275-295である; 及び
- ヒトのKLIP-1タンパク質の細胞質ドメインをエンコードする配列(SEQ ID NO:13)。

【0015】

また、この発明の対象は、上記のような少なくとも 8bpの種々のcDNA配列からなることを特徴とする、核酸フラグメントである。このようなフラグメントは、例えば配列 SEQ ID NO:16-20の増幅又は逆転写のためのプローブもしくはプライマーとして特に使用できる。

また、この発明の対象は、極めて初期の始原細胞から細胞毒性成熟細胞にわたるNK細胞の分化線、及びリンパ系腺の他の初期始原細胞(プレ-B及びプレ-T) に特異的な、この発明によるKLIP-1 表面抗原、又はこの抗原フラグメントを特異的に認識することを特徴とする抗体である。

この抗体の有利な具体例によれば、それらは、KLIP-1抗原の上記領域の1つ、好ましくはKLIP-1 タンパク質の細胞外ドメインに対する。

【0016】

この発明によれば、抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれかである。

加えて、抗-KLIP-1抗体は、リンパ系線始原細胞(プレ-B 及びプレ-T)を枯渇させることもできる。

骨髄移植では、この発明による抗体、フラグメント及び誘導体を用いて、ドナ

一の骨髄を被移植者の骨髄に移植する前に、ex vivoで骨髄のKLIP-1+ 細胞を潤湯させてもよい。

現在、初期NK細胞に対するマーカーは存在しない：したがって、KLIP-1は、完全なNK細胞分化線及び他の初期リンパ系線の双方に存在する第一マーカーとなる。

【0017】

また、この発明の対象は、

- 生物学的試料を、極めて初期の始原細胞から細胞毒性成熟細胞までにわたる、NK細胞分化線及びリンパ系線の他の初期始原細胞(プレ-B 及びプレ-T)に特異的な、この発明による表面分子、又はこの分子フラグメントに対する抗体と接触させ、かつ

- 抗体に結合する細胞を除くこと

からなる、異種細胞群からなる生物学的試料からKLIP-1+ 細胞を選択的に除く方法である。

この方法の有利な具体例によれば、抗体は、磁気ビーズ又は他の免疫吸着支持体(例えばCNBr セファロース)のような固体支持体に結合される。

【0018】

この具体例によれば、細胞表面にKLIP-1抗原を含む細胞の生物学的試料、特に骨髄、臍帯血又は胎児肝を潤湯させるために、これらの細胞は、抗-KLIP-1抗体、好ましくはKLIP-1タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体で被覆した免疫磁気ビーズに結合される。

有利には、方法は、胎児肝、臍帯血、胎児、新生児もしくは成体の骨髄又は末梢血に由来するヒト細胞混合物を用いて、生物学的試料のヒトの成熟又は始原NK細胞を豊富にするために行ってもよい。

また、この発明の対象は、移植可能な製品を製造するために、上記の方法を用いて得られる、NK細胞及び/又はリンパ始原細胞の潤湯した、骨髄、臍帯血、胎児肝又は何れかの他の胎児もしくは成体の造血組織の細胞の使用である。

【0019】

この発明の対象は、

- この発明による、KLIP-1タンパク質又はこのタンパク質のフラグメントに対する抗体と異種細胞群からなる生物学的試料を接触させ、かつ
- 特に標準的な免疫学的方法を用いて細胞-抗体複合体の形成を検出することからなるのを特徴とする、異種細胞群におけるNK細胞及び/又はリンパ細胞始原細胞(プレ-B、プレ-T及びプレ-NK)の検出及び/又は定量及び/又は単離方法である。

この方法の有利な具体例によれば、試料が骨髓、臍帯血、胎児肝又はいずれかの他の造血組織(胎児又は成体)からなるときは、抗体と複合体を形成した細胞を、プレ-B細胞に特異的な抗体(抗-CD19抗体又は抗-CD10抗体)及び/又はプレ-T細胞に特異的な抗体(抗-CD3抗体、抗-CD4抗体又は抗-CD8抗体)と接触させてもよい。

【0020】

この発明の対象は、自己免疫疾患の治療における上記抗体の使用でもある。

また、この発明の対象は、上記核酸配列を検出することからなることを特徴とする、生物学的試料における良性及び悪性の血液疾患の診断方法である。

具体的には、KLIP-1 遺伝子の発現調節及び/又は該遺伝子配列の突然変異の測定により、血液病を診断することができる。

また、この発明の対象は、検出を行うのに適した有用な量の緩衝液に加えて、免疫吸着固体支持体に任意に接合した、この発明によるKLIP-1 抗原又はこの抗原のフラグメントに対する適当な用量の抗体及び形成される可能性のある細胞-抗体複合体を示す適当な用量の試薬からなることを特徴とする、NK細胞及び/又はリンパ球様細胞始原(プレ-B、プレ-T 及びプレ-NK)の検出及び/又は定量及び/又は単離のためのキットである。

【0021】

また、この発明の対象は、上記のような細胞外ドメインの少なくとも7個の連続的なアミノ酸からなるこの発明によるタンパク質フラグメントの、NK細胞検出用試薬としての使用である。

上記の例のほかに、この発明は、この発明の対象である方法の実施例及び添付図面に言及する以下の記載から明らかになるであろう他の例も含む。

【0022】

- 図1は、RNA 示差ディスプレイ(RDD)を示す；この図で、レーン1は卵黄嚢に相当し、レーン2-5は胎児肝に相当し、かつレーン6はコントロールに相当する；
- 図2は、ヒトKLIP-1ヌクレオチド及びタンパク質の配列を示す；図2'は、トランスメンブラン部位についてのモデルを示す；
- 図3は、KLIP-1遺伝子の染色体位置を示す；
- 図4は、ヒトKLIP-1タンパク質(12 kDa)の細胞外ドメインからなる融合タンパク質の発現の誘導を示す；
- 図5は、KLIP-1+ 及び KLIP-1- 群におけるウエスタンブロットを示す；
- 図6は、インビトロで転写され、翻訳されたタンパク質の免疫沈降を示す；
- 図7は、成熟血細胞のみを含む、末梢血におけるKLIP-1+ 細胞の分布を示す；

【0023】

- 図8は、大部分の成熟血球のみならず、小さな画分の未熟細胞を含む、臍帯血におけるKLIP-1+ 細胞の分布を示す；
- 図9は、血球の分化が生じる造血部位である骨髄でのKLIP-1+ 細胞の分布を示す；
- 図10は、胚肝臓でのKLIP-1+ 細胞の分布を示す(6週)；
- 図11は、新生児の胸腺におけるKLIP-1+ 細胞の分布を示す；
- 図12は、NK細胞及びKLIP-1+で精製したNK群(標的細胞)の細胞溶解特性を示す；
- 図13は、ブタの末梢血におけるKLIP-1+ 細胞の分布を示す；かつ
- 図14は、NK細胞であると考えられるマウスの脾細胞におけるKLIP-1+ 細胞の分布を示す(NK 1.1 抗体(Pharmlngen)との複合体の形成)。

【0024】

しかし、これらの実施例が、この発明の対象を例示するものに過ぎず、いかなる方法でもそれを限定するものではないことは、明らかに理解されるべきである。

実施例:

- 細胞及び組織の方法

ヒトの胚組織を、フランスの立法にしたがって、妊娠終期のボランティアから得た。計画は地元の倫理学委員会により承認され、全ての母親から事前のインフォームドコンセントが得られた。それぞれの胚の(妊娠期間の)発達段階は、解剖学的基準により決定した。卵黄嚢、内臓葉(AGM領域)を有する背動脈及び肝臓を双眼レンズ下で切開し、RNAの抽出用にすぐに調製するか、あるいは液体窒素で凍結し、-80 で保存した。胚の発達段階が多岐にわたるために、切開した組織を個別に処理し、混合しなかった。

臍帯血は、月満ちて生まれた直後の健康状態が良好(健康)な新生児から、母親の同意を得て回収した。

骨髄及び末梢血は、正常な大人のドナーから施設のガイドラインにしたがって回収した。単核細胞は、標準的な条件下、フィコール-ハイパック勾配の遠心分離で得た。正常な出生直後の胸腺細胞は、心臓矯正手術(heart-correcting operation)中に得た胸腺片から溶出して単離した。サイトフローメトリー分析のために、単核細胞を新鮮なまま用いるかあるいは凍結させた。

【0025】

- RNA示差ディスプレイ(RDD)、クローニング及びシーケンシング

全mRNAは、製造者の推薦にしたがって、RNA NOW試薬(Ozyme, France)を用いて調べた組織(新鮮なもの又は凍結したもの)から抽出し、37 で1時間RNase-フリーDNaseI (Boehringer Mannheim, Meylan, France)で処理し、エタノールで沈澱させた。RNAの質を、1.5% アガロース変性ゲルでの電気泳動により確認した。cDNAは、3' アンカープライマーとしての5'-T₁XY (X=A, G 又はC; Y=A, T, G 又はC) (SEQ ID NO:14)及びM-MLVリバーstransクリプターゼ(GIBCO-BRL, Life Technologies, Cergy, France)の存在下、42 で1時間、5 µgの全RNAから調製した。リバーstransPCRによる増幅は、5 µCiの[³²P]-dCTP (Amersham France, Les Ulis, France)の存在下、同じ3'アンカープライマー(アンチセンスプライマー)と5'における10個の任意のヌクレオチド(センスプライマー)で行った。図1に示した結果は、以下のプライマーを用いて得られた: 5'-T₁GG (SEQ ID NO:14) 及び5'-GTTGCGATCC (SEQ ID NO:15)。PCR生成物は、シーケンシング停止緩衝液中で80 で3分熱変性させ、6%ポリアクリルアミド変性ゲルでの電気泳動により分離し

た。ゲルを固定せずに3MM Whatmanろ紙上で乾燥させ、16時間Kodak Biomax フィルム(Amersham France, Les Ulis, France)に曝した。

【0026】

2つの個々の増幅で規則的に異なると思われるバンドを切り出し、ゲルから溶出し、同じ反応条件下で再増幅し(35サイクル)、2%アガロースゲル上で分析し、ベクター-pCRII (TA Cloning Kit, Invitrogen, Leek, The Netherlands)にクローンした。最低40個の個々の組換え体(白色)コロニーを回収し、インサートの有無を、ベクター由来のフランキングプライマーを用いるPCRで試験した。幾つかの組換えプラスミドをミニプレップで増幅し、Qiagen キット(Qiagen, Courtaboeuf, France)を用いて精製し、次いで[³²P]-dCTPで放射線標識した。これらのプラスミドをプローブとして用いて、同様のクローンを除いた。重複していないクローンを、製造者のプロトコル(US Biochemicals, Cleveland, OH)にしたがって、シーケナーゼ(登録商標)2.0及びベクター由来のフランキングプライマーの存在下、ジデオキシヌクレオチドを用いる酵素方法(サンガー法)を用いて手動でシーケンスした。配列ホモロジーの検索は、GenBank 及びEMBLデータベース上でINFOBIOGEN/BLAST (<http://www.infobiogen.fr>)を介して行った。

【0027】

- PCR-RDDによる胚の造血組織由来KLIP-1 cDNA (クローンNo. 36-16)の単離
ヒトの胚発生中の遺伝子のプロファイル発現を研究した。32日目のYS (卵黄嚢)及び27日目から49日目までの FL (胎児肝)で示差的に発現される転写物を、PCR-RDD技術を用いて調べた。クローン36-16をRDDゲルから単離し、その示差的な発現を、25日目に強力な発現(卵黄嚢)、32日目に弱い発現(卵黄嚢)及び28日目に強力な発現[AGM (大動脈-性腺-中腎領域)]、28日目(胎児肝)に、続いて後期段階の発現の低下(胎児肝)により確認した。

【0028】

- 完全なcDNAのクローニング及び推定されるタンパク質の解析
ベクター pACT2におけるヒトの肺cDNAライブラリー(Plasmid MATCHMAKER Library, Clontech, Paris, France)を用いた。36-16 cDNAクローンは、Hybond N+ナイロン膜でのハイブリダイゼーション用プローブとしての³²P-ラベル化255 bp 3

6-16インサートを用いて、 1×10^6 個のcDNAライブラリーコロニーをスクリーニングして得られた。陽性のクローンは、ベクター由来のフランキングプライマーを用いるPCRで試験し、放射線標識した36-16インサートでのハイブリダイゼーションにより確認された。2つのクローンは陽性のハイブリダイゼーションシグナルと、ノーザンブロットングの結果に一致する、約1600 pbの適当な大きさを示した。それらの1つを、蛍光ターミネーター及びApplied Biosystems ABI シーケンサー(Pharmacia, Orsay, France)を用いてサンガー法でシーケンスした。

【0029】

- 完全なKLIP-1 cDNA (36-16) 及び推定タンパク質の特徴づけ

完全なcDNAは1501 bpからなり、115 bp の5' UTRと333 bpの3' UTR を有する1050 bp の単一のオープンリーディングフレームを有する。これは、38.2 kDa の分子量を有し、KLIP-1と称される350アミノ酸タンパク質と推定される (図2)。

KLIP-1 配列の疎水性解析は、5個の強力なTMヘリックスを示唆している(図2')。

つまり、KLIP-1タンパク質は、1~20のシグナルペプチドアミノ酸(aa)、132 aa (21 ~ 152aa)の細胞外ドメイン、143 aa (153-295 aa)の5個のTMドメイン及び54 aa (296 ~ 350aa)のC-末端細胞質テールを有する。

【0030】

- RH (放射線ハイブリッド)染色体マッピング

cDNAクローンは、ハムスター-ヒトキメラ由来の93クローンを含む、GeneBridge4 全ゲノム放射線ハイブリッド(RH)パネル(Research Genetics, Huntsville, AL)に対してPCRによりスクリーンした。各クローンを、以下の条件下: 10サイクルについて、94 °C、45秒; 61 °C、1分; 72 °C、45秒、及び30サイクルについて94 °C、45秒; 58 °C、1分; 72 °C、45秒、72 °C で10分のインキュベーションによる終結で、3' UTR: 1265F (5'-ACCCACCTGAAATTCTTGG) (SEQ ID NO:16) 及び1522R (5'-GAGATAAAGAGGAAGGAAGG) (SEQ ID NO:17)に特異的な2つのプライマーを用いる2つの独立PCR増幅で個々に試験した。PCR生成物及びヒト(陽性)又はハムスター(陰性)コントロールのDNAを含むサザンブロットを、 ^{32}P -ラベル化特異的内部プローブでハイブリダイズし、ストリンジェントな条件、60 °C で0.2X SSC + 0.2% SDS で洗浄し、次いで16時間Kodak Biomax フィルムに曝した。単一の特異的な

ヒトのバンドが、257bpの予定された大きさに認められた。スクリーニングプロフィールから誘導されるハイブリダイゼーションデータは、Genome Research RH Mapper Server (<http://www.genome.wi.mit.edu>)用のWhitehead Institute/MIT Center に提出し、KLIP-1 遺伝子を物理的マーカーにリンクさせた。GeneMap'98 physical map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap>)を用いて、RHマッピング結果に相当するバンドの細胞遺伝学的位置をそれから作った。KLIP-1遺伝子の位置を確認するために、³²P-ラベル化内部プローブ5'-CTGTGGGCACTTCTGAAAGG (SEQ ID NO:18)とハイブリッドした、3' UTRのKLIP-1に特異的なプライマー1265F (SEQ ID NO:16) と1522R (SEQ ID NO:17)でのPCR増幅を、マーカーD6S271とD6S459をそれぞれに含むYAC クローン 907_H_2 及び 939_E_12 (Centre d'Etudes du Polymorphisme Humain [Center for Studies on Human Polymorphism], Paris, France)で行った。これらのマーカーは、第6染色体上のKLIP-1領域及びマーカーAFM136YD12を取り囲んだ。ゲノムDNAと第1染色体(D1S444)に局在するYACクローン979#B#3は、それぞれ陽性及び陰性のコントロールとして用いた。

【0031】

- RHキメラパネルのタイピングによる、KLIP-1 遺伝子(36-16)の染色体の位置付け

マッピング解析は、GeneBridge4の構造マーカーD6S271とAFM165YD12のあいだのKLIP-1配列、それぞれLOD 1.08においてD6S271からの5.66 cR及びAFM65YD12からの2.84 cRに局在する。

細胞遺伝学的なバンドの位置に関連したGeneMap'98 physical mapは、第6染色体の6p21.1-6p21.2にKLIP-1遺伝子を位置付けた。それぞれマーカーD6S271 及びAFM165YD12を含むCEPH YAC クローンNo. 907_h_2 及び No. 939_e_12のRHキメラに用いられるプライマーでのPCR増幅により、この位置が確認される(図3)。

【0032】

- 組換えKLIP-1タンパク質の発生

プライマー180F: 5'-TCGAAGAAAACATCCAGGGC (SEQ ID NO:19) 及び 556R: 5'-AGAGGTCATAGAGTTCCACC (SEQ ID NO:20)でのPCR増幅後に得られるcDNAは、22-156位置に134 aa の細胞外タンパク質をエンコードする。PCR生成物は、His6x-タグ

pQE-31 発現ベクター(QIAexpress System, Qiagen, Courtaboeuf, France)に連結し、次いでリプレッサープラスミド pREP4を有するM15株に形質転換した。構築物及び陽性の形質転換体を、正確な挿入及びインフレーム保存のため、直接的なシーケンシングでスクリーンした。IPTGで誘導された12 kDa のHis6X-タグタンパク質(図 4A)を変性条件下、Ni-NTAアガロースで精製し、12%のSDS/PAGEゲルにクマシーブルー染色して視覚化した(図4B)。

【0033】

- KLIP-1ポリクローナル抗体の発生と精製

抗体(Ab)は、不完全フロイントアジュバント中100 µlの精製した12kDaの組換え細胞外タンパク質で、毎月ホワイトニュージーランドラビットを免疫化して発生させた。3回の注射後、血清を回収し、Hitrap タンパク質G アフィニティカラム(Pharmacia Biotech, Orsay, France)を用いて全てのIgGを精製し、固定化した大腸菌溶解物(Pierce, Rockford, IL)を用いて、非特異的な抗-大腸菌のウサギ抗体を除いた。

【0034】

- ウェスタンブロッティングによる明示

全骨髄又はKLIP-1+ 細胞及び帯血単核細胞の豊富な骨髄を、50 mM Tris (pH 6.8)、10% グリセロール、2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール及び0.02%プロモフェノールブルーを含む緩衝液に100 で10分溶解した。タンパク質(3×10^5 細胞の当量)を、12%ゲルでのSDS-PAGE で分離し、Hybond C-Extraニトロセルロース膜(Amersham, Les Ulis, France)にエレクトロトランスファーした。膜を、室温で1時間、1X PBS, 0.2% Tween 20中の低脂肪粉末牛乳でブロックし、PBS中1:5000の抗-KLIP-1抗体、0.2% Tween 20でインキュベートした。洗浄後、プロットをセイヨウワサビパーオキシダーゼ-接合ヤギ抗-ウサギ抗体とインキュベートした; 製造者の推薦にしたがってECLシステム(Amersham, Les Ulis, France)を用い、着色させた。図5に示した結果は、KLIP+臍帯細胞画分における38kDaでのKLIP分子に対するバンドの存在を示している。

【0035】

- KLIP-1タンパク質のインビトロでの転写と翻訳ならびに免疫沈降

1. マトリクスの調製

翻訳されたマトリクスは、臍帯血単核細胞由来RNA(RNA NOW, Biogentex, France)の逆転写によって得られるKLIP-1 遺伝子cDNA (MMLV RT, Gibco BRL, France) のPCR増幅に由来する。PCRは、以下の条件下で全容量100 μ l中で行う:

- 300 nM のセンス+T7 プライマー

(5' -AgATCCTAATACGACTCACTATAgggAggAgggACATggCCAACTAAgC-3') (SEQ ID NO:21)

及び300 nMのアンチセンス又はリバースプライマー (5' AAgAggAAggAAggggTAgg3')

- 35サイクルにわたるPCR増幅(サーモサイクラー9600、PERKIN ELMER)、94 、1分; 55 、1分; 72 、2分。72 10分での最終的な伸長。増幅生成物は、MICROCON 100 (AMICON, USA)での遠心分離(20分500 g)により精製し、次いでH₂O中に溶解した。

【0036】

2. インビトロでの転写と翻訳

マトリクスのインビトロでの転写と翻訳は、

- 1 μ gのマトリクス
- 40 μ lのTnT Quick Master Mix (Promega Biotech, France)
- 2 μ lの10 mCi/ml ³⁵S-メチオニン(Amersham, France)
- H₂O、QS 50 μ l
- 試薬を30 で90分インキュベートする、
を用いて行った。

【0037】

3. 免疫沈降

5 μ lの翻訳産物と2 μ lのウサギポリクローナル抗-KLIP-1抗体を、攪拌しながら、1時間4 で50 μ lの1X PBS中でインキュベートする。

60 μ lのタンパク質 A-セファロースを加え、混合物を4 で30分ホイール(wheel)上でインキュベートする。

緩衝液で洗浄を行う: 0.1% NP 40、20 mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl 及び0.05% アジ化ナトリウム。

試料を12%のSDS-PAGE ゲルでの電気泳動により分析する;結果をオートラジオグラフィーで視覚化する。図6は、抗-KLIP抗体で検出される、約38kDaのKLIP分子に相当するバンドの存在を示すが、コントロールの免疫前血清はKLIPタンパク質を検出しない。これは、抗-KLIP 抗体の特異性を示している。

【0038】

- KLIP-1+ 細胞の免疫選択

末梢血もしくは臍帯血、骨髓又は胸腺及び胎児肝由来の約 2.5×10^8 個の単核細胞を、30分室温でPBS中の20%ヒトAB血清中でインキュベートする。2% SVF含有PBSで洗浄後、細胞を4 で30分90 μ lの(この発明による)ウサギ抗-KLIP-1血清とインキュベートし、次いで30分4 で50 μ lのFITC-ラベル化抗-ウサギ IgG 抗-イノシシ(swine) (Dako, France)とインキュベートし、次いで30分4 で200 μ lの抗-FITC磁気マイクロビーズ(Miltenyi-Biotech, Paris, France)とインキュベートする。

次いで、KLIP-1+細胞を、VarioMACS機器を用いる磁気分野のLS+ 磁気カラム(Miltenyi-Biotech, Paris, France)、続くRS+磁気カラム(Miltenyi-Biotech, Paris, France)での連続的な移動(passage)により単離する。

得られた群はFACS-Vantage (Becton Dickinson, France)で分析し、この研究で用いた群の純度は、90~99%の範囲であった。

【0039】

- FACSによる免疫表現型

KLIP-1+ 細胞群についての1-、2-及び 3-色の免疫蛍光分析は、FACS-Vantage (Becton Dickinson, France)を用いて行った。

イソタイプに適切なコントロールIgに無関係な適当な接合蛍光色素も、全ての実験に用いた。結果を造血組織ごとに示す:

. 図 7-11 (ヒト細胞):

図7: 末梢血: 成熟血球のみを含む

全血液中、4%の単核細胞がKLIP-1+である。99%の純粋なKLIP-1+ 分類画分では、0% CD34+、95% CD56+ (成熟NK細胞)、1.5% CD19+ (B 細胞)及び0.5% CD3+ (T細胞)が見られ、これらの最後の2つの値はバックグランドノイズによるものであ

る。

【0040】

図8: 大部分の成熟血球のみならず、小さな画分の未成熟細胞を含む臍帯血全帯血中、5%の単核細胞がKLIP-1+である。

98.5%の純粋なKLIP-1+ 分類画分において、0.5% CD34+、76% CD56+ (成熟NK細胞)、1.5% CD19+ (B細胞)ならびに0.3% CD3+ (T細胞)が認められる。

図9: 骨髄: 血球の分化が生じる造血部位; したがって、未成熟血球全てを含む骨髄全体で、8%の単核細胞がKLIP-1+である。

99%の純粋なKLIP-1+ 分類画分において、2つの亜群「低強度及び高強度」、つまり17% KLIP-1 低+ 82% KLIP-1 高 +、及び32% CD19 KLIP-1 低 (B細胞)、19% CD3 KLIP-1 低(プレ-T細胞)、31% CD56+ KLIP-1 高 + (NK)が認められる。

【0041】

図10: 胚肝臓(6週)

全肝臓の単核細胞で、3%の細胞がKLIP-1+である。

細胞はほとんど得られないので、収率は純度以上に有利であった。

47%のKLIP-1+細胞のうち、35%はCD34+ (極めて初期の造血始原細胞)である。

図11: 新生児の胸腺

胸腺は、T細胞の免疫学的成熟のための器官である。

胸腺全体で、2%の単核細胞が KLIP-1+である。

98%の純粋なKLIP-1+ 分類画分において、1.5% CD34+、2% CD56+、0.8% CD19+ (B細胞) 及び70% CD3+ (T細胞、つまりこの成熟段階ではT/NK細胞)が認められる。しかし、KLIP-1+ CD3+ 群は、91%以上のCD4+CD8+ (プレ-T)細胞からなる。

【0042】

これらの結果は、骨髄及び帯のCD34+ 初期始原細胞に存在するために、KLIP-1 マーカー(抗原又は分子)がその造血分化をとおしてNK細胞に特異的に存在することを明らかに示している。それは常に、CD56- 未成熟NK細胞及びCD56+ 成熟NK細胞及び未成熟のプレ-B ならびにプレ-T細胞に存在する。新生児の胸腺では、KLIP抗原の存在は、未成熟T細胞であるCD3+CD4+CD8+ 細胞で認められる。なぜな

ら、CD3+CD4-CD8+ 又は CD3+CD4+CD8-の成熟T細胞はKLIP-1-だからである。

【0043】

. 図13-14 (動物細胞)

図13 (ブタ): 血液全体において、7%の単核細胞がKLIP-1+である:非免疫化ウサギ血清でブタの血液全体をインキュベートして得られる陰性のコントロール(図13A)と、免疫化したウサギの血清で得られる、陽性のコントロールとの違い。

図14 (マウス): 図14A: KLIP-1+ 分類画分において: 98% 純度 (9% バックグランドノイズ); 図14B: 抗-マウスNK細胞抗体(NK1.1)の存在下、40%のKLIP-1+細胞がNK細胞であることが認められる。

【0044】

- 細胞-媒介細胞毒性

自然発生的な細胞毒性及び抗体依存性細胞-媒介細胞毒性(ADCC)は、標準的な4-時間の⁵¹Cr ラジオアイソトープ-放出実験で測定した。NK-感受性K562赤白血病細胞(American Type Culture Collection, Rockville, MD)を、標的として用いた。標的細胞を200 µCiの⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム(Amersham, Les Ulis, France)で2 hラベルした。混合しておらず、種々のドナー(<50歳)に由来する種々の数のエフェクター細胞を標的細胞に加え、4 h 37 °C でインキュベートした。ADCCを測定するために、細胞をブタ抗-ウサギ抗-Fc レセプター1:50でプレインキュベートした。全ての測定は、3回行った。

【0045】

図12に示す得られた結果は、

1. 抗-KLIP-1抗体が、NK細胞の細胞毒性に作用を有さず、それゆえにKLIP抗原がNKのインヒビター - でもアクチベーターでもないこと;
2. KLIP-1+細胞の分類(分離又は選択)が、おそらくは濃縮作用のために細胞毒性を増し、それにもかかわらず、これが、抗-KLIP-1によって分類される末梢血中の細胞が、実際に細胞毒性機能を有するNK細胞であることを明らかにしていることを示している。

上記から明らかのように、この発明は、より詳細に記載したにすぎないその実施、調製及び応用の方法には全く限定されない;逆に、この発明は、この発明の

関係又は範囲を逸脱しない限り、当業者に行い得る全ての变形を包含するものである。

【0046】

【配列表】

LISTE DE SEQUENCES

```

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
      KIRSZENBAUM, Marek
      LE DISCORDE, Magali
      PROST, Stéphane

<120> PROTEINE PRESENTE A LA SURFACE DES CELLULES SOUCHES
      HEMATOPOIETIQUES DE LA LIGNEE LYMPHOIDE ET DES CELLULES
      NK, ET SES APPLICATIONS.

<130> BLOcp263FR61S

<140>
<141>

<150> 9914241
<151> 2000-11-12

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1501
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (116)..(1168)

<400> 1
cgcgggcgcg tcgacctctc ctcgaccctg gacgtctacc ttccggaggc ccacatcttg 60
cccactccgc gcgcggggct agcgcggggt tcagcgacgg gagccctcaa gggac atg 118
                                         Met
                                         1

gca act aca gcg gcg ccg gcg ggc ggc gcc cga aat gga gct ggc ccg 166
Ala Thr Thr Ala Ala Pro Ala Gly Gly Ala Arg Asn Gly Ala Gly Pro
      5              10              15

gaa tgg gga ggg ttc gaa gaa aac atc cag ggc gga ggc tca gct gtg 214
Glu Trp Gly Gly Phe Glu Glu Asn Ile Gln Gly Gly Gly Ser Ala Val
      20              25              30

att gac atg gag aac atg gat gat acc tca ggc tct agc ttc gag gat 262
Ile Asp Met Glu Asn Met Asp Asp Thr Ser Gly Ser Ser Phe Glu Asp
      35              40              45

atg ggt gag ctg cat cag cgc ctg cgc gag gaa gaa gta gac gct gat 310
Met Gly Glu Leu His Gln Arg Leu Arg Glu Glu Val Asp Ala Asp
      50              55              60

gca gct gat gca gct gct gct gaa gag gag gat gga gag ttc ctg ggc 358
Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Phe Leu Gly
      70              75              80

```

atg aag ggc ttt aag gga cag ctg agc cgg cag gtg gca gat cag atg	406
Met Lys Gly Phe Lys Gly Gln Leu Ser Arg Gln Val Ala Asp Gln Met	
85 90 95	
tgG cag gct ggg aaa aga caa gcc tcc agg gcc ttc agc ttg tac gcc	454
Trp Gln Ala Gly Lys Arg Gln Ala Ser Arg Ala Phe Ser Leu Tyr Ala	
100 105 110	
aac atc gac atc ctc aga ccc tac ttt gat gtg gag cct gct cag gtg	502
Asn Ile Asp Ile Leu Arg Pro Tyr Phe Asp Val Glu Pro Ala Gln Val	
115 120 125	
cga agc agg ctc ctg gag tcc atg atc cct atc aag atg gtc aac ttc	550
Arg Ser Arg Leu Leu Glu Ser Met Ile Pro Ile Lys Met Val Asn Phe	
130 135 140 145	
ccc cag aaa att gca ggt gaa ctc tat gga cct ctc atg ctg gtc ctc	598
Pro Gln Lys Ile Ala Gly Glu Leu Tyr Gly Pro Leu Met Leu Val Leu	
150 155 160	
act ctg gtt gct atc cta ctc cat ggg atg aag acg tct gac act att	646
Thr Leu Val Ala Ile Leu Leu His Gly Met Lys Thr Ser Asp Thr Ile	
165 170 175	
atc cgg gag ggc acc ctg atg gcc aca gcc att gcc acc tgc ttc gcc	694
Ile Arg Glu Gly Thr Leu Met Gly Thr Ala Ile Gly Thr Cys Phe Gly	
180 185 190	
tac tgg ctg gga gtc tca tcc ttc att tac ttc ctt gcc tac ctg tgc	742
Tyr Trp Leu Gly Val Ser Ser Phe Ile Tyr Phe Leu Ala Tyr Leu Cys	
195 200 205	
aac gcc cag atc acc atg ctg cag atg ttg gca ctg ctg gcc tat gcc	790
Asn Ala Gln Ile Thr Met Leu Gln Met Leu Ala Leu Leu Gly Tyr Gly	
210 215 220 225	
ctc ttt ggg cat tgc att gtc ctg ttc atc acc tat aat atc cac ctc	838
Leu Phe Gly His Cys Ile Val Leu Phe Ile Thr Tyr Asn Ile His Leu	
230 235 240	
cac gcc ctc ttc tac ctc ttc tgg ctg ttg gtg ggt gga ctg tcc aca	886
His Ala Leu Phe Tyr Leu Phe Trp Leu Leu Val Gly Gly Leu Ser Thr	
245 250 255	
ctg cgc atg gta gca gtg ttg gtg tct cgg acc gtg gcc ccc aca cag	934
Leu Arg Met Val Ala Val Leu Val Ser Arg Thr Val Gly Pro Thr Gln	
260 265 270	
cgg ctg ctc ctc tgt ggc acc ctg gct gcc cta cac atg ctc ttc ctg	982
Arg Leu Leu Leu Cys Gly Thr Leu Ala Ala Leu His Met Leu Phe Leu	
275 280 285	
ctc tat ctg cat ttt gcc tac cac aaa gtg gta gag ggg atc ctg gac	1030
Leu Tyr Leu His Phe Ala Tyr His Lys Val Val Glu Gly Ile Leu Asp	
290 295 300 305	

Cys Asn Ala Gln Ile Thr Met Leu Gln Met Leu Ala Leu Leu Gly Tyr
 210 215 220
 Gly Leu Phe Gly His Cys Ile Val Leu Phe Ile Thr Tyr Asn Ile His
 225 230 235 240
 Leu His Ala Leu Phe Tyr Leu Phe Trp Leu Leu Val Gly Gly Leu Ser
 245 250 255
 Thr Leu Arg Met Val Ala Val Leu Val Ser Arg Thr Val Gly Pro Thr
 260 265 270
 Gln Arg Leu Leu Leu Cys Gly Thr Leu Ala Ala Leu His Met Leu Phe
 275 280 285
 Leu Leu Tyr Leu His Phe Ala Tyr His Lys Val Val Glu Gly Ile Leu
 290 295 300
 Asp Thr Leu Glu Gly Pro Asn Ile Pro Pro Ile Gln Arg Val Pro Arg
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Ala Met Leu Pro Ala Ala Arg Leu Pro Thr Thr Val Leu
 325 330 335
 Asn Ala Thr Ala Lys Ala Val Ala Val Thr Leu Gln Ser His
 340 345 350

<210> 3
 <211> 507
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(507)

<400> 3
 aac atc cag ggc ggg ggt tgc gct gtg att gat atg gag aac atg gac 48
 Asn Ile Gln Gly Gly Gly Ser Ala Val Ile Asp Met Glu Asn Met Asp
 1 5 10 15
 gat acc tca ggc tcc agc ttc gag gac atg ggt gag ctg cac cag cgc 96
 Asp Thr Ser Gly Ser Ser Phe Glu Asp Met Gly Glu Leu His Gln Arg
 20 25 30
 ctg cgg gag gaa gaa gta gat gct gat gca gct gct gca gaa gaa gag 144
 Leu Arg Glu Glu Glu Val Asp Ala Asp Ala Ala Ala Glu Glu Glu
 35 40 45
 gat ggg gag ttt ctt ggc atg aaa ggc ttt aaa gga caa ctg agc cgg 192
 Asp Gly Glu Phe Leu Gly Met Lys Gly Phe Lys Gly Gln Leu Ser Arg
 50 55 60
 cag gta gca gat cag atg tgg cag gca ggg aag aga cag gct tcc agg 240
 Gln Val Ala Asp Gln Met Trp Gln Ala Gly Lys Arg Gln Ala Ser Arg
 65 70 75 80
 gcc ttc agc ttg tat gcc aac att gac atc ctc aga ccc tac ttt gat 288
 Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Asn Ile Asp Ile Leu Arg Pro Tyr Phe Asp
 85 90 95
 gtg gag cct gcc cag gtc cga agc agg ctc ctg gag tcc atg atc cct 336
 Val Glu Pro Ala Gln Val Arg Ser Arg Leu Leu Glu Ser Met Ile Pro
 100 105 110

atc aag atg gtc aac ttc ccc cag aaa gtc gcg ggc gag ctc tac gga 384
 Ile Lys Met Val Asn Phe Pro Gln Lys Val Ala Gly Glu Leu Tyr Gly
 115 120 125
 ccg ctc atg ctg gtc ttc aca ctg gtg gcc atc ctc ctg cat gga atg 432
 Pro Leu Met Leu Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Leu Leu His Gly Met
 130 135 140
 aag act tct gac acc att atc cgg gag ggc acc ctc atg ggc aca gcc 480
 Lys Thr Ser Asp Thr Ile Ile Arg Glu Gly Thr Leu Met Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 ata ggc acc tgc ttt gga tac tgg ctg 507
 Ile Gly Thr Cys Phe Gly Tyr Trp Leu
 165

<210> 4
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4
 Asn Ile Gln Gly Gly Ser Ala Val Ile Asp Met Glu Asn Met Asp
 1 5 10 15
 Asp Thr Ser Gly Ser Ser Phe Glu Asp Met Gly Glu Leu His Gln Arg
 20 25 30
 Leu Arg Glu Glu Glu Val Asp Ala Asp Ala Ala Ala Glu Glu Glu
 35 40 45
 Asp Gly Glu Phe Leu Gly Met Lys Gly Phe Lys Gly Gln Leu Ser Arg
 50 55 60
 Gln Val Ala Asp Gln Met Trp Gln Ala Gly Lys Arg Gln Ala Ser Arg
 65 70 75 80
 Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Asn Ile Asp Ile Leu Arg Pro Tyr Phe Asp
 85 90 95
 Val Glu Pro Ala Gln Val Arg Ser Arg Leu Leu Glu Ser Met Ile Pro
 100 105 110
 Ile Lys Met Val Asn Phe Pro Gln Lys Val Ala Gly Glu Leu Tyr Gly
 115 120 125
 Pro Leu Met Leu Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Leu Leu His Gly Met
 130 135 140
 Lys Thr Ser Asp Thr Ile Ile Arg Glu Gly Thr Leu Met Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ile Gly Thr Cys Phe Gly Tyr Trp Leu
 165

```

<210> 5
<211> 471
<212> ADN
<213> Sus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(471)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(60)

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(456)

<400> 5
atg gca act aca gcg gcg ccg gcg ggc ggc gcc cga aat gga gct ggc 48
Met Ala Thr Thr Ala Ala Pro Ala Gly Gly Ala Arg Asn Gly Ala Gly
1 5 10 15

ccg gaa tgg gga ggg ttc gaa gaa aac atc cag ggc gga ggc tca gct 96
Pro Glu Trp Gly Gly Phe Glu Glu Asn Ile Gln Gly Gly Gly Ser Ala
20 25 30

gtg att gac atg gag aac atg gat gat acc tca ggc tct agc ttc gag 144
Val Ile Asp Met Glu Asn Met Asp Asp Thr Ser Gly Ser Ser Phe Glu
35 40 45

gat atg ggt gag ctg cat cag cgc ctg cgc gag gaa gaa gta gac gct 192
Asp Met Gly Glu Leu His Gln Arg Leu Arg Glu Glu Glu Val Asp Ala
50 55 60

gat gca gct gat gca gct gct gct gaa gag gag gat gga gag ttc ctg 240
Asp Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Phe Leu
65 70 75 80

ggc atg aag ggc ttt aag gga cag ctg agc cgg cag gtg gca gat cag 288
Gly Met Lys Gly Phe Lys Gly Gln Leu Ser Arg Gln Val Ala Asp Gln
85 90 95

atg tgg cag gct ggg aaa aga caa gcc tcc agg gcc ttc agc ttg tac 336
Met Trp Gln Ala Gly Lys Arg Gln Ala Ser Arg Ala Phe Ser Leu Tyr
100 105 110

gcc aac atc gac atc ctc aga ccc tac ttt gat gtg gag cct gct cag 384
Ala Asn Ile Asp Ile Leu Arg Pro Tyr Phe Asp Val Glu Pro Ala Gln
115 120 125

gtg cga agc agg ctc ctg gag tcc atg atc cct atc aag atg gtc aac 432
Val Arg Ser Arg Leu Leu Glu Ser Met Ile Pro Ile Lys Met Val Asn
130 135 140

ttc ccc cag aaa att gca ggt gaa ctc tat gga cct ctc 471
Phe Pro Gln Lys Ile Ala Gly Glu Leu Tyr Gly Pro Leu
145 150 155

```

<210> 6
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Sus sp.

<400> 6
 Met Ala Thr Thr Ala Ala Pro Ala Gly Gly Ala Arg Asn Gly Ala Gly
 1 5 10 15
 Pro Glu Trp Gly Gly Phe Glu Glu Asn Ile Gln Gly Gly Gly Ser Ala
 20 25 30
 Val Ile Asp Met Glu Asn Met Asp Asp Thr Ser Gly Ser Ser Phe Glu
 35 40 45
 Asp Met Gly Glu Leu His Gln Arg Leu Arg Glu Glu Glu Val Asp Ala
 50 55 60
 Asp Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Phe Leu
 65 70 75 80
 Gly Met Lys Gly Phe Lys Gly Gln Leu Ser Arg Gln Val Ala Asp Gln
 85 90 95
 Met Trp Gln Ala Gly Lys Arg Gln Ala Ser Arg Ala Phe Ser Leu Tyr
 100 105 110
 Ala Asn Ile Asp Ile Leu Arg Pro Tyr Phe Asp Val Glu Pro Ala Gln
 115 120 125
 Val Arg Ser Arg Leu Leu Glu Ser Met Ile Pro Ile Lys Met Val Asn
 130 135 140
 Phe Pro Gln Lys Ile Ala Gly Glu Leu Tyr Gly Pro Leu
 145 150 155

<210> 7
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Gly Phe Glu Glu Asn Ile Gln Gly Gly Gly Ser Ala Val Ile Asp Met
 1 5 10 15
 Glu Asn Met Asp Asp Thr Ser Gly Ser Ser Phe Glu Asp Met Gly Glu
 20 25 30
 Leu His Gln Arg Leu Arg Glu Glu Glu Val Asp Ala Asp Ala Ala Asp
 35 40 45
 Ala Ala Ala Ala Glu Glu Glu Asp Gly Glu Phe Leu Gly Met Lys Gly
 50 55 60

Phe Lys Gly Gln Leu Ser Arg Gln Val Ala Asp Gln Met Trp Gln Ala
 65 70 75 80
 Gly Lys Arg Gln Ala Ser Arg Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Asn Ile Asp
 85 90 95
 Ile Leu Arg Pro Tyr Phe Asp Val Glu Pro Ala Gln Val Arg Ser Arg
 100 105 110
 Leu Leu Glu Ser Met Ile Pro Ile Lys Met Val Asn Phe Pro Gln Lys
 115 120 125
 Ile Ala Gly Glu
 130

<210> 8
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Leu Tyr Gly Pro Leu Met Leu Val Leu Thr Leu Val Ala Ile Leu Leu
 1 5 10 15
 His Gly Met Lys Thr Ser Asp Thr Ile Ile Arg Glu Gly Thr Leu Met
 20 25 30
 Gly Thr Ala Ile Gly Thr Cys Phe Gly Tyr Trp Leu Gly Val Ser Ser
 35 40 45
 Phe Ile Tyr Phe Leu Ala Tyr Leu Cys Asn Ala Gln Ile Thr Met Leu
 50 55 60
 Gln Met Leu Ala Leu Leu Gly Tyr Gly Leu Phe Gly His Cys Ile Val
 65 70 75 80
 Leu Phe Ile Thr Tyr Asn Ile His Leu His Ala Leu Phe Tyr Leu Phe
 85 90 95
 Trp Leu Leu Val Gly Gly Leu Ser Thr Leu Arg Met Val Ala Val Leu
 100 105 110
 Val Ser Arg Thr Val Gly Pro Thr Gln Arg Leu Leu Leu Cys Gly Thr
 115 120 125
 Leu Ala Ala Leu His Met Leu Phe Leu Leu Tyr Leu His Phe Ala
 130 135 140

<210> 9
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Tyr His Lys Val Val Glu Gly Ile Leu Asp Thr Leu Glu Gly Pro Asn
 1 5 10 15

Ile Pro Pro Ile Gln Arg Val Pro Arg Asp Ile Pro Ala Met Leu Pro
 20 25 30

Ala Ala Arg Leu Pro Thr Thr Val Leu Asn Ala Thr Ala Lys Ala Val
 35 40 45

Ala Val Thr Leu Gln Ser His
 50 55

<210> 10
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 atggcaacta cagcggcgcc ggccggcgcc gcccgaaatg gagctggccc ggaatgggga 60
 gggttcgaag aaaacatcca gggcggaggg tcagctgtga ttgacatgga gaacatggat 120
 gatacctcag gctctagctt cgaggatatg ggtgagctgc atcagcgctt gcgcgaggaa 180
 gaagtagacg ctgatgcagc tgatgcagct gctgctgaag aggaggatgg agagtccctg 240
 ggcataaagg gctttaaggg acagctgagc cggcagggtgg cagatcagat gtggcaggct 300
 gggaaaagac aagcctccag ggccttcagc ttgtacgcca acatcgacat cctcagacct 360
 tactttgatg tggagcctgc tcaggtgoga agcaggctcc tggagtccat gatccctatc 420
 aagatggtca acttccccca gaaaattgca ggtgaactct atggacctct catgctggctc 480
 ctcaactctg ttgctatcct actccatggg atgaagacgt ctgacactat tatccgggag 540
 ggcaccctga tgggcacagc cattggcacc tgcttcggct actggctggg agtctcatcc 600
 ttcatctact tccttgctca cctgtgcaac gccagatca ccctgctgca gatgtggca 660
 ctgctgggct atggcctctt tgggcattgc attgtectgt tcatcaccta taatatccac 720
 ctccacgccc tcttctacct ctctctggctg ttggtgggtg gactgtccac actgcgatg 780
 gtagcagtggt tgggtgtctcg gaccgtggg gccacacagc ggctgctcct ctgtggcacc 840
 ctggctgccc tacacatgct ctctctgctc tatctgcatt ttgcctacca caaagtggta 900
 gaggggatcc tggacacact ggagggcccc aacatcccgc ccatccagag ggtccccaga 960
 gacatccctg ccatgctccc tgctgctcgg ctccaccaca cgtcctcaa cgccacagcc 1020
 aagctggtg cgggtgacct gcagtcacac tga 1053

<210> 11
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 atggcaacta cagcggcgcc ggccggcgcc gcccgaaatg gagctggccc ggaatgggga 60
 gggttcgaag aaaacatcca gggcggaggg tcagctgtga ttgacatgga gaacatggat 120
 gatacctcag gctctagctt cgaggatatg ggtgagctgc atcagcgctt gcgcgaggaa 180
 gaagtagacg ctgatgcagc tgatgcagct gctgctgaag aggaggatgg agagtccctg 240
 ggcataaagg gctttaaggg acagctgagc cggcagggtgg cagatcagat gtggcaggct 300
 gggaaaagac aagcctccag ggccttcagc ttgtacgcca acatcgacat cctcagacct 360
 tactttgatg tggagcctgc tcaggtgoga agcaggctcc tggagtccat gatccctatc 420
 aagatggtca acttccccca gaaaattgca ggtgaa 456

<210> 12
 <211> 429
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 ctctatggac ctctcatgct ggtcctcact ctggttgcta tcctactcca tgggatgaag 60
 acgtctgaca ctattatccg ggagggcacc ctgatgggca cagccattgg cacctgcttc 120
 ggctactggc tgggagtctc atccttcatt tacttccttg cctacctgtg caacgcccag 180
 atcaccatgc tgcagatggt ggcactgctg ggctatggcc tctttgggca ttgcatgtc 240
 ctgttcatca cctataatat ccacctccac gccctcttct acctctctg gctggtggg 300
 ggtggactgt ccacactgcg catggtagca gtggtgggtg ctcgaccgt gggccccaca 360
 cagcggctgc tcctctgtgg caccctgget gccctacaca tgctcttct gctctatctg 420
 cattttgccc 429

<210> 13
 <211> 168
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 taccacaaag tggtagaggg gatcctggac aactggagg gccccaacat cccgcccac 60
 cagaggggcc ccagagacat ccctgccatg ctccctgctg ctcggttcc caccaccgtc 120
 ctcaacgcca cagccaaagc tgttgcggtg accctgcagt cacactga 168

<210> 14
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 tttttttttt tgg 13

<210> 15
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 gttgcgatcc 10

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 accccacctg aaattcttgg 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 gagataaaga ggaaggaagg 20

```

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 18
ctgtgggcac ttctgaaagg                20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 19
tcgaagaaaa catccagggc                20

<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 20
agaggtccat agagttccac c              21

<210> 21
<211> 49
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
agatcctaat acgactcact atagggagga gggacatggc caactaagc  49

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 22
aagaggaagg aaggggtagg                20

<210> 23
<211> 387
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)

<400> 23
ggg ttc gaa gaa aac atc cag ggc ggg ggt tcg gct gtg att gat atg  48
Gly Phe Glu Glu Asn Ile Gln Gly Gly Gly Ser Ala Val Ile Asp Met
  1                   5                   10                   15

```


Pro Tyr Phe Asp Val Glu Pro Ala Gln Val Arg Ser Arg Leu Leu Glu
 100 105 110
 Ser Met Ile Pro Ile Lys Met Val Asn Phe Pro Gln Lys Val Ala Gly
 115 120 125
 Glu

 <210> 25
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

Phe	Tyr	Leu	Phe	Trp	Leu	Leu	Val	Gly	Gly	Leu	Ser	Thr	Leu	Arg	Met
225					230					235					240
Val	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Arg	Thr	Val	Gly	Pro	Thr	Gln	Arg	Leu	Leu
			245						250					255	
Leu	Cys	Gly	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	His	Met	Leu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu
			260					265						270	
His	Phe	Ala	Tyr	His	Lys	Val	Val	Glu	Gly	Ile	Leu	Asp	Thr	Leu	Glu
		275						280					285		
Gly	Pro	Asn	Ile	Pro	Pro	Ile	Gln	Arg	Val	Pro	Arg	Asp	Ile	Pro	Ala
	290					295						300			
Met	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Leu	Pro	Thr	Thr	Val	Leu	Asn	Ala	Thr	Ala
305					310					315					320
Lys	Ala	Val	Ala	Val	Thr	Leu	Gln	Ser	His						
				325					330						

【図1】

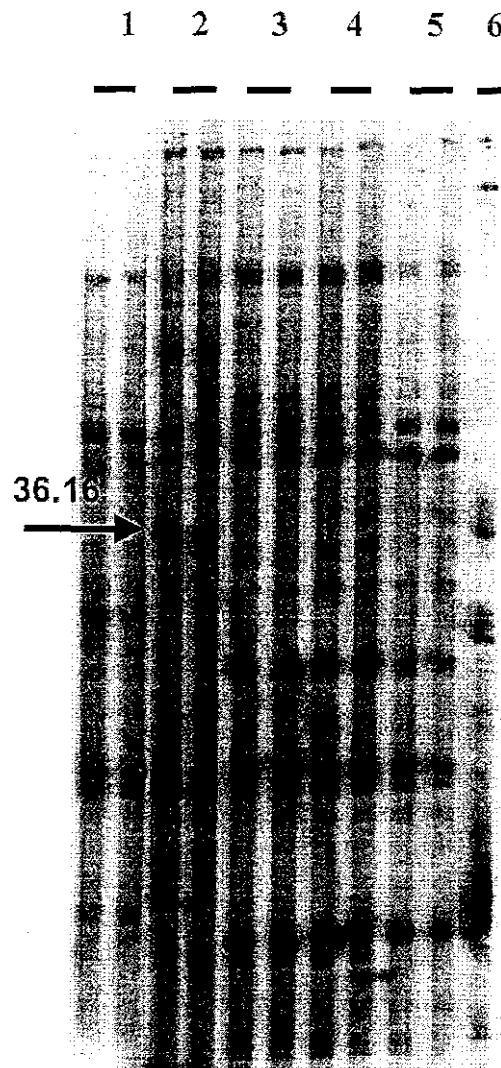
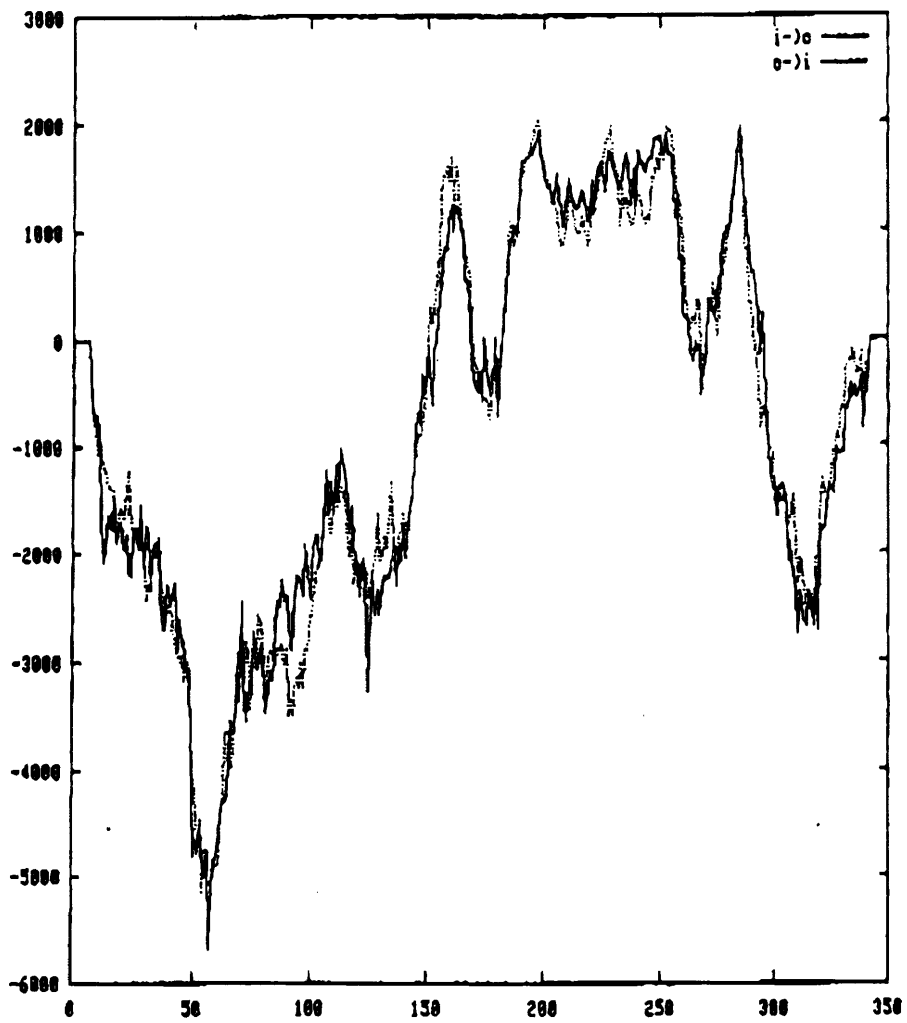


FIGURE 1

【図2'】

36.16 に対する TMpred アウトプット



【図3】

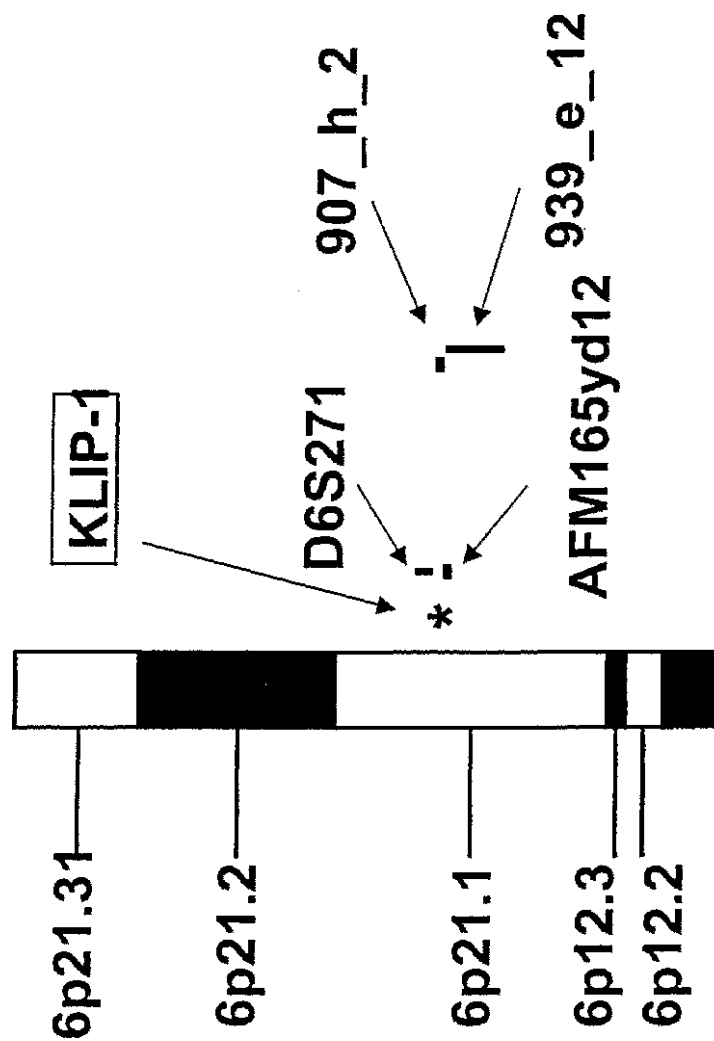


FIGURE 3

【図4A】

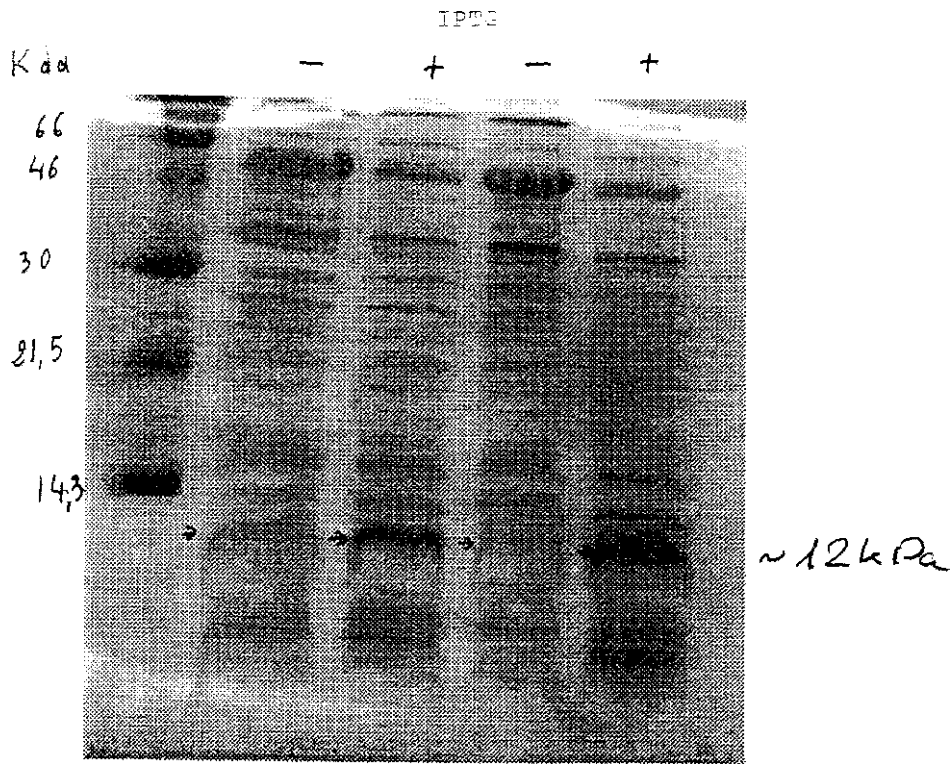
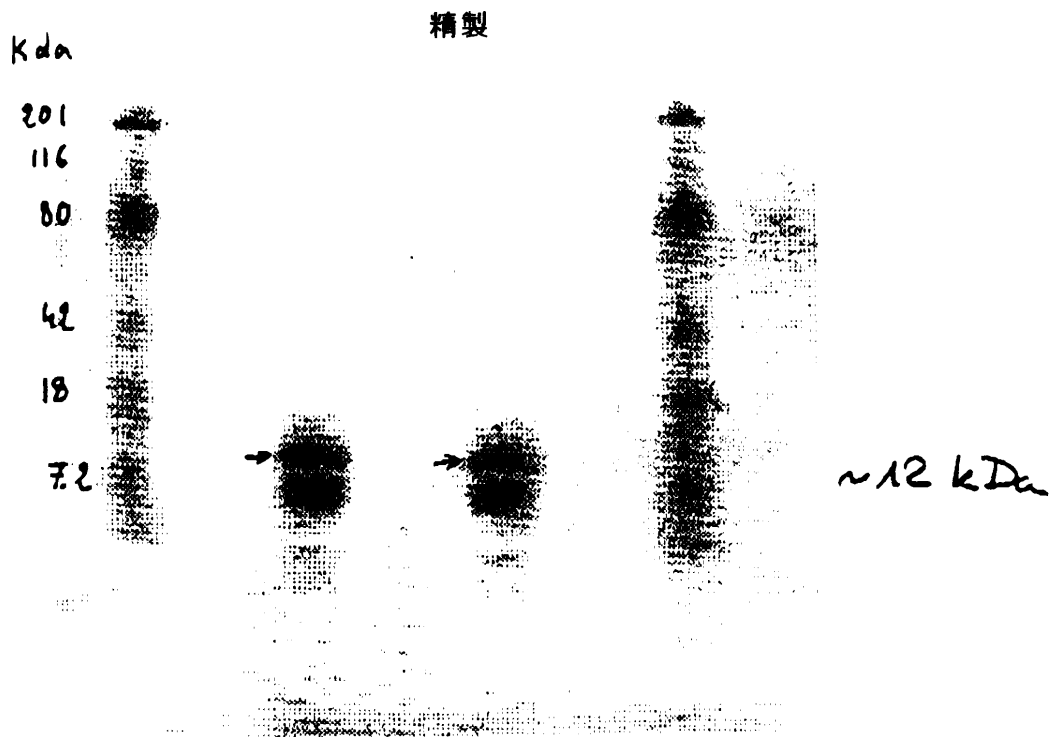


FIGURE 4A

【図4B】



【図5】

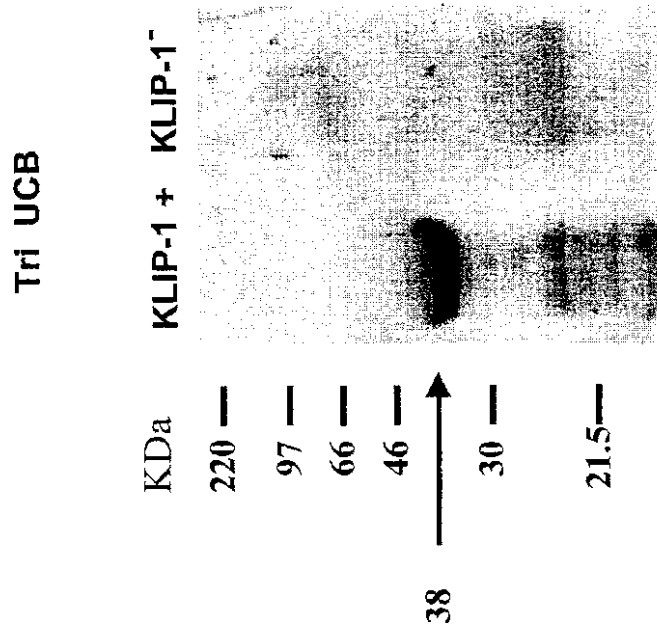
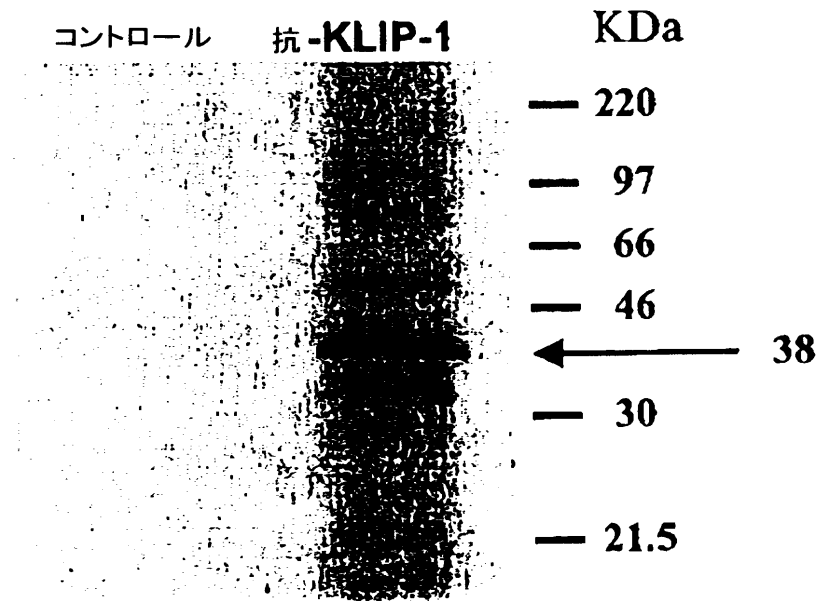


FIGURE 5

【図6】



【図7】

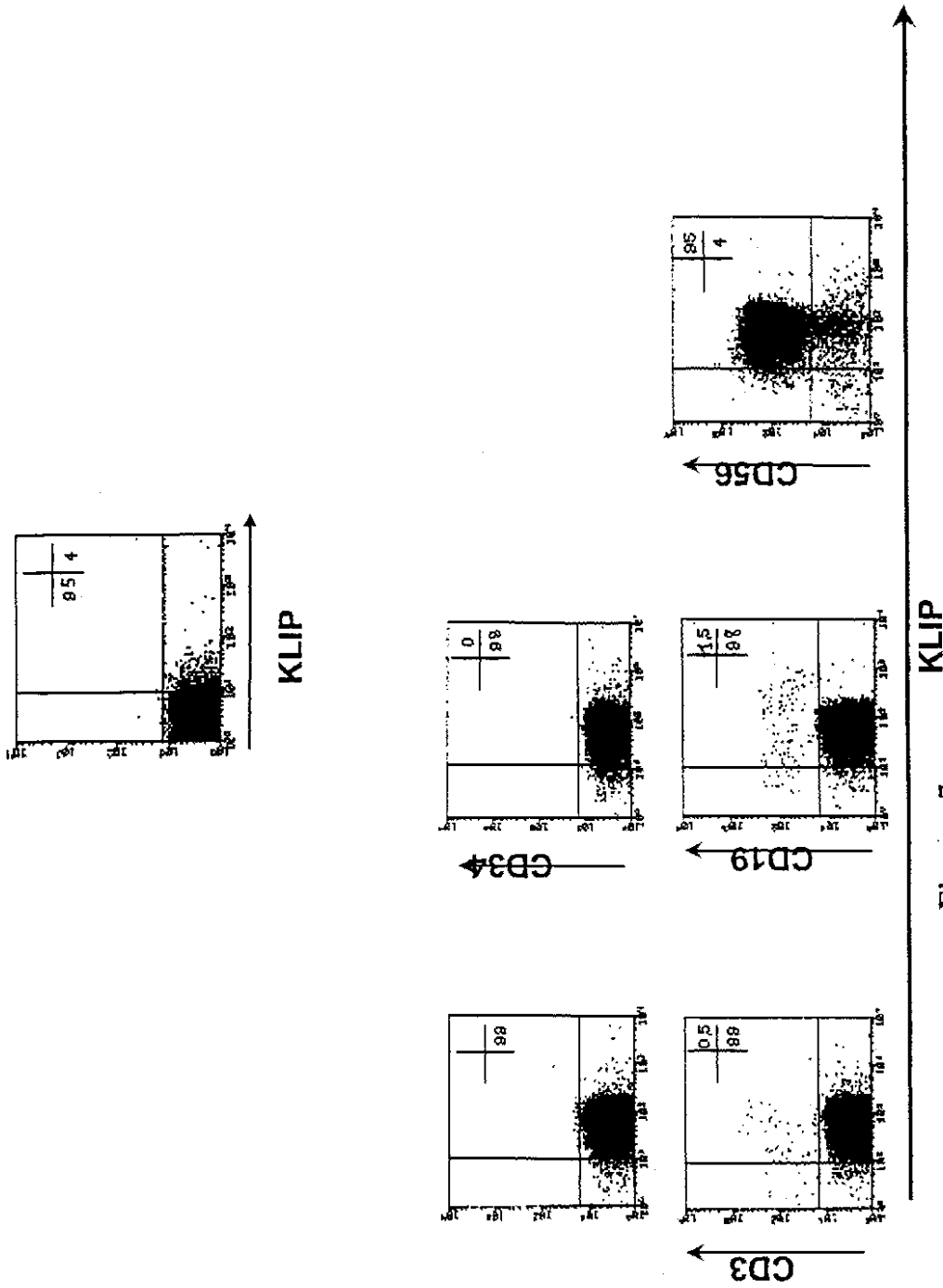


Figure 7

【図8】

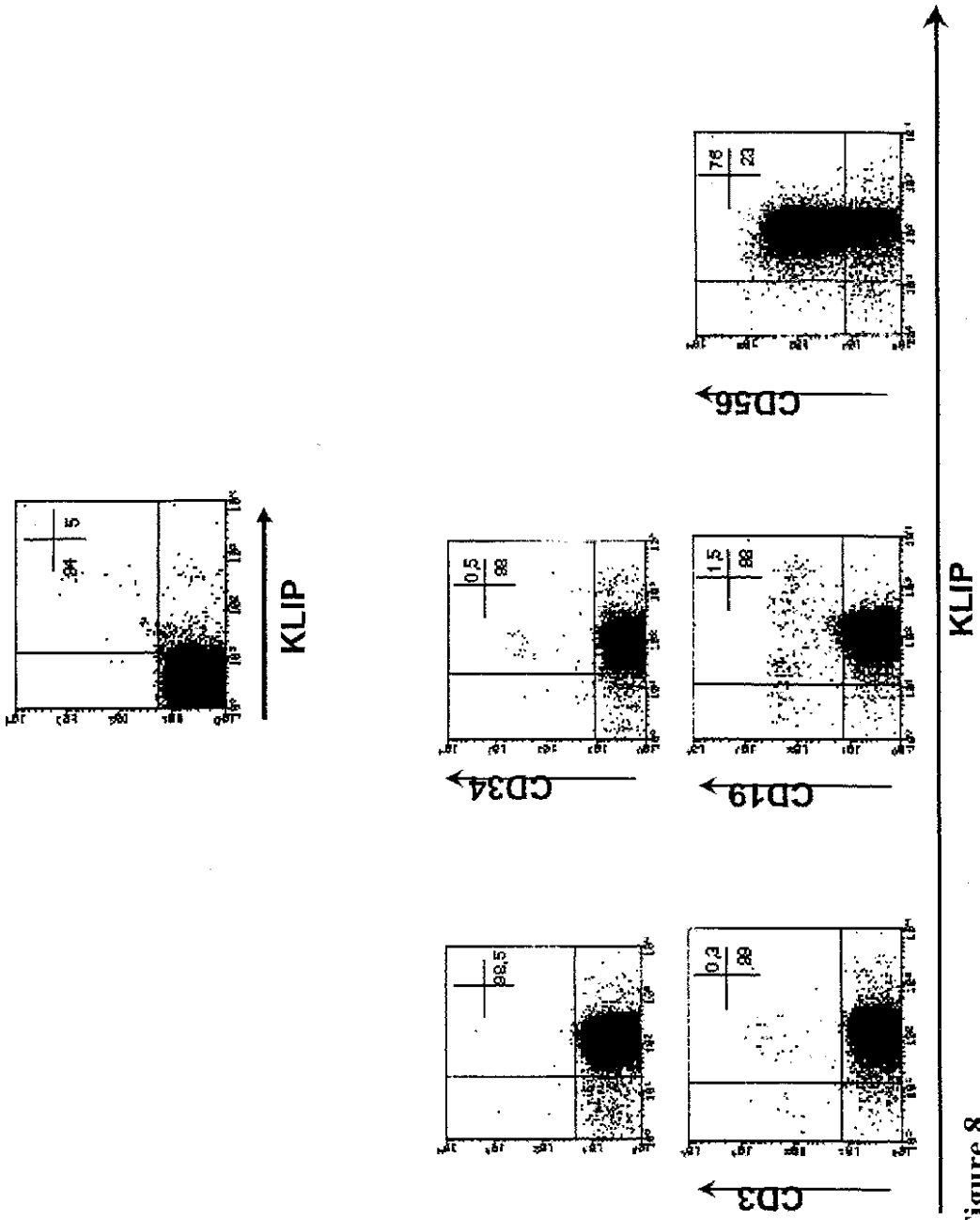


Figure 8

【図9】

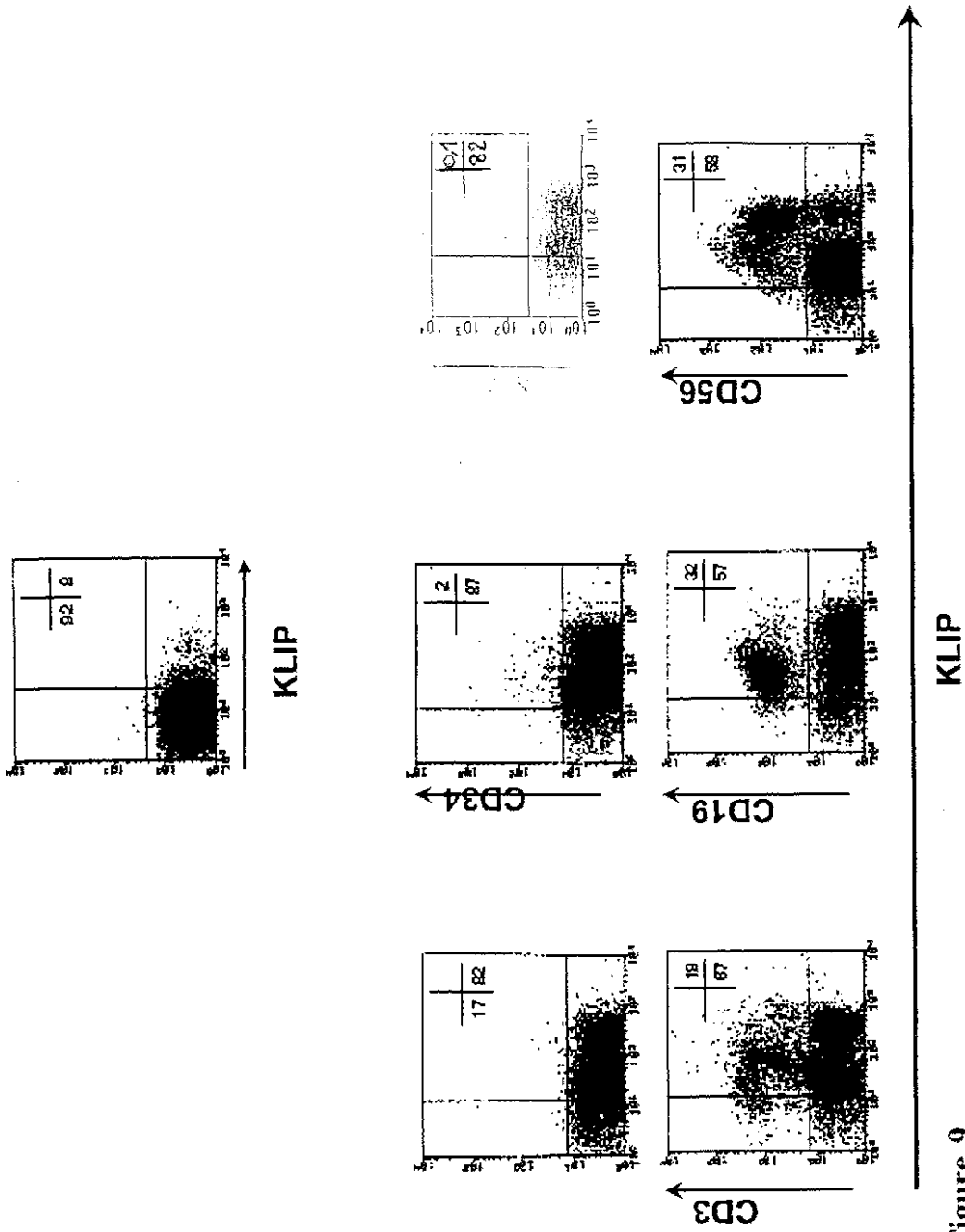


Figure 9

【図10】

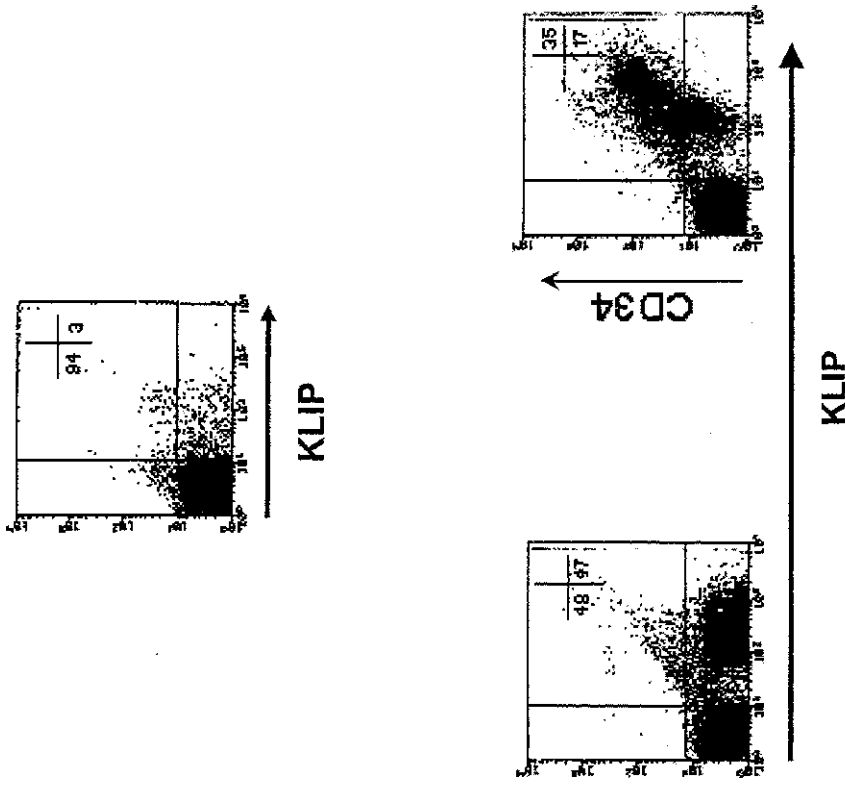


Figure 10

【図11】

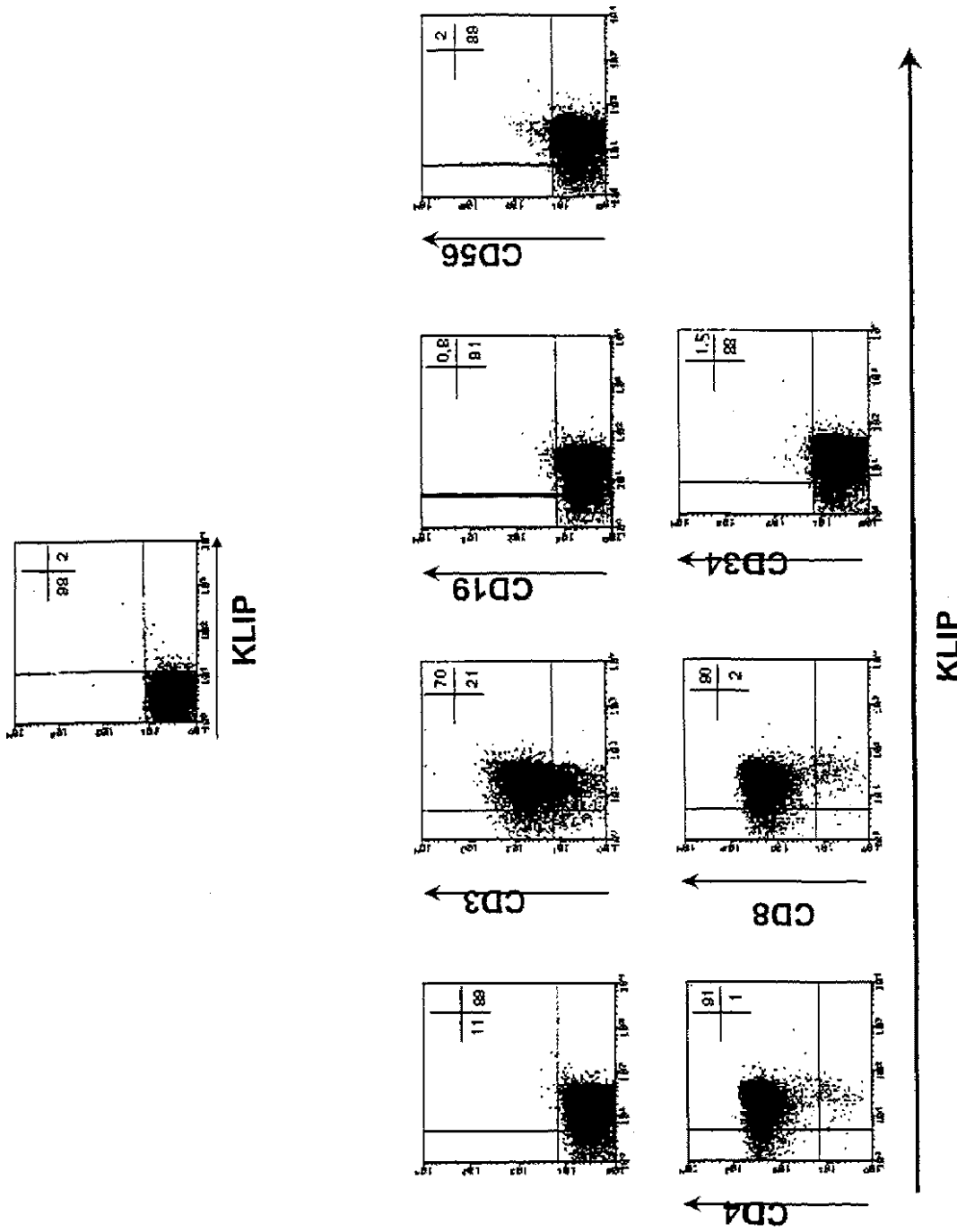
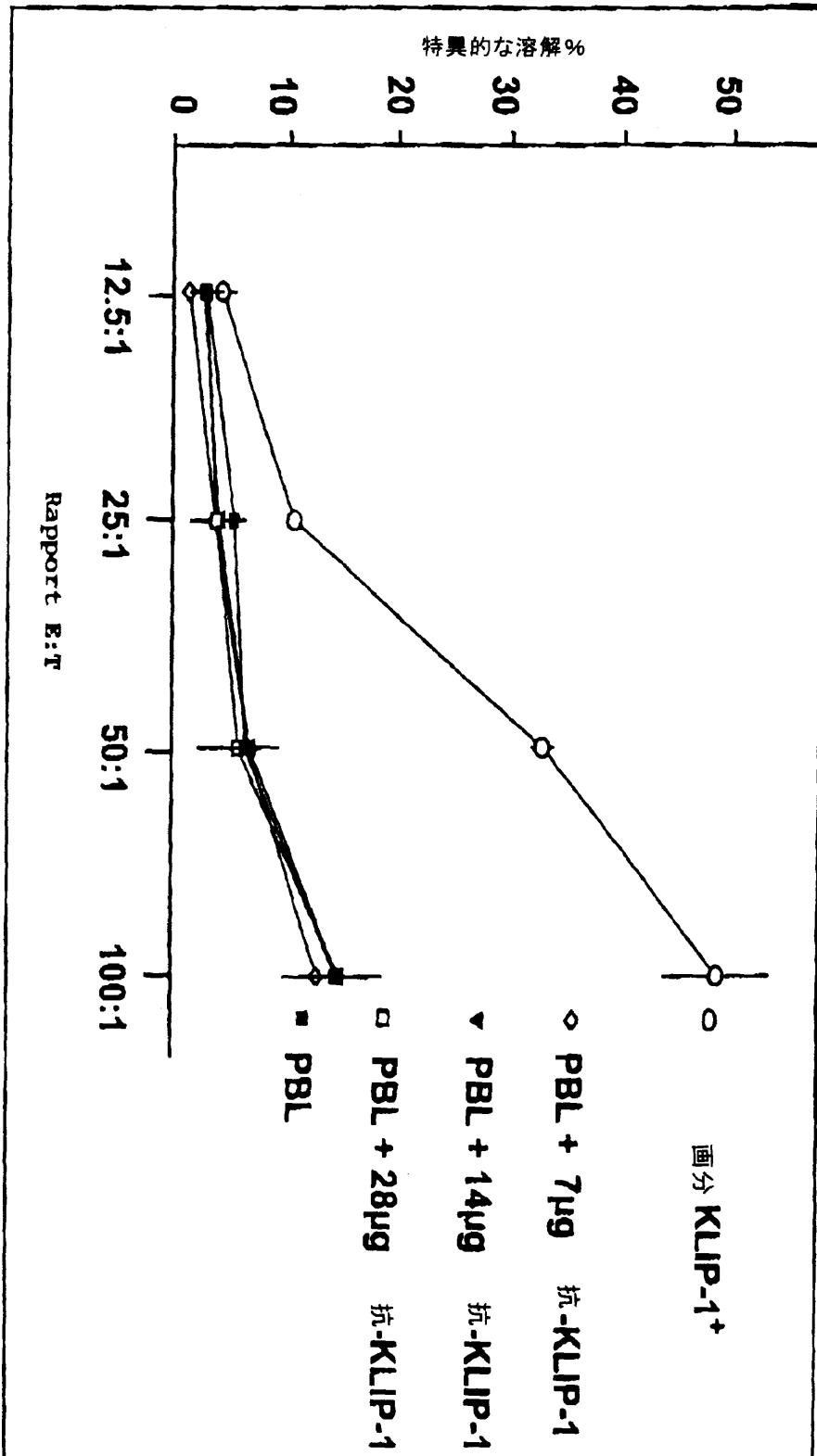


Figure 11

【図12】



【図13】

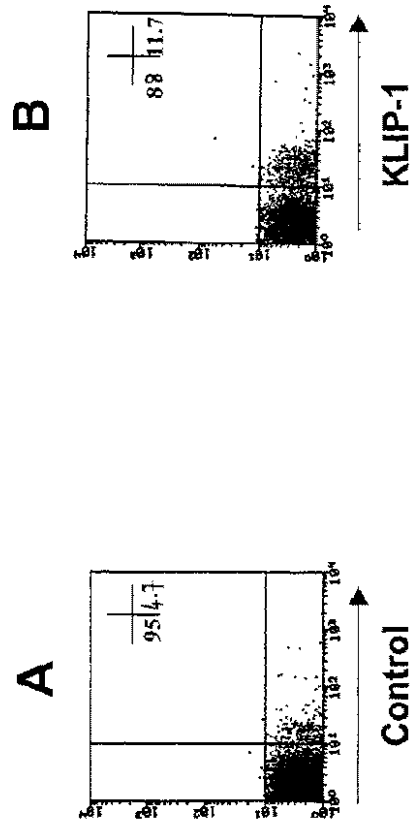


Figure 13

【図14】

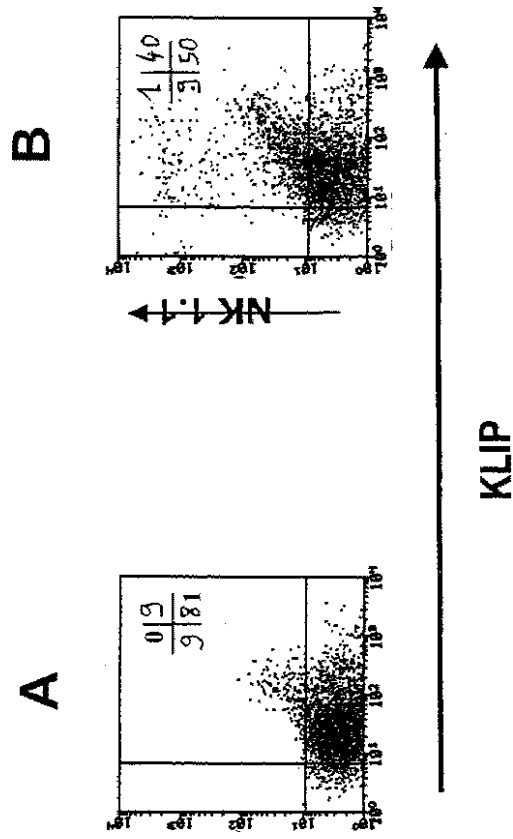


FIGURE 14

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成14年2月14日(2002.2.14)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 配列SEQ ID NO:2に対してそれぞれ21~152、153~295及び296~350の位置に局在する細胞外ドメイン、5個のトランスメンブランドメイン及び細胞質ドメインからなる構造を有することを特徴とする細胞表面タンパク質であって、全てのリンパ球始原細胞と全ての成熟NK細胞の表面で発現される約36-38 kDの表面タンパク質が、アクセス番号SWALL EBI Q9Y3U9、GENESEQ W 63688及び GENESEQ W 74904を有する配列及び配列GENESEQ W 74904の321アミノ酸のC-末端フラグメントを除く、配列SEQ ID NO:2及び配列SEQ ID NO:2全体に対して配列SEQ ID NO:2と少なくとも70%の同一性又は少なくとも85%の類似性、好ましくは少なくとも95%の同一性又は少なくとも99%の類似性を有する配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、細胞表面タンパク質。

【**請求項2**】 配列SEQ ID NO:25のタンパク質、及び細胞外ドメインが配列SEQ ID NO:6、7又は24を有するタンパク質からなる群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の表面タンパク質。

【**請求項3**】 - 配列 SEQ ID NO:4、6、7、8、9 及び24によって定義されるフラグメント、

- 配列SEQ ID NO:2に対する位置153~295に局在する配列に相当する配列の少なくとも7アミノ酸のフラグメント、及び
- 配列SEQ ID NO:2に対する位置296~350に局在する配列に相当する配列の少なくとも7アミノ酸のフラグメント

からなる群から選択されることを特徴とする、請求項1又は請求項2に記載の表面タンパク質のフラグメント。

【請求項4】 請求項1もしくは請求項2に記載の表面タンパク質、又は請求項3に記載のこのタンパク質のフラグメントに対するものであることを特徴とする抗体。

【請求項5】 請求項3に記載のフラグメントの1つ、好ましくは配列SEQ ID NO:7のフラグメントに対するものであることを特徴とする請求項4に記載の抗体。

【請求項6】 モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体から選択されることを特徴とする請求項4又は請求項5に記載の抗体。

【請求項7】 請求項1もしくは請求項2に記載の表面タンパク質、又は請求項3に記載のこのタンパク質のフラグメントをエンコードすることを特徴とする、単離及び精製されたcDNA。

【請求項8】 配列SEQ ID NO:1、3、5、10、11、12、13ならびに23及びSEQ ID NO:16-20からなる群から選択されることを特徴とする請求項7に記載の単離及び精製されたcDNA。

【請求項9】 - 生物学的試料を、請求項4～6のいずれか1つに記載の抗体と接触させ、かつ
- 抗体に結合する細胞を除くこと
からなる、異種細胞群からなる生物学的試料から請求項1に記載の表面タンパク質を発現する細胞を選択的に除く方法。

【請求項10】 抗体が固体支持体に結合されていることを特徴とする、請求項9に記載の除去方法。

【請求項11】 - 異種細胞群からなる試料を、請求項4～6のいずれか1つに記載の抗体と接触させ、かつ

- 細胞-抗体複合体の形成を検出すること

からなることを特徴とする、異種細胞群においてNK細胞及び/又はリンパ細胞始原細胞を検出及び/又は定量及び/又は単離する方法。

【請求項12】 試料が骨髄、臍帯血、胎児肝又はいずれかの他の胎児もしくは成体の造血組織からなるときに、抗体と複合体を形成した細胞を、プレ-B細胞に特異的な抗体(抗-CD19抗体又は抗-CD10抗体)及び/又はプレ-T細胞に特異

的な抗体(抗-CD3 抗体、抗-CD4抗体又は抗-CD8抗体)と接触させてもよいことを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 医薬品、特に自己免疫疾患の治療に用いるための請求項4～6のいずれか1つに記載の抗体。

【請求項14】 移植可能な製品を製造するための、請求項9又は請求項10に記載の方法を用いて得られる、NK細胞及び/又はリンパ始原細胞を涵湯した骨髓、臍帯血、胎児肝又はいずれかの他の胎児もしくは成体の造血組織の細胞の使用。

【請求項15】 請求項7及び8のいずれかに記載される核酸配列を生物学的試料中に検出することからなることを特徴とする、良性及び悪性の血液疾患の診断方法。

【請求項16】 検出を行うのに適した有用な量の緩衝液に加えて、免疫吸着固体支持体に任意に接合した、請求項4～6のいずれか1つに記載の適当な用量の抗体及び形成された可能性のある細胞-抗体複合体を示す適当な用量の試薬からなることを特徴とする、NK細胞及び/又はリンパ球様始原細胞(プレ-B、プレ-T 及びプレ-NK)の検出及び/又は定量及び/又は単離のためのキット。

【請求項17】 細胞外ドメインの少なくとも7個の連続的なアミノ酸からなる、NK細胞の検出用試薬としての請求項1又は請求項2に記載の表面タンパク質のフラグメントの使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/FR 00/03137
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 G01N33/569 A61K39/395 A61K35/14 A61K35/28 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N A61K C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 39448 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 11 September 1998 (1998-09-11) cited in the application Gene 177 clone HE9CM64 SeqIdNo.187: 99.2% identity in 1499 bp overlap with SeqIdNo.1 / SeqIdNo.489: 99.1% identity in 350 aa overlap with SeqIdNo.2	1-9,14
X	-& DATABASE GENESEQ Derwent Publ.; Accession Number: V59687, 19 January 1999 (1999-01-19) W09839448: "Human secreted protein gene 177 clone HE9CM64" XP002147597 99.2% identity in 1499 bp overlap with SeqIdNo.1 abstract	1-9,14
X	-& DATABASE GENESEQ Derwent Publ.;	1-9,14
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 31 July 2001		Date of mailing of the international search report 09/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenilaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lonroy, O

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/03137

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>Accession Number: W74904, 25 January 1999 (1999-01-25) W09839448: "Human secreted protein encoded by gene 177 clone HE9CM64" XP002147598 99.1% identity in 350 aa overlap with SeqIdNo.2 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
X	<p>W0 98 25959 A (CHIRON CORP) 18 June 1998 (1998-06-18) cited in the application Human secreted protein 8 SeqIdNo.8: 99.3% identity in 1149 bp overlap with SeqIdNo.1 / SeqIdNo.27: 99.6% identity in 254 aa overlap with SeqIdNo.2</p>	1-9,14
X	<p>-& DATABASE GENESSEQ Derwent Publ. ; Accession Number: V43608, 24 September 1998 (1998-09-24) ESCOBEDO J ET AL: "Human secreted protein 8 encoding DNA" XP002147599 99.3% identity in 1149 bp overlap with SeqIdNo.1 abstract</p>	1-9,14
X	<p>-& DATABASE GENESSEQ Derwent Publ. ; Accession Number: W63688, 24 September 1998 (1998-09-24) ESCOBEDO J ET AL: "Human secreted protein 8" XP002147600 99.6% identity in 254 aa overlap with SeqIdNo.2 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-9,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 00/03137
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 31236 A (BOUGUELERET LYDIE ;DUCLERT AYMERIC (FR); GENSET (FR); DUMAS MILNE) 24 June 1999 (1999-06-24) cited in the application SeqIdNo.350: 98.9% identity in 973 bp overlap with SeqIdNo.1 / SeqIdNo.486: 97.1% identity in 209 aa overlap with SeqIdNo.2	1-9,14
X	-& DATABASE GENESEQ Derwent Publ.; Accession Number: X97785, 13 September 1999 (1999-09-13) BOUGUELERET L ET AL: "Extended human secreted protein coding sequence, SeqIdNo.350." XP002147601 98.9% identity in 973 bp overlap with SeqIdNo.1 abstract	1-9,14
X	-& DATABASE GENESEQ Derwent Publ.; Accession Number: Y36101, 13 September 1999 (1999-09-13) BOUGUELERET L ET AL: "Extended human secreted protein sequence, SeqIdNo.486." XP002147602 97.1% identity in 209 aa overlap with SeqIdNo.2 abstract	1-9,14

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/03137

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WO 00 09552 A (GENETICS INST) 24 February 2000 (2000-02-24) SeqIdNo.31: 99.2% identity in 1424 bp overlap with SeqIdNo.1 / SeqIdNo.32: 99.4% identity in 315aa overlap with SeqIdNo.2 -& DATABASE GENESEQ Derwent Publ. ; Accession Number: A16633, 16 June 2000 (2000-06-16) JACOBS K ET AL: "Human secreted protein clone py35_1 nucleotide sequence SeqIdNo.31" XP002147603 99.2% identity in 1424 bp overlap with SeqIdNo.1 abstract -& DATABASE GENESEQ Derwent Publ. ; Accession Number: Y94913, 16 June 2000 (2000-06-16) JACOBS K ET AL: "Human secreted protein clone py35_1 protein sequence SeqIdNo.32" XP002147604 99.4% identity in 315 aa overlap with SeqIdNo.2 abstract</p>	1-9,14
X	<p>--- DATABASE SWALL EBI, Hinxton, U.K. ; Accession Number: Q9Y3U9, 1 November 1999 (1999-11-01) KOEHRER K ET AL: "Hypothetical 34.9kDa protein" XP002147605 cited in the application 99.365% identity in 315 aa overlap with SeqIdNo.2 abstract</p>	1-9,14
A	<p>--- DATABASE EMBL EBI, Hinxton, U.K. ; Accession Number: AW106427, 21 October 1999 (1999-10-21) MARRA M ET AL: "Mus musculus cDNA clone IMAGE:2225799 5' similar to WP:Y53C12A.3 CE14888" XP002147606 cited in the application 97.826% identity in 506 nt overlap with SeqIdNo.3 abstract</p> <p>--- -/---</p>	1-9,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/03137

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 06247 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;ANDERSON PAUL (US); VIVIER ERIC (FR)) 2 March 1995 (1995-03-02) cited in the application ---	
A	WO 95 20604 A (LITWIN VIRGINIA M ;PHILLIPS JOSEPH H (US); UNIV LELAND STANFORD JU) 3 August 1995 (1995-08-03) cited in the application -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/03137

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9839448 A	11-09-1998	AU 6545398 A	22-09-1998
		EP 0972029 A	19-01-2000
		EP 0972030 A	19-01-2000
		WO 9839446 A	11-09-1998
WO 9825959 A	18-06-1998	AU 5796298 A	03-07-1998
		EP 0948531 A	13-10-1999
WO 9931236 A	24-06-1999	AU 1049199 A	07-06-1999
		AU 1503099 A	05-07-1999
		EP 1029045 A	23-08-2000
		EP 1037977 A	27-09-2000
		WO 9925825 A	27-05-1999
		AU 2294499 A	23-08-1999
		EP 1053318 A	22-11-2000
		WO 9940189 A	12-08-1999
WO 0009552 A	24-02-2000	AU 5557099 A	06-03-2000
		EP 1112286 A	04-07-2001
WO 9506247 A	02-03-1995	EP 0714510 A	05-06-1996
		JP 9502089 T	04-03-1997
		US 6194549 B	27-02-2001
		US 5786160 A	28-07-1998
WO 9520604 A	03-08-1995	AU 1908395 A	15-08-1995
		US 5770387 A	23-06-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
C 0 7 K	14/705	C 0 7 K	16/28	4 H 0 4 5
	16/28	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/02		1/68	A
	1/68	G 0 1 N	33/53	Y
G 0 1 N	33/53		33/566	
	33/566	C 1 2 P	21/08	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 N	15/00	Z N A A
(72)発明者	ル ディスコルデ, マゲリ			
	フランス、エフ - 75011 パリ、リュ サ			
	ン - サビ 66			
(72)発明者	プロスト, ステファン			
	フランス、エフ - 93500 パンティン、リ			
	ュ ユージーン エ マリ - ルイーズ カ			
	ルネ 24			
F タ-ム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 HA14			
	HA15			
	4B063 QA19 QQ08 QQ43 QR32 QR62			
	QS33 QS34			
	4B064 AG27 CA10 DA01 DA14			
	4C081 AB11 CD34			
	4C085 AA13 AA14 BB11 DD62 DD63			
	EE01			
	4H045 AA10 AA11 AA30 CA42 DA50			
	DA76 DA86 EA22 EA51			

专利名称(译)	存在于淋巴系造血干细胞和NK细胞表面的蛋白质及其用途		
公开(公告)号	JP2003516130A	公开(公告)日	2003-05-13
申请号	JP2001537364	申请日	2000-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	提交SARRIA阵列内尔双原子 原子能委员会		
申请(专利权)人(译)	Komissaria一个Reneruji原子 专员原子能		
[标]发明人	キルスゼンバウムマレク ルディスコルデマゲリ プロストステファン		
发明人	キルスゼン-バウム,マレク ル ディスコルデ,マゲリ プロスト,ステファン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/12 A61K39/00 A61K39/395 A61L27/00 A61P7/00 A61P37/00 A61P37/02 C07K14/705 C07K16/28 C12N5/0783 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6881 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/705 A61K2035/124 A61K2039/505 C07K16/28 C12N5/0646 C12Q1/6881 C12Q2600/158		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61L27/00.U A61P37/02 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.Y G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/DA01 4B064/DA14 4C081/AB11 4C081/CD34 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA51		
优先权	1999014241 1999-11-12 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及存在于淋巴样细胞系和成熟NK细胞的造血干细胞表面上的蛋白质，其相应的分离的cDNA序列和细胞标记，及其在制备针对所述蛋白质的抗体中的用途。本发明还涉及抗体在选择在其表面上表达蛋白质的细胞中的用途。分离的蛋白质位于序列SEQ ID NO : 2的21-152位的细胞外结构域，153-295位的五个跨膜结构域和296-350位。结构(a)由驻留的胞质结构域组成，表观分子量约为36-38 kDa，在结构(a)的N端具有20个氨基酸的信号序列，其蛋白质为SEQ ID NO : 2和序列SEQ ID NO : 2。其前体选自具有与NO : 2具有至少70%同一性或至少85%相似性的氨基酸序列的蛋白质，优选至少95%同一性或至少99%相似性。有。

