



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1886506 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200480035368. 6	A61P 31/14 (2006. 01)
(22) 申请日 2004. 09. 29	A61P 35/00 (2006. 01)
(30) 优先权数据	A61P 37/04 (2006. 01)
338331/2003 2003. 09. 29 JP	A61P 37/06 (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日	A61P 37/08 (2006. 01)
2006. 05. 29	C07K 14/705 (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据	C07K 16/28 (2006. 01)
PCT/JP2004/014207 2004. 09. 29	C12N 1/15 (2006. 01)
(87) PCT申请的公布数据	C12N 1/19 (2006. 01)
W02005/030955 JA 2005. 04. 07	C12N 1/21 (2006. 01)
(73) 专利权人 中外制药株式会社	C12N 5/00 (2006. 01)
地址 日本东京都	C12P 21/02 (2006. 01)
专利权人 松岛纲治	C12Q 1/02 (2006. 01)
桥本真一	G01N 33/15 (2006. 01)
(72) 发明人 松岛纲治 桥本真一 土屋政幸	G01N 33/50 (2006. 01)
平田裕一 吉田贤二 尾岛和行	(56) 对比文件
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司	EP 1201681 A1, 2002. 05. 02, 序列6 以及 34.
司 72001	WO 01/49728 A2, 2001. 07. 12, SEQ ID NO :
代理人 郭文洁 邹雪梅	121 以及 141.
(51) Int. Cl.	审查员 唐华东
C12N 15/09 (2006. 01)	
A61K 45/00 (2006. 01)	
A61P 1/16 (2006. 01)	
A61P 11/06 (2006. 01)	
A61P 31/12 (2006. 01)	

权利要求书 1 页 说明书 37 页 附图 11 页

(54) 发明名称

在 NK 细胞中表达的蛋白质

(57) 摘要

对纯化的免疫细胞的表达频率进行分析,成功地发现了在天然杀伤 (NK) 细胞中特异表达的 NKIR 基因。NKIR 基因编码受体,通过使用这种受体,可以鉴定出受体的激动剂或拮抗剂。

CN 1886506 B

1. 编码由 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列组成的蛋白质的 DNA。
2. 由 SEQ ID NO :3 的碱基序列的编码区域组成的 DNA。
3. 由 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列组成的蛋白质。
4. 含有权利要求 1 或 2 记载的 DNA 的载体。
5. 带有权利要求 1 或 2 记载的 DNA 或者权利要求 4 记载的载体的转化宿主细胞。
6. 权利要求 3 中记载的蛋白质的制备方法,包括培养权利要求 5 中记载的转化宿主细胞,从该转化宿主细胞或其培养上清中回收所述蛋白质的步骤。
7. 与权利要求 3 中记载的蛋白质结合的抗体。
8. 针对权利要求 3 中记载的蛋白质的配体的鉴定方法,其包括以下的 (a) 和 (b) 的步骤:
 - (a) 使候选化合物与权利要求 3 中记载的蛋白质或与表达权利要求 3 中记载的蛋白质的细胞接触;
 - (b) 检测候选化合物是否与权利要求 3 中记载的蛋白质或与表达权利要求 3 中记载的蛋白质的细胞结合。
9. 针对权利要求 3 中记载的蛋白质的激动剂的鉴定方法,其包括以下的 (a) 和 (b) 的步骤:
 - (a) 使候选化合物与表达权利要求 3 中记载的蛋白质的细胞接触;
 - (b) 检测候选化合物是否产生了成为权利要求 3 中记载的蛋白质的活化标识的信号。
10. 针对权利要求 3 中记载的蛋白质的拮抗剂的鉴定方法,其包括以下的 (a) 和 (b) 的步骤:
 - (a) 使候选化合物与表达权利要求 3 中记载的蛋白质的细胞接触;
 - (b) 通过与不存在候选化合物条件下检测的情况相比较,检测作为权利要求 3 中记载的蛋白质的活化标识的信号是否减少。
11. 用于权利要求 8 至 10 任一项记载的方法的试剂盒,其含有以下 (a) 或 (b) 中的至少一项:
 - (a) 权利要求 3 记载的蛋白质
 - (b) 权利要求 5 记载的转化宿主细胞。

在 NK 细胞中表达的蛋白质

技术领域

[0001] 本发明涉及在 NK 细胞中表达的蛋白质和编码该蛋白质的 DNA, 以及该分子的制备方法和用途。

[0002] 背景技术

[0003] 细胞毒性 T 细胞通过识别作为异物的特异性抗原肽与 MHC (Major histocompatibility complex, 主要组织相容性基因复合体) I 类分子形成的复合体而被活化, 从而对靶细胞起细胞毒性活性, 与之相反天然杀伤 (NK) 细胞通常破坏不表达 MHC I 类分子的靶细胞。这种正常细胞表面上的 MHC I 类分子的表达被病毒感染和癌变所抑制。一般认为 NK 细胞对这种 MHC I 类分子的表达减少的异常细胞起细胞毒性活性, 其通过在病毒感染和癌变细胞在自然免疫机制中承担着重要的作用。实际上, 发现 NK 细胞是具有自发损伤某些癌细胞的活性的细胞 (参见非专利文献 1)。而且, NK 细胞活性的丧失所引起的称之为 Chediak-Higashi 综合症 (由于染色体异常, 超过 10 岁时进入高级阶段, 无法控制病毒感染, 产生恶性淋巴瘤样病变, 经过 2-3 个月由于各类血细胞减少症而死亡) 的疾病的原因在于, 这支持了 NK 细胞在生物体内的这种作用。

[0004] 最近, 制备出缺少 NK 细胞标记 NK1.1+CD3- 的转基因小鼠, 对其特征进行分析, 结果显示 NK 细胞:

[0005] 1) 在癌细胞的转移和增殖的抑制中起着重要的作用、

[0006] 2) 应答细菌内毒素的干扰素 (IFN) γ 的主要产生细胞 (参见非专利文献 2)。

[0007] 另一方面, 近年来, 清楚了这样的认识: 具有相同 T 细胞受体, 同时还具有 NK 细胞受体的兼有自然免疫和获得性免疫性质的第 4 淋巴细胞的 NKT 细胞在包括肝脏、骨髓在内的大量器官中广泛存在, 并且这种细胞与免疫耐受, 自身免疫性疾病, 肝炎, 传染病等多种疾病相关。根据对早期发病的多发性硬化症小鼠的研究, 了解到作为包含于淋巴细胞的内的疫细胞的 NKT 细胞与多发性硬化症的发病有某种联系 (参见非专利文献 3)。并且, 由于 NKT 缺损小鼠中没有显示出作为主要哮喘症状的气管超敏反应, 提示通过使 NKT 细胞失活可以预防哮喘 (参见非专利文献 4)。已明确的活化机制表明, 与 NK 细胞不同, 活化这种 NKT 细胞可通过对 T 细胞受体进行刺激, 或者通过递呈在树突状细胞的 CD1d 受体上的糖脂 α -半乳糖基神经酰胺 (α -GalCer) 的活化进行 (参见非专利文献 3)。另一方面, 与 NK 细胞相同, NKT 细胞对 MHC I 型分子表达减少的细胞发挥细胞毒性活性, 因此认为其以与杀伤细胞抑制受体 (以下称为 KIR) 大致相同的机理调节细胞毒性活性所述杀伤细胞抑制受体被鉴定为淋巴细胞群的细胞毒性活性中的抑制调节分子。可是, 还知道存在不表达已知的 KIR 的 NKT 亚群, 且对于在活化中起负作用的抑制型受体和信号级联而言不清楚的地方还很多, 因此就需要进一步的研究。

[0008] 清楚了对 NKT 细胞的活化有效的配体物质, 但是还没有鉴定出特异性活化 NK 细胞的低分子配体。

[0009] 非专利文献 1: Trinchieri G., Adv Immunol. (1989), 47, 187-376

[0010] 非专利文献 2: Sungjin Kim, Koho Iizuka, Hector L. Aguila, Irving L. Weissman,

and Wayne M. Yokoyama, Proc. Natl. Acad. Sci. (2000), 97, 2731-2736

[0011] 非专利文献 3 :原田通成,谷口克,蛋白质核酸酶 (2002), 47, 2109-2116

[0012] 非专利文献 4 :Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, Dekruyff RH, Umetsu DT, Nat. Med. (2003), 9, 582-588

发明内容

[0013] 发明要解决的问题

[0014] 本发明是鉴于上述状况完成的,其目的在于分离特异性活化 NK 细胞或特异性使之失活的受体分子。更为具体地,以提供在 NK 细胞中表达的新型受体蛋白质和编码该蛋白质的 DNA 以及该分子的用途作为目标。

[0015] 解决问题的方法

[0016] 有人提出 NK 细胞的活化机制,是通过由蛋白质酪氨酸激酶磷酸化介导的正信号级联与由被磷酸化的信号传递分子的脱磷酸化产生的负信号级联的调节实施的。识别用于驱动这种负信号级联的分子的 NK 细胞的抑制型受体,在小鼠中是在细胞外具有 C 型凝集素结构域的 C 型凝集素家族的 Ly49 分子群,在人类中相当于在细胞外具有免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 结构域的 KIR 分子家族。就 KIR 分子而言,渐渐清楚了包括 KIR 分子及其所识别的 MHC 同种异型的详细情况。如根据 NK 细胞对 MHC I 类分子表达减少的细胞发挥细胞毒性活性所揭示的那样,大多数 KIR 分子识别在几乎所有类型的细胞中表达的典型的 MHC I 类分子,从而在细胞内传递负信号。另一方面, KIR 分子中也有以非典型的 MHC I 类分子作为配体的分子种类,据认为 KIR 分子整体在自然免疫系统中实现对自身来源的异常细胞进行监视的监视机构中心的作用。

[0017] 与 Ly49 相似, KIR 分子在细胞质内结构域中存在具有称为 ITIM 的 V/IXYXXL/V (V : 缬氨酸, I : 异亮氨酸, Y : 酪氨酸, L : 亮氨酸, X 为任意氨基酸) 的基序的功能性序列, 该 ITIM 基序中的酪氨酸残基一旦被磷酸化, 具有 SH2 结构域的蛋白质酪氨酸脱磷酸酶 SHP-1 即与该部位结合。通过 SHP-1 介导 NK 细胞中正信号级联的活化所需的酪氨酸磷酸化蛋白质 (SLP-67 分子被认为是其最有希望的候选物) 脱磷酸, 抑制 NK 细胞的活化。

[0018] 本申请发明人们为了解决上述问题进行了积极的研究。本申请发明人参照了 <http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp> 公开的纯化的免疫系统细胞 (单核细胞 / 巨噬细胞, T 细胞, 树突状细胞, 天然杀伤细胞, 中性粒细胞等) 的基因表达的系列分析 (SAGE) 分析数据 (Hashimoto, Blood (2003), 101, 3509-3513)。分析数据中, 除了鉴定了已知基因序列的序列标记, 还鉴定了许多认为是源于未知基因的标记, 并且还从其中鉴定出了具有特征表达图谱的标记。

[0019] 本申请发明人从其中成功发现了在天然杀伤细胞 (NK) 中特异表达的 NKIR 基因。根据其预测的氨基酸序列的特征, 提示出该基因是被鉴定为表达于 NK 细胞和 T 细胞亚群的、作为淋巴细胞群的细胞毒性活性抑制调节分子的杀伤细胞抑制受体 (以下称为 KIR) 的同系物。与多数 KIR 分子群聚集于第 19 号染色体上不同, 这种 NKIR 基因位于第 1 号染色体上。而且, 本申请发明人为了追求在药物开发中应用的可能性, 对该基因的特征进行了分析。已经报道了被认为是本发明基因的剪接变异体的序列 (W001/49728), 通过基于基因组的预测, 在 NCBI Annotation Project 中给出了其剪接变异体 (LOC343413), 然而对于其

功能完全不知道。而且,迄今为止尚不知道与本发明的基因序列完全一致的序列。

[0020] 如上所述,NK 细胞具有抗肿瘤,抗病毒活性,因此认为通过使用针对 KIR 的拮抗抗体抑制 KIR 的功能产生的抗肿瘤、抗病毒效果有临床应用的可能性。而且,以 NKT 细胞作为目标时,希望本发明可以应用于使用拮抗抗体抗 C 型肝炎等抗病毒性疾病或癌症,或者用于使用激动抗体抗过敏性疾病,抗哮喘,抗自身免疫疾病。

[0021] 本发明涉及在 NK 细胞中表达的新型蛋白质,编码该蛋白质的 DNA,以及它们的制备方法和用途,更为具体而言是提供了:

[0022] (1) 下述 (a)-(d) 任一项记载的 DNA:

[0023] (a) 编码包含 SEQ ID NO:2,4 或 6 任一项记载的氨基酸序列的蛋白质的 DNA;

[0024] (b) 含有 SEQ ID NO:1,3 或 5 任一项记载的碱基序列的编码区域的 DNA;

[0025] (c) 编码包含在 SEQ ID NO:2,4 或 6 任一项记载的氨基酸序列中通过替换,缺失,插入和 / 或添加了 1 个或多个氨基酸的氨基酸序列的,并且与包含 SEQ ID NO:2,4 或 6 任一项记载的氨基酸序列的蛋白质具有相同功能的蛋白质的 DNA

[0026] (d) 与包含 SEQ ID NO:1,3 或 5 任一项记载的碱基序列的 DNA 在严紧条件下杂交的 DNA;

[0027] (2) 编码包含 SEQ ID NO:2,4 或 6 任一项记载的氨基酸序列的蛋白质的片段的 DNA;

[0028] (3) 由 (1) 或 (2) 中记载的 DNA 编码的蛋白质;

[0029] (4) 含有 (1) 或 (2) 中记载的 DNA 的载体;

[0030] (5) 带有 (1) 或 (2) 中记载的 DNA 或者 (4) 记载的载体的宿主细胞;

[0031] (6) (3) 中记载的蛋白质的制备方法,包括培养 (5) 中记载的宿主细胞,从该宿主细胞或其培养上清中回收产生的蛋白质的步骤;

[0032] (7) 与 (3) 中记载的蛋白质结合的抗体;

[0033] (8) 针对 (3) 中记载的蛋白质的配体的鉴定方法,其包括以下的 (a) 和 (b) 的步骤:

[0034] (a) 使候选化合物与 (3) 中记载的蛋白质或与表达 (3) 中记载的蛋白质的细胞接触的步骤

[0035] (b) 检测候选化合物是否与 (3) 中记载的蛋白质或与表达 (3) 中记载的蛋白质的细胞结合的步骤;

[0036] (9) 针对 (3) 中记载的蛋白质的激动剂的鉴定方法,其包括以下的 (a) 和 (b) 的步骤:

[0037] (a) 使候选化合物与表达 (3) 中记载的蛋白质的细胞接触的步骤;和

[0038] (b) 检测候选化合物是否产生了成为 (3) 中记载的蛋白质的活化标识的信号

[0039] (10) 针对 (3) 中记载的蛋白质的拮抗剂的鉴定方法,其包括以下的 (a) 和 (b) 的步骤:

[0040] (a) 使候选化合物与表达 (3) 中记载的蛋白质的细胞接触的步骤;和

[0041] (b) 通过与不存在候选化合物条件下检测的情况相比较,检测作为 (3) 中记载的蛋白质的活化标识的信号是否减少的步骤;

- [0042] (11) 通过 (8) 中记载的方法鉴定获得的针对 (3) 中记载的蛋白质的配体；
- [0043] (12) 通过 (9) 中记载的方法鉴定获得的针对 (3) 中记载的蛋白质的激动剂；
- [0044] (13) 通过 (10) 中记载的方法鉴定获得的针对 (3) 中记载的蛋白质的拮抗剂；
- [0045] (14) 用于 (8) 至 (10) 任一项记载的方法中的试剂盒,其含有以下 (a) 或 (b) 中的至少一项：
- [0046] (a) (3) 记载的蛋白质
- [0047] (b) (5) 记载的宿主细胞；
- [0048] (15) 一种免疫抑制剂,其含有针对 (3) 中记载的蛋白质的激动剂 (或 (12) 中记载的激动剂) 作为有效成分；
- [0049] (16) 一种过敏性疾病或自身免疫疾病治疗剂,其含有针对 (3) 中记载的蛋白质的激动剂 (或 (12) 中记载的激动剂) 作为有效成分；
- [0050] (17) 一种免疫增强剂,其含有针对 (3) 中记载的蛋白质的拮抗剂 (或 (13) 中记载的拮抗剂) 作为有效成分；
- [0051] (18) 一种抗肿瘤或抗病毒剂,其含有针对 (3) 中记载的蛋白质的拮抗剂 (或 (13) 中记载的拮抗剂) 作为有效成分；
- [0052] (19) 链长至少为 15 个核苷酸并且与 (1) 或 (2) 中记载的 DNA 互补或者与其互补链互补的 DNA；
- [0053] (20) 一种与编码 (3) 中记载的蛋白质的基因的表达异常或者活性异常相关的疾病的检测药剂,其含有 (19) 中记载的 DNA 或 (7) 中记载的抗体。
- [0054] 此外,本发明的其它形式中,提供了：
- [0055] (a) 本发明的蛋白质在筛选针对该蛋白质的激动剂或拮抗剂中的用途。
- [0056] (b) 针对本发明的蛋白质的激动剂在制备免疫抑制剂中的用途。
- [0057] (c) 针对本发明的蛋白质的激动剂在制备过敏性疾病或自身免疫疾病治疗剂中的用途。
- [0058] (d) 针对本发明的蛋白质的拮抗剂在制备免疫增强剂中的用途。
- [0059] (e) 针对本发明的蛋白质的拮抗剂在制备抗肿瘤或抗病毒剂中的用途。
- [0060] 进而,本发明还涉及以下方法：
- [0061] (a) 一种抑制免疫功能的方法,其包括向给药对象 (患者等) 给药针对本发明的蛋白质的激动剂的步骤。
- [0062] (b) 一种过敏性疾病或自身免疫疾病的治疗方法 (或预防方法),其包括向给药对象 (患者等) 给药针对本发明的蛋白质的激动剂的步骤。
- [0063] (c) 一种增强免疫功能的方法,其包括向给药对象 (患者等) 给药针对本发明的蛋白质的拮抗剂的步骤。
- [0064] (d) 一种癌症 (肿瘤) 或病毒性疾病的治疗方法 (或预防方法),其包括向给药对象 (患者等) 给药针对本发明的蛋白质的拮抗剂的步骤。
- [0065] 附图的简要说明
- [0066] 图 1 是表示通过使用 His 收集柱 (trap column) 纯化的 NKIR 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳的分析结果的照片。
- [0067] 图 2 是表示通过抗 NKIR 的多克隆抗体检测 NKIR 蛋白质的照片。

[0068] 图 3 是表示通过 RT-PCR 分析对组织表达进行分析的结果的照片。A 表示 MTC 板 I 和 II, B 表示免疫系统和血液组分。各泳道表示如下:A:泳道 1:心脏,泳道 2:脑,泳道 3:胎盘,泳道 4:肺,泳道 5:肝脏,泳道 6:骨骼肌,泳道 7:肾脏,泳道 8:胰腺,泳道 9:脾脏,泳道 10:胸腺,泳道 11:前列腺,泳道 12:睾丸,泳道 13:卵巢,泳道 14:小肠,泳道 15:大肠,泳道 16:外周血白细胞,B:泳道 1:脾脏,泳道 2:淋巴结,泳道 3:胸腺,泳道 4:外周血白细胞,泳道 5:扁桃体,泳道 6:胎儿肝脏,泳道 7:骨髓,泳道 8:单核细胞,泳道 9:休眠 CD8+ 细胞,泳道 10:休眠 CD4+ 细胞,泳道 11:活化的 CD14+ 细胞,泳道 12:休眠 CD19+ 细胞,泳道 13:活化的 CD19+ 细胞,泳道 14:活化的单核细胞,泳道 15:活化的 CD4+ 细胞,泳道 16:活化的 CD8+ 细胞。

[0069] 图 4 是表示通过抗 NKIR 多克隆抗体检测在 NK-92 细胞中表达的天然 NKIR 蛋白质的照片。

[0070] 图 5 是表示通过抗 NKIR 多克隆抗体对 NK-92 细胞的流式细胞检测分析的图。

[0071] 图 6 表示的是对 COS-7 株中的 NKIR 基因的瞬时表达的流式细胞检测分析的图。

[0072] 图 7 是表示以人 NKIR 作为 query 进行 blast 检索,将其与获得的与之匹配的小鼠染色体序列进行比对的图。

[0073] 图 8 是表示人-小鼠 NKIR 序列的比对的图。

[0074] 图 9 是表示对各转化细胞株的流式细胞检测分析的图。

[0075] 图 10 是表示以荧光素酶活性作为指标的 ITIM 活性的检测结果的图。

[0076] 图 11-1 是表示实施例 16 中选择的 3 个克隆的 CD8 嵌合结构的图。

[0077] 图 11-2 是表示使用实施例 17 中使用的抗 CD8 抗体, LT8(Serotec) 和结合有 FIT 的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (Coulter) 对以下这些克隆进行 FACS 分析的结果的图。A:F11 克隆,没有 LT8(第一抗体), B:F11 克隆,有 LT8(第一抗体), C:CD8 嵌合克隆,没有 LT8(第一抗体), D:CD8 嵌合克隆,有 LT8(第一抗体)。

[0078] 图 12 是表示通过实施例 17 的报告基因检测测定 ITIM 功能活性的结果的图。LT8:抗 CD8 抗体 (LT8), CL:交联剂(大鼠抗小鼠 IgG1 抗体)

[0079] 最佳实施方式

[0080] 本申请发明人,通过使用 PCR 从人脾脏 cDNA 文库中克隆出在 NK 细胞中特异表达的基因。由于在获得克隆中包含被认为是剪接变异体的克隆,为了获得原始的序列进行 5' RACE,鉴定出了 NKIR 基因,其被推测为属于 KIR 家族。该基因的碱基序列表示于 SEQ ID NO:1 中,该基因编码的蛋白质的氨基酸序列表示于 SEQ ID NO:2 中。进而,使用从 NK-92 株中制备的总 RNA,通过 5' 和 3' RACE 法再次进行 NKIR 基因的全长克隆时,获得了在 5' 端具有 36 个碱基的信号样序列,在 3' 端约有 500 个碱基的延长序列的克隆。该克隆的碱基序列表示于 SEQ ID NO:3 中,由该碱基序列编码的蛋白质的氨基酸序列表示于 SEQ ID NO:4 中。进而,进行小鼠 NKIR 序列的克隆,获得的碱基序列表示于 SEQ ID NO:5 中,由该碱基序列编码的蛋白质的氨基酸序列表示于 SEQ ID NO:6 中。

[0081] 本发明提供了在 NK 细胞中表达的新型蛋白质,以及编码这种蛋白质的 DNA。作为本发明的 DNA 的优选的方式,是下列 (a)-(d) 任一项记载的 DNA:

[0082] (a) 编码包含 SEQ ID NO:2,4 或 6 任一项记载的氨基酸序列的蛋白质的 DNA

[0083] (b) 含有 SEQ ID NO:1,3 或 5 任一项记载的碱基序列的编码区域的 DNA

[0084] (c) 编码包含在 SEQ ID NO :2,4 或 6 任一项记载的氨基酸序列中替换,缺失,插入和 / 或添加了 1 个或多个氨基酸的氨基酸序列的并且与 SEQ ID NO :2,4 或 6 任一项记载的氨基酸序列构成的蛋白质具有相同功能的蛋白质的 DNA

[0085] (d) 与包含 SEQ ID NO :1,3 或 5 任一项记载的碱基序列的 DNA 在严紧条件下杂交的 DNA (更优选的是与包含 SEQ ID NO :1,3 或 5 任一项记载的碱基序列的 DNA 在严紧条件下杂交的并且编码与包含 SEQ ID NO :2,4 或 6 任一项记载的氨基酸序列的蛋白质具有相同功能的蛋白质的 DNA)。

[0086] 本发明包括与由本申请发明人鉴定的 NK 细胞表达蛋白质 (包含 SEQ ID NO :2,4 或 6 中记载的氨基酸序列的蛋白质) (下面,有时也称为“NKIR 蛋白质”) 功能相同的蛋白质。这种蛋白质中,包括例如这些蛋白质的变体,及其人和小鼠之外的生物中的同系物等。这里所谓“功能相同”是指作为对象的蛋白质与 NKIR 蛋白质具有相同的生物学或生物化学活性。作为这种活性,可以列举有,例如 KIR 具有的活性,抑制 NK 细胞的细胞毒性活性,或者导入宿主 T 细胞或肥大细胞等免疫系统细胞中的 KIR 分子所产生的对各种细胞类型的活化信号传递的抑制活性等,所述宿主细胞在细胞的活化方面存在相似的细胞内信号传递。因此,作为对象的蛋白质是否与由本发明人鉴定的蛋白质具有相同的生物学或生物化学活性,可以通过例如通过细胞质内钙的浓度的测定 (Bruhns P, Marchetti P, Fridman WH, Vivier E, Daeron M., J Immunol. (1999), 162, 3168-3175)、测定含有钙调磷酸化酶级联控制之下的 NF- κ B 序列的报告基因的表达 (Fry AM, Lanier LL, Weiss A., J Exp Med. (1996), 184, 295-300) 对由转导等导入了目的分子的免疫系统细胞的活化信号的抑制活性进行检测的方法,或者在使用肥大细胞作为宿主细胞时通过经 H^3 标记的血清素检测同样位于 Ca 级联下游的血清素的释放的方法 (Blery M, Delon J, Trautmann A, Cambiaggi A, Olcese L, Biassoni R, Moretta L, Chavrier P, Moretta A, Daeron M, Vivier E., J Boil Chem. (1997), 272, 8989-8996.), 进行评价。

[0087] 作为本领域技术人员熟知的用于制备与某些蛋白质具有相同功能的蛋白质的方法,可以例举有例如在蛋白质中的氨基酸序列导入变异的方法。具体而言,作为本领域技术人员可以通过采用定点诱变法 (Hashimoto-Gotoh, T, 等人 (1995) Gene 152, 271-275, Zoller, M. J, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W, 等人 (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, And Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492, Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) 等方法,在 SEQ ID NO :2,4 或 6 记载的氨基酸序列中导入适当变异,制备与该蛋白质具有相同功能的蛋白质。此外,氨基酸的变异也在自然界中发生。无论是人工合成的还是自然存在的,本发明的蛋白质还包括具有在由本发明人鉴定的 NKIR 蛋白质的氨基酸序列中存在一个或多个氨基酸发生变异的氨基酸序列,并且与该蛋白质具有相同功能的蛋白质。这种变体中,一般认为变异的氨基酸数通常为 50 个氨基酸或以下,优选 30 个氨基酸或以下,更为优选 10 个氨基酸以内 (例如,5 个氨基酸或以下)。

[0088] 而且,变异引入位点没有特别的限制,但优选在下述的基序或区域之外的位点。

[0089] 在变异的氨基酸残基中,希望变异为其它的氨基酸而保留氨基酸侧链的性质。例如,作为氨基酸侧链的性质,可以举例为疏水性氨基酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、亲水性氨基酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、具有脂肪族侧链的氨基酸 (G, A, V, L, I, P)、具有含羟基

的侧链的氨基酸 (S, T, Y)、具有含硫原子的侧链的氨基酸 (C, M)、具有含羧基和酰胺基侧链的氨基酸 (D, N, E, Q)、具有碱性侧链的氨基酸 (R, K, H)、具有芳香族侧链的氨基酸 (H, F, Y, W) (各括弧内表示的都是氨基酸的单字母代码)。

[0090] 已知的是具有通过对某氨基酸序列缺失, 添加一个或多个氨基酸残基和 / 或用其它氨基酸进行替换而被修饰的氨基酸序列的蛋白质可以维持其生物学活性 (Mark, D. F. 等人, Proc Natl Acad Sci USA(1984)81,5662-5666 ;Zoller, M. J. &Smith, M. Nucleic Acids Reseach(1982)10,6487-6500 ;Wang, A, 等人, Science 224,1431-1433 ; Dalbadie-McFarland, G. 等人, Proc Natl Acad Sci USA(1982)79,6409-6413)。

[0091] 向 NKIR 蛋白质的氨基酸序列中添加了多个氨基酸残基所得的蛋白质包括含有这些蛋白质的融合蛋白质。本发明中包括这些蛋白质与其它的肽或蛋白质融合的融合蛋白质。制备融合蛋白质的方法, 可以使用本领域技术人员公知的方法, 优选将编码 NKIR 蛋白质的 DNA 与编码其它肽或蛋白质的 DNA 框架方向一致地连结, 导入到表达载体中, 在宿主细胞中表达。作为与本发明的蛋白质融合的其它的肽或蛋白质, 没有特别的限定。

[0092] 作为与本发明的蛋白质融合的其它的肽, 可以使用例如 FLAG (Hopp, T. P. 等人, Biotechnology(1988)6,1204-1210)、6 个 His (组氨酸) 残基构成的 6×His, 10×His, 流感凝集素 (HA), 人 c-myc 的片段, VSV-GP 的片段, p18HIV 的片段, T7- 标记, HSV- 标记, E- 标记, SV40T 抗原的片段, lck- 标记, α -微管蛋白的片段, B- 标记, 蛋白质 C 的片段等公知的肽。此外, 作为与本发明的蛋白质融合的其它的蛋白质, 可以列举有例如 GST (谷胱甘肽 S 转移酶)、HA (流感凝集素)、免疫球蛋白恒定区, β -半乳糖苷酶、MBP (麦芽糖结合蛋白) 等。通过使市售的编码这些肽或蛋白质的 DNA 与编码本发明的蛋白质的 DNA 融合, 使由此制备出的融合 DNA 进行表达, 可以制备出融合蛋白质。

[0093] 此外, 本领域技术人员熟知的制备与某种蛋白质具有相同功能的蛋白质的其它方法, 可以例举有利用杂交技术 (SAMBROK, J 等人, Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) 的方法。也就是, 只要是本领域技术人员, 即可以基于编码 NKIR 蛋白质的 DNA 序列 (SEQ ID NO :1, 3 或 5) 或其一部分, 从同种或异种生物的 DNA 试样中分离与其具有高同源性的 DNA, 根据该 DNA 分离与 NKIR 蛋白质具有相同功能的蛋白质。

[0094] 本发明中, 包括由与编码 NKIR 蛋白质的 DNA 杂交的 DNA 编码的, 与 NKIR 蛋白质具有相同功能的蛋白质。作为这种蛋白质, 可以列举有例如人或小鼠和其它哺乳动物的同系物 (例如, 由大鼠, 家兔, 牛, 猴等的同系物编码的蛋白质)。

[0095] 用于分离编码与 NKIR 蛋白质具有相同功能的蛋白质的 DNA 的杂交条件可以由本领域技术人员进行适当选择。作为杂交条件, 可以例举有低严紧条件。作为低严紧条件, 是在杂交后的清洗中的例如 42°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS 的条件, 优选 50°C, 0.1×SSC, 0.1% SDS 的条件。作为更优选的杂交条件, 可以例举有高严紧条件。作为高严紧条件, 例如 65°C, 5×SSC, 0.1% SDS 的条件。在这种条件下, 有望通过提高温度可以有效地获得具有更高同源性的 DNA。但是, 可以认为温度和盐浓度等多种因素是影响杂交的严紧条件的因素, 只要是本领域技术人员对这些因素进行适当选择就可以实现类似的杂交的严紧。

[0096] 此外, 代替杂交, 使用基因扩增技术 (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology Edit. Ausubel 等人 (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4), 基于编

码本发明人等鉴定的蛋白质的 DNA 序列 (SEQ ID NO :1, 3 或 5) 或其一部分设计引物, 分离与编码由本发明人鉴定的蛋白质的 DNA 序列具有高同源性的 DNA, 基于该 DNA 还可以获得与由本发明人鉴定的蛋白质具有相同功能的蛋白质。

[0097] 本发明的蛋白质可以是“成熟”蛋白质的形式, 也可以是融合蛋白质这样的更大的蛋白质的一部分。本发明的蛋白质中, 也可以含有前导序列, pro 序列, 多个组胺酸残基这样利于纯化的序列, 或者为确保重组生产的稳定性所添加的序列等。

[0098] 由经这些杂交技术和基因扩增技术分离的 DNA 编码的并且与 NKIR 蛋白质功能相同的蛋白质, 通常与这些蛋白质 (包括 SEQ IDNO :2, 4 或 6 记载的氨基酸序列的蛋白质) 在氨基酸序列上具有高同源性。本发明的蛋白质中还包括与 NKIR 蛋白质功能相同并且与该蛋白质的氨基酸序列具有高同源性的蛋白质。所谓高同源性, 在氨基酸水平上, 通常是指至少 50% 及 50% 以上的同一性, 优选 75% 及 75% 以上的同一性, 更优选 85% 及 85% 以上的同一性, 更优选 95% 及 95% 以上的同一性。蛋白质的同源性的确定可以按照文献中 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc Natl Acad Sci USA (1983) 80, 726-730) 记载的算法进行。

[0099] 氨基酸序列的同一性, 可以通过例如由 Karlin 和 Altschul 提出的 BLAST 算法 (Proc Natl Acad Sci USA. 87 :2264-2268, 1990, Proc Natl Acad Sci USA. 90, 5873-5877, 1993) 进行确定。基于这种算法, 现在开发出了称之为 BLASTX 的程序 (Altschul 等人 j. mol. boil. 215 :403-410, 1990)。以 BLASTX 分析氨基酸序列时, 参数使用例如 score = 5, wordlength = 3。使用 BLAST 和 Grapped BLAST 程序时, 使用各程序的默认参数。这些分析方法的具体方法是公知的。 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)。

[0100] 根据下述的产生这些蛋白质的细胞、宿主或纯化方法, 获得的本发明的蛋白质在氨基酸序列, 分子量, 等电点或糖链的有无和形态等各不相同。但是, 只要获得的蛋白质与本发明的蛋白质功能相同, 就包括于本发明中。

[0101] 本发明的蛋白质, 可以通过本领域技术人员公知的方法, 制备成重组蛋白质或天然蛋白质。如果是重组蛋白质, 可以通过在适当的表达载体中插入编码本发明的蛋白质的 DNA (例如, 具有 SEQ ID NO :1, 3 或 5 记载的碱基序列的 DNA), 将其导入适当的宿主细胞, 回收获得的转化体, 得到提取物后, 经离子交换, 反相、凝胶过滤等层析或者在柱中固定了针对本发明的蛋白质的抗体的亲和层析筛滤, 或者进而通过将多个这些柱组合在一起纯化, 进行制备。

[0102] 此外, 在宿主细胞内 (例如, 动物细胞和大肠杆菌等) 表达作为本发明的蛋白质与谷胱甘肽 S 转移酶的融合蛋白质, 或者添加了多个组胺酸的重组蛋白质时, 表达的重组蛋白质可以使用谷胱甘肽柱或镍柱纯化。融合蛋白质纯化后, 根据需要在融合蛋白质中通过凝血酶或 Xa 因子等切断, 还可以除去目的蛋白质之外的区域。

[0103] 如果是天然蛋白质, 可以通过本领域技术人员公知的方法分离, 例如通过使下述的与本发明的蛋白质结合的亲和层析柱作用于表达本发明的蛋白质的组织或细胞的提取物进行纯化而分离。抗体可以是多克隆抗体, 也可以是单克隆抗体。

[0104] 此外, 本发明还提供了本发明的蛋白质的片段 (部分肽)。这种片段是与所有前述本发明的蛋白质的氨基酸序列部分相同, 但是不完全相同的蛋白质。本发明的蛋白质片段通常为由 8 个及 8 个以上的氨基酸残基, 优选 12 个及 12 个以上的氨基酸残基 (例如, 15 个

及 15 个以上的氨基酸残基) 的序列构成的蛋白质的片段。作为优选的片段, 包括例如具有缺失了包括氨基端的一系列残基或包括羧基端的一系列残基, 或者缺失了包括氨基端的一系列残基和包括羧基端的一系列残基这两部分残基的氨基酸序列的截短的 (truncation) 多肽。此外, 还优选像含有 α -螺旋与 α -螺旋形成区域, β -折叠与 β -折叠形成区域, 扭曲与扭曲形成区域, 卷曲与卷曲形成区域, 亲水性区域, 疏水性区域, α 两亲性区域, β 两亲性区域, 可变性区域, 表面形成区域, 基质结合区域和高抗原指数区域的片段这样的特征取决于其构造或功能的特性片段。其它的优选片段是生物学活性的片段。生物学活性的片段包括具有同样活性的片段, 其活性提高的片段, 或者减少了所不希望的活性的片段, 这种片段传递本发明的蛋白质的活性。可以例举有例如具有与配体结合从而在细胞内进行信号传递活性的片段。进而, 还包括在动物尤其是人中有抗原性或免疫原性的片段。优选这些蛋白质片段保持包括抗原活性在内的本发明的蛋白质的生物学或生物化学活性。特定的序列和片段的变异体也是构成本发明的一部分。优选的变异体由于同类氨基酸取代而与原来的序列不同, 也就是说, 以同样性质的其它残基取代某残基。典型的取代发生在 Ala, Val, Leu 和 Ile 之间, Ser 和 Thr 之间, 酸性残基 Asp 和 Glu 之间, Asn 和 Gln 之间, 碱性残基 Lys 和 Arg 之间, 或者在芳香族残基 Phe 和 Tyr 之间。

[0105] 本发明的上述蛋白质片段没有特别的限制, 但是优选至少含有下述基序或区域的片段。

[0106] 上述片段可以用于例如制备针对本发明的蛋白质的抗体, 筛选作为与本发明的蛋白质结合的配体的化合物, 和筛选本发明的蛋白质的激动剂和拮抗剂。

[0107] 可以通过基因工程方法, 公知的肽合成法或用适当的肽酶切断制备本发明的蛋白质片段 (部分肽)。蛋白质片段 (部分肽) 的合成也可以通过例如固相合成法, 液相合成法任一项方法进行。

[0108] 此外, 本发明中所谓“配体”是指与本发明的蛋白质结合的分子。配体包括天然配体和合成配体。所谓“激动剂”是指与本发明的蛋白质结合, 使之活化的分子。另一方面, 所谓“拮抗剂”是指抑制本发明的蛋白质的活化的分子。

[0109] 认为编码本发明的蛋白质的 DNA, 可以用于如上所述的本发明的蛋白质的体内的生产, 此外还用于例如由于编码本发明的蛋白质的基因的异常而产生的疾病和本发明的蛋白质可以治疗的疾病的基因治疗或基因诊断等。本发明的 DNA 只要能够编码本发明的蛋白质, 任意形态都可以。也就是说, 无论是根据 mRNA 合成的 cDNA, 基因组 DNA, 还是化学合成 DNA 等都可以。此外, DNA 只要可以编码本发明的蛋白质, 其包括具有基于遗传密码简并性的任意碱基序列的 DNA。

[0110] 本发明的 DNA 可以通过本领域技术人员公知的方法进行制备。例如, 可以通过以下方法进行制备: 从表达本发明的蛋白质的细胞中制备 cDNA 文库, 以本发明的 DNA 序列 (例如, SEQ ID NO:1, 3 或 5) 的一部分作为探针进行杂交。cDNA 文库, 可以通过文献 (Sambrook, J. 等人, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 中记载的方法制备, 或者也可以使用市售的 DNA 文库。此外, 还可以通过以下方法进行制备: 从表达本发明的蛋白质的细胞中制备 RNA, 经逆转录酶合成 cDNA 后, 基于本发明的 DNA 序列 (例如, SEQ ID NO:1, 3 或 5) 合成寡 DNA, 以其作为引物进行 PCR 反应, 扩增编码本发明的蛋白质的 cDNA。

[0111] 此外,通过对获得的 cDNA 的碱基序列进行确定,可以确定其编码的翻译区域,从而可以获得本发明的蛋白质的氨基酸序列。此外,通过以获得的 cDNA 作为探针筛选基因组 DNA 文库,可以分离出基因组 DNA。

[0112] 具体地进行以下步骤:首先,从表达本发明的蛋白质的细胞,组织,器官(例如, NK 细胞和下述的实施例中获得表达确认的组织)中分离 mRNA。mRNA 的纯化,用公知的方法例如蔗糖离心方法(Chirgwin, J. M. 等人, *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299)、AGPC(Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159) 等制备总 RNA,使用 mRNA 纯化试剂盒(Pharmacia)从总 RNA 中纯化分离 mRNA。此外也可以通过使用 QuickPrep mRNA 纯化试剂盒(Pharmacia)直接制备 mRNA。

[0113] 根据获得的 mRNA 用逆转录酶合成 cDNA。cDNA 的合成,还可以使用 AMV 逆转录酶第一链 cDNA 合成试剂盒(生物化学工业)进行。此外,使用本发明说明书中记载的引物等,按照采用 5'-AmpliFINDER RACE Kit(Clontech 制)和多聚酶链反应(polymerase chain reaction; PCR)的 5'-RACE 法(Frohman, M. A. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. 等人, *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932),进行 cDNA 的合成和扩增。从获得的 PCR 产物中制备出目的片段,与载体 DNA 连接。进而,由其制备重组载体,导入到大肠杆菌等中,选择克隆,制备出所希望的重组载体。可以通过公知的方法例如双脱氧核苷酸法确认目的 DNA 的碱基序列。

[0114] 此外,本发明的 DNA 中,考虑到表达中使用的宿主的密码子使用频率,可以设计表达效率更高的碱基序列(Grantham, R. 等人, *Nucleic Acids Research* (1981) 9, r43-74)。此外,本发明的 DNA 可以通过市售的试剂盒或公知的方法进行改变。作为改变,可以例举有,例如经限制酶的消化,合成寡核苷酸和适当的 DNA 片段的插入,接头的添加,起始密码子(ATG)和/或终止密码子(TAA, TGA 或 TAG)的插入等。

[0115] 此外,本发明的 DNA 是与 SEQ ID NO:1, 3 或 5 所示的各碱基序列构成的 DNA 杂交的 DNA,并且其含有编码与上述本发明的蛋白质功能相同的蛋白质的 DNA。本领域技术人员可以对杂交的条件进行适当选择,但是具体地可以使用上述条件。在这种条件下,提高温度可以获得同源性更高的 DNA。上述的杂交 DNA 优选是天然来源的 DNA,例如 cDNA 或基因组 DNA。

[0116] 此外,本发明还提供插入有本发明的 DNA 的载体。作为本发明的载体,有利于用于在宿主细胞内携带本发明的 DNA,表达本发明的蛋白质。

[0117] 作为本发明的载体,例如在以大肠杆菌为宿主时,为了在大肠杆菌(例如, JM109, DH5 α , HB101, XL1Blue)等中大量扩增大量制备载体,载体应具有用于在大肠杆菌中扩增的“ori”,并具有用于选择经转化的大肠杆菌的选择基因(例如,可以通过任意药物(氨苄青霉素,四环素,卡那霉素,氯霉素 α 素等)区分的药物抗性基因),无其它特别的限定。作为载体的例子,可以列举有 M13 系列载体, pUC 系列载体, pBR322, pBluescript, pCR-Script 等。此外,以 cDNA 的亚克隆,切除为目的时,除上述载体之外,还可以例举有例如 pGEM-T, pDIRECT, pT7 等。在以生产本发明的蛋白质为目的使用载体时,表达载体尤为有用。作为表达载体,例如,以在大肠杆菌中表达为目的时,表达载体具有上述特征以在大肠杆菌中被扩增,除此之外当以大肠杆菌 JM109DH5 α HB1-1 或 XL1Blue 为宿主时载体不可缺少可以在大肠杆菌中以更高效率表达的启动子,例如 lacZ 启动子(Ward 等, *NATURE* (1989) 341,

544-546 ;FASEB J. (1992)6, 2422-2427), B 启动子 (Better 等人, SCIENCE(1988)240, 1041-1043) 或 T7 启动子等。这些载体,除上述之外,可举例有 pGEX-5X-1 (Pharmacia 公司制),“QIA 表达系统”(Qiagen 公司制),pEGFP 和 pET(这种情况下,宿主优选表达 T7RNA 多聚酶的 BL21)。

[0118] 此外,在载体中,可以含有用于多肽分泌的信号序列。作为用于指导蛋白质分泌的信号序列,在大肠杆菌的周质中产生蛋白质时,可以使用 pelB 信号序列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987)169, 4379)。在宿主细胞中导入载体时,可以使用例如氯化钙法、电穿孔法等。

[0119] 除大肠杆菌之外,例如作为用于制备本发明的蛋白质的载体,可以例举有哺乳动物来源的表达载体(例如, pcDNA3 (Invitrogen 公司制), pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18 (17), p5322), pEF, pCDM8), 昆虫细胞来源的表达载体(例如“BAC-to-Bac 杆状病毒表达系统”(GIBCO BRL 公司制), pBacPAK8), 植物来源的载体(例如 pMH1, pMH2), 动物来源的表达载体(例如 pHSV, pMV, pAdexLcw) 逆转录病毒来源的载体(例如 pZIPneo), 酵母来源的表达载体(例如,“毕赤酵母表达试剂盒”(Invitrogen 公司制), pNV11, SP-Q01), 枯草杆菌来源的表达载体(例如 pPL608, pKTH50)。

[0120] 以在 CHO 细胞、COS 细胞、NIH3T3 细胞等动物细胞中表达为目的时,载体不可缺少用于在细胞内表达所必需的启动子,例如 SV40 启动子 (Mulligan 等人, Nature(1979)277, 108), MMLV-LTR 启动子, EF1 α 启动子 (Mizushima 等人, Nucleic Acids Res. (1990)18, 5322), CMV 启动子等,如果载体带有用于在细胞中选择转化的基因(例如,可以通过药物(新霉素, G418 等)区分的药物抗性基因)就更为优选。作为具有这种特性的载体,可以列举有例如 pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13 等。

[0121] 进而,在以稳定表达基因并且以增加细胞内基因的拷贝数为目的时,可例举有在缺失了核酸合成途径的 CHO 细胞中导入具有与其互补的 DHFR 基因的载体(例如, pCHOI 等),经氨甲蝶呤 (MTX) 扩增的方法。此外,在以基因的瞬时表达为目的时,可以例举有使用在染色体上带有表达 SV40T 抗原的基因 COS 细胞,通过带有 SV40T 的复制起始区域的载体 (pcD 等) 转化的方法。此外,作为复制起始区域,还可以使用源于多瘤病毒,腺病毒,牛乳头状瘤病毒 (BPV) 等等的复制起始区域。进而,为了增加宿主细胞系统中的基因拷贝数,表达载体可以含有氨基糖甙转移酶 (APH) 基因,胸苷激酶 (TK) 基因,大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Ecogpt) 基因,二氢叶酸还原酶 (dhfr) 基因等作为标记。

[0122] 另一方面,作为在动物体内表达本发明的蛋白质的方法,可例举有在适当的载体中插入本发明的 DNA,用例如逆转录病毒法,脂质体法,阳离子脂质体法,腺病毒法等导入到生物体内的方法等。通过这些方法,可以对由编码本发明蛋白质的基因的变异引起的疾病进行治疗。作为使用的载体,可以例举有例如腺病毒载体(例如 pAdexlcw)或逆转录病毒(例如 pZIPneo)等,但是并不仅限于此。在载体中插入本发明的 DNA 等一般的基因操作可以按照常规方法进行 (MolecularCloning, 5.61-5.63)。对生物体给药,可以用先体外后体内法,也可以用体内法。

[0123] 此外,本发明提供导入了本发明的载体的宿主细胞。作为本发明的导入了本发明的载体的宿主细胞,没有特别的限制,可以使用例如大肠杆菌或各种动物细胞等。本发明的宿主细胞可以用作例如用于制备或表达本发明的蛋白质的生产系统。用于制备本发明的蛋

白质的生产系统有体外和体内的生产系统。作为体外生产系统,可以举例有使用真核细胞的生产系统或使用原核细胞的生产系统。

[0124] 使用真核细胞时,例如,可以使用动物细胞,植物细胞,真菌细胞作为宿主。作为动物细胞,已知有例如 CHO(J. Exp. Med(1995),108,945)、COS、3T3、骨髓瘤、BHK(幼仓鼠肾)、HeLa、Vero 这样的哺乳类细胞,例如爪蟾卵母细胞(Ve11e,等人,Nature(1981)291,358-340)这样的两栖类细胞,或例如 Sf9, Sf21, Tn5 这样的昆虫细胞。作为 CHO 细胞,特别是,可以优选使用缺失了 DHFR 基因的 CHO 细胞 dhfr-CHO(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1980)77,4216-4220)或 CHO K-1(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1968)60,1275)。在哺乳动物中,以大量表达为目的时,尤为优选 CHO 细胞。在宿主中导入载体可以用磷酸钙法,DEAE 葡聚糖法,使用阳离子脂质体 DOTAP(Boehringer Mannheim 公司制)的方法,电穿孔法,脂质转染法等方法进行。

[0125] 作为植物细胞,例如烟草(Nicotiana Tabacum)来源的细胞已知为蛋白质生产系统,也可以对其进行愈伤组织培养。作为真菌细胞,已知有包括酵母(saccharomyces)属的酵母,例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae),包括曲霉属(Aspergillus)的丝状真菌,例如黑曲霉(Aspergillus niger)。

[0126] 使用原核细胞时,有使用细菌细胞的生产系统。作为细菌细胞,已知有大肠杆菌,此外还有枯草杆菌,大肠杆菌可以例举有例如 JM109, DH5 α , HB101 等。

[0127] 以这些细胞作为目标用 DNA 转化,通过在体外培养经转化的细胞获得蛋白质。培养可以按照公知的方法进行。例如,作为动物细胞的培养液,可以使用例如 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM。这时,也可以结合使用胎儿牛血清等血清添加液,也可以无血清培养。培养时的 pH 优选为约 6-8。培养通常在约 30-40 $^{\circ}$ C 下进行 15-200 小时,根据需要增加培养基的更换,通气,搅拌。

[0128] 另一方面,作为载体内生产蛋白质的系统,可以例举有例如使用动物的生产系统或使用植物的生产系统。以这些动物或植物作为目标导入 DNA,在动物或植物体内产生蛋白质,回收。本发明中的所谓“宿主”,包括这些动物,植物。

[0129] 使用动物时,有使用哺乳类动物、昆虫的生产系统。作为哺乳类动物,可以使用例如山羊,猪,绵羊,小鼠,牛等(Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。此外,使用哺乳类动物时,可以使用转基因动物。

[0130] 例如,将目的 DNA 制备成与编码山羊 β 酪蛋白这样的在乳汁中固有的蛋白质的基因的融合基因。接着,在山羊的胚胎中注射含有这种融合基因的 DNA 片段,将该胚胎移植到雌性山羊体内。从由接受胚胎的山羊产生的转基因山羊或其后代产生的乳汁中获得目的蛋白质。为了增加含有由转基因山羊的蛋白质的乳汁的产量,可以在转基因山羊中使用适当的激素(Ebert, K. M. 等人, Bio/technology(1994)12,699-702)。

[0131] 此外,作为昆虫,可以使用例如蚕。使用蚕时,通过使插入有编码目的蛋白质的 DNA 的杆状病毒感染蚕,可以从该蚕体液中获得目的蛋白质(Susumu, M 等人, Nature(1985)315,592-594)。

[0132] 进而,使用植物时,可以使用例如烟草。使用烟草时,在例如 pMON530 这样的用于植物表达的载体中插入编码目的蛋白质的 DNA,将该载体导入根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)这样的细菌中。使这种细菌感染烟草,例如烟草(Nicotiana tabacum),可

以从该烟草的叶中获得所希望的多肽 (Julian K. -C. Ma 等人, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

[0133] 由此获得的本发明的蛋白质,可以从宿主细胞内或细胞外(培养基等)分离出来,纯化成基本纯净均一的蛋白质。

[0134] 本发明提供了本发明的蛋白质的制备方法,其包括培养本发明的宿主细胞,从该宿主细胞或其培养上清中回收所产生的蛋白质的步骤。

[0135] 蛋白质的分离纯化,使用通常的蛋白质的纯化中使用的分离纯化方法就可以了,没有任何限定。例如,如果对以下方法适当选择并进行组合,就可以分离纯化出蛋白质:柱层析,过滤,超滤,盐析,溶剂沉淀,溶剂抽提,免疫沉淀,SDS-聚丙烯酰胺电泳,等电点电泳,透析,再结晶等。

[0136] 作为柱层析,可以例举有,例如亲和层析,离子交换层析,疏水性层析,凝胶过滤,反相层析,吸附层析等 (Strategies for Protein Purification and Characterization :A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak 等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。这些层析可以使用例如 HPLC、FPLC 等液相层析进行。本发明还包括使用这些纯化方法高度纯化的蛋白质。

[0137] 并且,在纯化蛋白质前或纯化后通过使蛋白质修饰酶作用,也可以任意添加修饰,部分地除去肽。作为蛋白质修饰酶,可以使用例如胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶,赖氨酰胺链内切酶 (lysyl endopeptidase),蛋白激酶,糖苷酶等。

[0138] 此外,本发明还提供了与本发明的蛋白质结合的抗体。本发明的抗体的形态没有特别的限制,除多克隆抗体外,还包括单克隆抗体。此外,还包括用本发明的蛋白质免疫家兔等动物,从中获得抗血清,所有类型的多克隆抗体和单克隆抗体,进而还包括人抗体和通过基因重组产生的人源化抗体。

[0139] 作为获得抗体的致敏抗原使用的本发明的蛋白质,不限于作为其获得来源的动物种类,但优选例如人,小鼠或大鼠来源的蛋白质,尤为优选人源的蛋白质。人源的蛋白质,可以使用本说明书中公开的基因序列或氨基酸序列获得。

[0140] 在本发明中,作为致敏抗原使用的蛋白质,可以是完整的蛋白质,也可以是蛋白质的部分肽。作为蛋白质的部分肽,可以例举有例如蛋白质的氨基 (N) 端片段或羧基 (C) 端片段。本说明书中所述“抗体”是指与蛋白质的全长或片段反应的抗体。

[0141] 将编码本发明的蛋白质或其片段的基因插入到公知的表达载体系统中,用该载体转化本说明书中所述的宿主细胞,通过公知的方法从该宿主细胞内外获得这种片段,可以将其作为致敏抗原。此外,还可以将表达蛋白质的细胞或其溶解物或化学合成的本发明的蛋白质作为致敏抗原使用。短肽,优选与钥孔戚血蓝素,牛血清白蛋白,卵白蛋白等载体蛋白适当结合而形成抗原。

[0142] 作为经致敏抗原免疫的哺乳动物,没有特别的限定,但是优选考虑到与细胞融合中使用的母细胞的适应性进行选择,一般来说,可以使用啮齿目,兔形目,灵长目动物。

[0143] 作为啮齿目动物,可以使用例如小鼠,大鼠,仓鼠等。作为兔形目动物,可以使用例如家兔。作为灵长目动物,可以使用例如猴。作为猴,可以使用例如狭鼻亚目(东半球猴),如食蟹猴,恒河猴,狒狒和猩猩等。

[0144] 可以按照公知的方法进行在动物中以致敏抗原免疫。作为一般的方法,在哺乳动

物的腹腔内或皮下注射致敏抗原。具体而言,对于以 PBS(磷酸缓冲盐)或生理盐水等适量稀释、悬浮的致敏抗原,根据需要,适量混合例如弗氏完全佐剂这样的常规佐剂,乳化后,对哺乳动物给药。优选,接着用适量混合了弗氏不完全佐剂的致敏抗原以每 4-21 天数次给药。此外,致敏抗原免疫时可以使用适当的载体。这样免疫后,通过常规方法对血清中所期待的抗体水平上升进行确认。

[0145] 这里,为了获得针对本发明的蛋白质的多克隆抗体,在确认血清中所期待的抗体水平上升后,取出经抗原致敏的哺乳动物的血液。从该血液中通过公知的方法分离血清。作为多克隆抗体,还可以使用含有多克隆抗体的血清,根据需要从该血清中进而分离出含有多克隆抗体的部分,进而通过利用蛋白质 A 或蛋白质 G 柱纯化该部分,可以制备免疫球蛋白 G 或 M。

[0146] 为了获得单克隆抗体,可以在确认经上述抗原致敏的哺乳动物的血清中的所期待的抗体水平上升后,从哺乳动物脾中取出免疫细胞,使之细胞融合。这时,作为在细胞融合中使用的优选的免疫细胞,尤为优选的是脾细胞。作为与前速免疫细胞融合的其它的母细胞,优选哺乳细胞的骨髓瘤细胞,更优选的是通过药物获得了融合细胞选择特性的骨髓瘤细胞。

[0147] 前述免疫细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合可以按照公知的方法进行,例如 Milstein 等人 (Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol (1981) 73, 3-46) 等方法。

[0148] 通过用例如 HAT 培养液(含有次黄嘌呤,氨嘌呤,胸腺嘧啶脱氧核苷的培养基)这样的常规选择培养液培养,对经细胞融合得到的杂交瘤进行选择。在该 HAT 培养液中培养时,通常连续进行数日至数周,足以使目的杂交瘤之外的细胞(非融合细胞)死亡。接着,实施常规的有限稀释法,对产生目的抗体的杂交瘤进行筛选和克隆。

[0149] 此外,除了通过对人以外的动物以抗原免疫获得的杂交瘤之外,还可以通过下述方法获得产生具有与蛋白质的结合活性的所希望的抗体的杂交瘤:以蛋白质,表达蛋白质的细胞、其细胞裂解物致敏淋巴细胞,例如经 EB 病毒感染的淋巴细胞,使致敏的淋巴细胞与例如 U266 这样的人源的具有永久分裂能力的骨髓瘤细胞融合(特开昭 63-17688 号公报)。

[0150] 接着,可以按以下方法进行制备:将获得的杂交瘤移植到小鼠腹腔中,从该小鼠中回收腹水,通过例如硫酸铵沉淀,蛋白质 A 或蛋白质 G 柱,DEAE 离子交换层析,偶联了本发明的蛋白质的亲和层析等对获得单克隆抗体进行纯化。本发明的抗体除了用于纯化检测本发明的蛋白质外,也成为本发明蛋白质的激动剂和拮抗剂的候选物。此外,认为该抗体还可应用于与本发明的蛋白质相关的疾病的抗体治疗。以在人体内以获得的抗体给药为目的(抗体治疗)使用时,为了降低免疫原性,优选使用人抗体或人源化抗体。

[0151] 例如,可以以蛋白质、蛋白质表达细胞或其溶解物作为抗原免疫带有人抗体基因的所有组分的转基因动物,从而获得产生抗体的细胞,使用该细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交瘤获得针对蛋白质的抗体(参照国际公开号 W092-03918, W093-2227, W094-02602, W094-25585, W096-33735 和 W096-34096)。

[0152] 除了使用杂交瘤产生抗体外,还可以使用经癌基因使产生抗体的致敏淋巴细胞等免疫细胞无限增殖的细胞。

[0153] 此外,这样获得的单克隆抗体还可以是使用基因重组技术产生的重组型抗体(参

见,例如 Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990)。从杂交瘤或产生抗体的致敏淋巴细胞等免疫细胞中克隆出编码重组型抗体的 DNA, 插入到适当的载体中, 将其导入宿主从而产生重组型抗体。本发明包括这种重组型抗体。

[0154] 进而, 本发明的抗体只要是与本发明的蛋白质结合, 可以是其抗体片段或抗体修饰物。例如, 作为抗体片段, 可以例举有用适当的接头将 Fab, F(ab')₂, Fv 或 H 链与 L 链的 Fv 连结的单链 Fv(scFv) (Huston, J. S. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。具体而言, 用例如木瓜蛋白酶, 胃蛋白酶等酶处理抗体, 生成抗体片段, 或者构建编码这些抗体片段的基因, 将其导入表达载体中, 于适当的宿主细胞中表达 (参见, 例如 Co, M. S. 等人, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. 等人, Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Birg, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137)。

[0155] 作为抗体修饰物, 也可以使用与聚乙二醇 (PEG) 等各种分子结合的抗体。本发明的“抗体”还包括这些抗体修饰物。为了得到这种抗体修饰物, 可以通过在获得的抗体上进行化学修饰获得。这些方法是本领域已经建立的方法。

[0156] 此外, 可以使用公知的技术将本发明的抗体制备为由非人抗体来源的可变区域与人抗体来源的恒定区构成的嵌合抗体, 或者由非人抗体来源的 CDR (互补性决定区域) 和人抗体来源的 FR (构架区域) 和恒定区域构成的人源化抗体。

[0157] 可以将如前述方法获得的抗体纯化至均一。本发明中使用的抗体的分离纯化可以使用常规的蛋白质中使用的分离纯化方法。例如, 如果对亲和层析等柱层析, 过滤, 超滤, 盐析, 溶剂沉淀, 溶剂抽提, 免疫沉淀, SDS-聚丙烯酰胺电泳, 等电点电泳等适当选择并进行组合, 就可以分离纯化出蛋白质 (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), 但并不仅限于此。由上述方法获得的抗体的浓度测定可以通过吸光度的测定或酶联免疫吸附测定法 (Enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) 进行。

[0158] 作为使用亲和层析中使用的柱, 可以例举有蛋白质 A 柱, 蛋白质 G 柱。例如, 作为使用蛋白质 A 柱的株, 可以例举有 HyperD, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等。

[0159] 作为亲和层析之外的层析, 可以举例有例如离子交换层析, 疏水性层析, 凝胶过滤, 反相层析, 吸附层析等 ((Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak 等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。这些层析可以使用例如 HPLC、FPLC 等液相层析进行。

[0160] 此外, 作为测定本发明的抗体的抗原结合活性的方法, 可以使用例如吸光度的测定、酶联免疫吸附测定法 (Enzyme linked immunosorbent assay; ELISA)、RIA (放射免疫测定法) 或荧光抗体法。使用 ELISA 时, 在固定了本发明的抗体的平板上添加本发明的蛋白质, 接着, 加入含有目的抗体的试样, 例如抗体产生细胞的培养上清或纯化抗体。酶, 可以通过添加识别经碱性磷酸酶标记的抗体的二级抗体, 培养平板, 接着清洗后, 加入 p-磷酸

硝基苯等酶底物测定吸光度,从而评价抗原结合活性。作为蛋白质的蛋白质片段,也可以使用包含例如由其 C 末端的片段。本发明的抗体活性的测定,可以使用 BIAcore (Pharmacia 制)。

[0161] 通过使用这些方法,可以实施本发明的蛋白质的检测或测定方法,其包括以下步骤:使本发明的抗体与预测含有本发明的蛋白质的试样接触,检测或测定该抗体与该蛋白质的免疫复合物。由于本发明的蛋白质的检测或测定方法可以特异性检测或测定蛋白质,因此其对于使用本发明的蛋白质的各种实验等有用。

[0162] 此外,本发明还提供了与本发明的 DNA (例如, SEQ ID NO :1,3 或 5 记载的碱基序列构成的 DNA) 或其互补链互补的链长至少为 15 个核苷酸的 DNA。

[0163] 这里所谓“互补链”是指,与 A:T (但是 RNA 时为 U),G:C 的碱基对构成的双链核酸的一条链相反的链。此外,所谓“互补”,不限于在至少有 15 个连续的核苷酸的区域完全互补的序列,可以具有至少 70%,优选至少 80%,更优选 90%,更优选 95% 及 95% 以上的碱基序列的同源性。用于确定同源性的算法可以使用本说明书中记载的算法。

[0164] 在这种核酸中包括编码本发明的蛋白质的 DNA 的检测或扩增中使用的探针或引物,用于检测该 DNA 的表达的探针或引物,用于控制本发明的蛋白质的表达的核苷酸或核苷酸衍生物 (例如,反义寡核苷酸或核酶或编码它们的 DNA 等)。此外,这种核酸还可以用于 DNA 芯片的制备。

[0165] 作为引物使用时,可以使 3' 侧的区域成为互补区域,在 5' 侧添加限制性酶识别序列或标记。

[0166] 此外,本发明还提供了编码本发明的蛋白质的基因的表达异常或者活性 (功能) 异常相关的疾病的检测药剂。

[0167] 其一个实例是一种包含与上述编码本发明的蛋白质的 DNA 或含有其表达控制区域的 DNA 杂交,并且链长至少为 15 个核苷酸的 DNA 的检测药剂。该 DNA,可以用作用在上述本发明的检测方法中作为用于检测编码本发明的蛋白质的基因或其表达控制区域的探针,也可以作用用于扩增编码本发明的蛋白质的基因或其表达控制区域的引物。本发明的 DNA,可以通过例如市售的 DNA 合成仪进行制备。探针也可以制备成经限制性酶处理等获得的双链片段。本发明的 DNA 作为探针使用时,优选使用合适的标记。作为标记的方法,可以例举有通过使用 T4 多核苷酸激酶以 ^{32}P 使 DNA 的 5' 端磷酸化的标记方法,以及使用 Klenow 酶等 DNA 聚合酶,以随机六聚寡核苷酸作为引物,获得经 ^{32}P 同位素、荧光色素或生物素等标记的底物碱基的方法 (随机引物法等)。

[0168] 本发明的检测药剂的一个实例是含有下述与本发明的蛋白质结合的抗体的检测药剂。在上述本发明的检测方法中,该抗体可以用于检测本发明的蛋白质。抗体只要可以检测本发明的蛋白质,其形态没有限制。用于检测的抗体中包括多克隆抗体和多克隆抗体,根据需要也可以对抗体进行标记。

[0169] 上述检测药剂中,除了作为有效成分的 DNA 或其抗体外,根据需要还可以混合例如无菌水,生理盐水,植物油,表面活性剂,脂质,助溶剂,缓冲剂,蛋白质稳定剂 (BSA 或明胶等),防腐剂等物质。

[0170] 此外,本发明的受体蛋白质有利于鉴定这些配体,激动剂或拮抗剂。本发明提供了使用本发明的蛋白质鉴定 (筛选) 该蛋白质的配体,激动剂或拮抗剂的方法。

[0171] 本发明的配体的鉴定方法的优选形态中,首先,使本发明的蛋白质或表达该蛋白质的细胞与候选化合物(被检试样)接触,接着检测候选化合物是否与本发明的蛋白质或表达该蛋白质的细胞结合(检验结合活性)。接着,选择具有结合活性的化合物作为配体。

[0172] 本发明的鉴定(筛选)方法中使用的本发明的蛋白质可以是重组蛋白质,也可以是天然来源的蛋白质。此外也可以是部分肽。此外也可以是细胞表面上表达的形态,或者作为膜成分的形态。作为候选化合物,没有特别的限制,可以例举有例如细胞提取物,细胞培养物上清,发酵微生物产物,海洋生物提取物,植物提取物,纯化或粗纯化的蛋白质,肽,非肽性化合物,合成的低分子化合物,天然化合物。与候选化合物接触的本发明的蛋白质,可以与例如作为纯化的蛋白质、作为可溶性蛋白质、作为与载体结合的形态、作为与其它蛋白质融合的融合蛋白质、作为在细胞膜上表达的形态、或者作为膜成分的候选化合物(被检试样)接触。

[0173] 作为采用本发明的蛋白质筛选例如与该蛋白质结合的蛋白质的方法,可以使用本领域技术人员公知的多种方法。这种筛选可以通过例如免疫沉淀法进行。具体而言,按以下方法进行。在 pSV2neo, pcDNA1, pCD8 等外来基因表达用载体中插入编码本发明的蛋白质的基因,在动物细胞等中表达该基因。作为表达中使用的启动子,只要是 SV40 早期启动子(Rigby In Williamson(ed.), Genetic Engineering, Vol. 3. Academic Press, London, p. 83-141(1982))、EF-1 α 启动子(Kim 等人 Gene 91, p. 217-223(1990))、CAG 启动子(Niwa 等人 Gene 108, p. 193-200(1991))、RSV LTR 启动子(Cullen Methods in Enzymology 152, p. 684-704(1987))、SR α 启动子(Takebe 等人, Mol. Cell. Biol. 8, p. 466(1988))、CMV 立即早期启动子(Seed and Aruffo Proc. Nati. Acad. Sci. USA 84, p. 3365-3369(1987))、SV40 晚期启动子(Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p. 385-394(1982))、腺病毒晚期启动子(Kaufman 等人, Mol. Cell. Biol. 9, p. 946(1989))、HSV TK 启动子等一般使用的启动子即可,没有特别的限定。

[0174] 为了通过在动物细胞中导入基因表达外源基因,可使用电穿孔法(Chu G 等人 Nuci. Acids Res. 15, 1311-1326(1987)), 磷酸钙法(Chen, Cand Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752(1987)), DEAE 葡聚糖法(Lopata, M. A. 等人 Nud. Acids Res. 12, 5707-5717(1984)), Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643(1985)), 脂质转染法(Derijard, B. Cell 7, 1025-1037(1994); Lamb, B. T. 等人 Nature Genetics 5, 22-30(1993); Rabindran, S. K. 等人 Science 259, 230-234(1993)), 但也可以是任意方法。

[0175] 通过在本发明的蛋白质的 N 末端或 C 末端导入特异性已经清楚的单克隆抗体的识别部位(表位),可以使本发明的蛋白质表达为具有单克隆抗体的识别部位的融合蛋白质。作为使用的表位-抗体系统,可以使用市售的表位-抗体系统(试验医学 13, 85-90(1995))。可以通过多克隆位点表达与 β -半乳糖苷酶、麦芽糖-结合蛋白质、谷光苷肽 S-转移酶、绿色荧光蛋白(GFP) 等的融合蛋白质的载体现有市售。

[0176] 现在已经报道了形成融合蛋白质而不改变本发明蛋白质的性质,只导入包含几个至十几个的小表位部分,制备融合蛋白质的方法。例如,可以使用聚组氨酸(His-t 标记),流感凝集素 HA, 人 c-myc, FLAG, 水泡性口膜炎病毒糖蛋白(VSV-GP), T7 基因 10 蛋白(T7-标记), 人单纯疱疹病毒糖蛋白(HSV-标记), E-标记(单克隆噬菌体上的表位)等表位以及识别它们的单克隆抗体作为用于筛选与本发明的蛋白质结合的蛋白质的表位-抗体系统

(实验医学 13,85-90(1995))。

[0177] 就免疫沉淀而言,通过在利用合适的表面活性剂制备的细胞裂解液中添加这些抗体,使其形成免疫复合物。这种免疫复合物由本发明的蛋白质、以及与其具有结合能力的蛋白质和抗体构成。除了使用针对上述表位的抗体之外,还可以利用针对本发明的蛋白质的抗体进行免疫沉淀。针对本发明的蛋白质的抗体,可以通过例如以下方法进行制备:在合适的大肠杆菌表达载体中导入编码本发明蛋白质的基因,于大肠杆菌中表达,纯化表达的蛋白质来免疫家兔,小鼠,大鼠,山羊,鸡等进行制备。此外,还可以通过以合成的本发明的蛋白质的部分肽免疫上述动物进行制备。

[0178] 例如如果抗体是小鼠 IgG 抗体,可以使用蛋白质 A Sepharose 或蛋白质 G Sepharose 沉淀免疫复合物。此外,在将本发明的蛋白质制备成例如与 GST 等的表位的融合蛋白质时,可以利用谷胱甘肽-Sepharose4B 等与这些表位特异性结合的物质,以与利用本发明的蛋白质的抗体的情况相同的形式形成免疫复合物。

[0179] 就免疫沉淀一般的方法而言,可以按照或遵循例如文献 (Harlow, B. and Lane, D. ;Antibodies pp. 511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York(1988)) 中记载的方法进行。

[0180] 在免疫沉淀的蛋白质的分析中, SDS-PAGE 是一般的方法,可以使用适当浓度的凝胶根据蛋白质的分子量分析结合的蛋白质。此外,这时,由于一般来说用考马斯染色或银染这样的蛋白质常规染色法难以检测出与本发明蛋白质结合的蛋白质,因此通过在含有放射性同位素 ^{35}S 蛋氨酸或 ^{35}S -半胱氨酸的培养液中培养细胞,标记该细胞内的蛋白质,检测所述蛋白质可以提高检测灵敏度。如果已知蛋白质的分子量,也可以由 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶直接纯化目的蛋白质,测定其序列。

[0181] 此外,作为使用本发明的蛋白质分离与该蛋白质结合的蛋白质的方法,可以使用例如 Western blotting 法 (Skolnik E. Y. 等人 Cell 65 : 83-90(1991)) 进行。也就是说,可以通过以下方法进行检测:使用噬菌体载体 (λ gt11, ZAP 等) 从预期表达与本发明的蛋白质结合的蛋白质的细胞、组织、器官 (例如, NK 细胞) 中制备 cDNA 文库,使其在 LB-琼脂糖上表达,将表达的蛋白质固定在过滤器上,使纯化的经标记的本发明的蛋白质与上述过滤器反应,标记表达与本发明的蛋白质结合的蛋白质的噬菌斑。作为标记本发明的蛋白质的方法,可以例举有利用生物素与抗生物素蛋白的结合性的方法,与利用与本发明的蛋白质或者与本发明的蛋白质融合的肽或多肽特异性结合的抗体的方法 (例如 GST 等),利用放射性同位素的方法或利用荧光的方法等。

[0182] 此外,作为本发明的上述鉴定 (筛选) 方法的其它形态,可以例举有采用以下系统进行的方法:使用细胞的双杂交系统 (Fields S. and Sternglanz R. Trends Genet. 10 : 286-292(1994) ;Dalton S. and Treisman R. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68 : 597-612(1992) ;“MATCHMAKER 双杂交系统”;“哺乳动物 MATCHMAKER 双杂交检测试剂盒”;“MATCHMAKER 单杂交系统” (均由 Clontech 公司生产) 以及“HybriZAP 双杂交载体系统” (Stratagene 公司生产))。在双杂交系统中,从预期使本发明的蛋白质或其部分肽与 SRF DNA 结合区域或 GAL4DNA 结合区域融合,在酵母细胞中表达,在预计表达与本发明的蛋白质结合的蛋白质的细胞中制备以与 VP16 或 GAL4 转录活化区域融合的形式表达的 cDNA 文库,

将其导入到上述酵母细胞中,从检测出的阳性克隆中分离出来自文库的 cDNA (酵母细胞中一旦表达与本发明的蛋白质结合的蛋白质,就可以通过二者的结合使报告基因活化,从而检出阳性克隆)。

[0183] 通过在大肠杆菌中导入分离的 cDNA 使其表达,可以获得该 cDNA 编码的蛋白质。由此可以制备出与本发明蛋白质结合的蛋白质或其基因。作为在双杂交系统中使用的报告基因,可以列举有例如 HIS3 基因, Ade2 基因, LacZ 基因, CAT 基因, 荧光素酶和 PAI-1 (1 型纤溶酶原激活物抑制剂) 等,但并不仅限于此。通过双杂交系统的筛选除酵母细胞外还可以使用哺乳动物细胞等进行。

[0184] 与本发明的蛋白质结合的候选化合物的筛选也可以使用亲和层析进行。例如,将本发明的蛋白质固定在亲和柱的载体上,加入预计表达与本发明的蛋白质结合的蛋白质的候选化合物。作为这种情况下的候选化合物,可以例举有例如细胞提取物,细胞溶解物等。在加入候选化合物后,清洗柱,可以制备出与本发明的蛋白质结合的蛋白质。

[0185] 对于获得的蛋白质,通过分析其氨基酸序列,基于此序列合成寡 DNA,以该 DNA 作为探针筛选 cDNA 文库,可以获得编码该蛋白质的 DNA。

[0186] 在本发明中,还可以使用利用表面等离子体谐振现象的生物传感器作为检测或测定结合的候选化合物的手段。利用表面等离子体谐振现象的生物传感器,使用微量的蛋白质并且不进行标记,就可以实时观察到作为表面等离子体谐振的本发明的蛋白质与候选化合物之间的相互作用 (例如 BIAcore, Pharmacia 制)。因此,通过使用 BIAcore 等生物传感器,可以对本发明的蛋白质与候选化合物的结合进行评价。

[0187] 进而,本发明中还含有可以由上述的本发明的方法鉴定的配体。

[0188] 针对本发明蛋白质的激动剂的鉴定方法的优选形态中,首先,使表达本发明的蛋白质的细胞与候选化合物接触,检测候选化合物是否产生成为本发明的蛋白质的活化的标识的信号。也就是说,使候选化合物作用于本发明的受体蛋白,以本发明的蛋白质应答于激动剂刺激而产生的信号的有无作为标识,判断候选化合物是否是激动剂。

[0189] 本发明人发现了由本发明的受体蛋白质产生的信号诱导了免疫抑制作用。因此,本发明的上述信号的有无的检测,可以通过例如测定免疫抑制作用的诱导的有无等进行。作为一个实例,通过原本没有交叉性的人和小鼠之间的免疫系统,以下述方式对缺失了免疫能力的小鼠移植人造血干细胞重建免疫系统的人源化模式小鼠 (Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Katamura K, and Nakahata T, Blood (2003), 102, 873-880) 诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) 后,然后对其施用激动剂候选物质,以对这种小鼠进行 EAE 评价 (后肢的麻痹,尿失禁和体重减少的定量)。上述方法中,在检测出上述信号时,判定候选化合物是激动剂。并且本发明还包括可由上述方法鉴定出的激动剂。

[0190] 此外,本发明还提供了一种免疫抑制剂,其含有针对本发明的蛋白质的激动剂作为有效成分。预计本发明的免疫抑制剂对例如过敏性疾病 (例如过敏性哮喘等) 自身免疫性疾病等的治疗有效。因此本发明提供了含有针对本发明的蛋白质的激动剂作为有效成分的过敏性疾病或者自身免疫性疾病的治疗剂。

[0191] 针对本发明蛋白质的拮抗剂的鉴定方法的优选实例中,首先,使表达本发明的蛋白质的细胞与候选化合物接触,接着,与在不存在候选化合物下的检测情况比较,检测成为

本发明的蛋白质的活化的标识的信号是否减少。

[0192] 认为由于减少(抑制)了本发明的受体蛋白质引发的信号,引起了免疫增强作用(例如,抗病毒活性,抗肿瘤活性等)。因此,通过检测例如免疫增强作用的上升可以测定本发明的上述信号的减少。作为一例研究例,通过以下方式进行:在体外,通过在存在或不存在这种拮抗剂条件下测定NK细胞对于靶细胞(例如K-562株等NK感受性株)的细胞毒性活性,并进行比较,或者在体内先使用前述重新构建了人免疫系统的人源化模式小鼠,在移植了病毒感染人细胞或人癌组织后施用以拮抗剂候选物质,评价移植的病毒感染人细胞或人癌组织对这种小鼠的细胞毒性活性。

[0193] 在上述方法中,检测出上述信号时,判定候选化合物是拮抗剂。并且本发明还包括可由上述方法鉴定出的拮抗剂。

[0194] 此外,本发明还提供了一种免疫增强剂,其含有针对本发明的蛋白质的拮抗剂作为有效成分。预计本发明的免疫增强剂作为抗肿瘤剂或者作为抗病毒剂有效。因此本发明提供了含有针对本发明的蛋白质的拮抗剂作为有效成分的抗肿瘤剂或者抗病毒剂。

[0195] 此外,作为分离激动剂或拮抗剂等与本发明的蛋白质结合的化合物的方法,例如使合成化合物,天然物质库或随机噬菌体肽展示文库作用于固定的本发明的蛋白质,筛选与本发明的蛋白质结合的方法,或使用基于组合化学技术的高通量筛选方法(Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson DL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ; Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384, p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384p17-9)等是本领域公知的方法。

[0196] 本发明还提供了用于在上述鉴定方法中使用的试剂盒。该试剂盒含有本发明的蛋白质或表达本发明的蛋白质的细胞。该试剂盒中,也可以含有成为NKIR蛋白质的配体、激动剂或拮抗剂的候选化合物。

[0197] 在使用本发明的蛋白质、或者通过本发明的鉴定(筛选)方法分离的化合物、本发明的上述药剂作为人或例如小鼠,大鼠,豚鼠,家兔,鸡,猫,狗,绵羊,猪,牛,猴,狒狒和黑猩猩这样的哺乳动物的药剂时,除了以蛋白质或分离的化合物本身直接施用外,还可以通过公知的制剂学方法制剂化进行施用。例如,可以根据需要作为糖包衣片,胶囊剂,酞剂或微胶囊剂口服给药,或者以与水或其它的药学上可允许的液体的无菌溶液或悬浮剂的注射剂的形式非口服给药。例如,一般认为,通过使其与作为药理学上允许的载体或媒介,具体而言,无菌水,生理盐水,植物油,乳化剂,悬浮剂,表面活性剂,稳定剂,调味剂,赋形剂,载体,防腐剂,结合剂等适当组合,以一般认为的制药实施中需要的单位用量形式混合而制剂化。这些制剂中的有效分量是可以获得指示范围内的适当容量的剂量。

[0198] 作为可以在片剂和胶囊剂中混合的添加剂,可以使用例如凝胶,玉米淀粉,黄耆胶和阿拉伯树胶这样的结合剂,微晶纤维素这样的赋形剂,玉米淀粉,凝胶和褐藻胶这样的膨化剂,硬脂酸镁这样的润滑剂,蔗糖,乳糖或糖精这样的甜味剂,薄荷油、アカモノ油(Gaultheria adenothrix oil)或樱桃这样的调味剂。在制剂单位形态为胶囊剂时,上述材料中进而还可以含有油脂之类的液状载体。用于注射的无菌组合物可以使用注射用蒸馏水

这样的载体 (vehicle) 按照常规的制剂实施处方。

[0199] 作为注射用的水溶液,可以例举有例如生理盐水,葡萄糖或含有其它辅药的等渗溶液,例如 D- 山梨糖醇, D- 甘露糖, D- 甘露醇和氯化钠,还可以与合适的助溶剂合用,所述合适的助溶剂例如醇,具体而言是乙醇,例如丙稀和聚乙烯这样的多元醇,和例如聚山梨醇酯 80 (TM) 和 HCO-50 这样的非离子性表面活性剂。作为油性液,可例举有芝麻油,大豆油,也可以与作为助溶剂的苯甲基或苯甲醇合用。此外,也可以与例如磷酸盐缓冲液、醋酸钠缓冲液这样的缓冲液,例如盐酸普鲁卡因这样的止痛剂,例如苯甲基,苯酚这样的稳定剂,抗氧化剂配合。通常将制备的注射液填充于适当的安瓿中。

[0200] 对患者给药,通过例如动脉内注射,静脉内注射,皮下注射等,除此之外还通过经鼻腔内的,支气管内的,肌肉内的,经皮的或者经口的公知的方法进行。根据患者的体重、年龄和给药方法等对给药量进行改变,但是只要是本领域技术人员就可以适当的选择出合适的给药量。此外,还认为如果该化合物是由 DNA 编码的化合物,就将该 DNA 插入基因治疗用载体,进行基因治疗。给药量、给药方法根据患者的体重、年龄和症状等进行改变,但是只要是本领域技术人员就可以适当的选择出合适的给药量。

[0201] 本发明蛋白质的给药量、其每次给药量根据给药对象,对象器官,症状,给药方法而不同,但是一般认为以注射剂形态在正常成人 (体重为 60kg) 中给药时是每天约 100 μ g 至 20mg。

[0202] 与本发明的蛋白质结合的化合物或调节本发明的蛋白质的活性的化合物的给药量根据症状而各有差异,但是一般认为在经口给药时,在正常成人 (体重为 60kg) 中是每天约 0.1 至 100mg,优选约 1.0 至 50mg,更优选的是约 1.0 至 20mg。

[0203] 在非经口给药时,其每次给药量根据给药对象,对象器官,症状,给药方法而不同,但是一般认为以注射剂形态在正常成人 (体重为 60kg) 中给药时合适的剂量通常是通过静脉注射以每天约 0.01 至 30mg,优选约 0.1 至 20mg,更优选约 0.1 至 10mg 给药。在其它动物给药时,也可以以换算成每 60kg 体重的量或换算成单位体表面积的量给药。

[0204] 并且,本说明书中引用的所有现有技术文献均并入本说明书作为参考。

[0205] 实施例

[0206] 下面,通过实施例对本发明进行更为具体的说明,但是本发明并不受这些实施例的限制。

[0207] [实施例 1] 全长序列的克隆

[0208] 本申请发明人在 <http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp> 所公开的免疫系统细胞的 SAGE (SAGE :基因表达的系列分析) 分析数据中,发现了特异于 NK 细胞的未知基因序列标记 (表 1),并发现该标记存在于公开公报 (W00149728)AX191619 中。表 1 表示了序列标记 (TGCCGCATAA) 在 NK 细胞来源的文库中的选择表达。

[0209] [表 1]

[0210]

[0211] 基于此设计出完整编码区域的引物 (SA1 (5' -5'-TTGAATTCACACACCCACAGGACCTGC AGCTGAA-3' /SEQ ID NO :7)、SA2 (5' -TTGGATCCACTGAAGGACCCACAGAAAGAGTTGA-3' /SEQ ID NO :8)),用 PCR 从人脾脏 cDNA 文库中克隆出基因。所得克隆的碱基序列示于 SEQ ID NO :1 中,由该碱基序列编码的蛋白质的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :2 中。此外,更为详细的步骤如下所示:

[0212] (1)pGEMTE_NK1 的构建

[0213] 在以下反应条件下进行 PCR。

[0214] 模板 :marathon-ready cDNA 人脾脏 (CLONTECH)

[0215] 引物 :SA1< = >SA2

[0216] 反应条件 :96℃下 1 分钟;

[0217] 96℃下 30 秒,72℃下 4 分钟进行 5 个循环;

[0218] 96℃下 30 秒,70℃下 4 分钟进行 5 个循环;及

[0219] 96℃下 20 秒,68℃下 4 分钟进行 25 个循环。

[0220] 用 TaKaRa Ex Taq (添加了缓冲液,dNTP 混合物)进行 PCR。经琼脂糖凝胶电泳切出约 1.5kb 的条带。在用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化后,插入到 pGEM T-Easy 载体中制备成 pGBMTE_NK1。用引物 SA1-7, T7 和 SP6 确认碱基序列。

[0221] SA3 :5' -ACCCTGAGATGTCAGACAAAG-3' /SEQ ID NO :9

[0222] SA4 :5' -GCCACCTCACACCAGTAAAG-3' /SEQ ID NO :10

[0223] SA5 :5' -CCTCCGATCCTGTATTCCTTC-3' /SEQ ID NO :11

[0224] SA6 :5' -TGGAGCTGTGGGTGGTATCTG-3' /SEQ ID NO :12

[0225] SA7 :5' -AGAACCTCAAAGAGGAGTGAA-3' /SEQ ID NO :13

[0226] T7 启动子引物 :5' -ATTATGCTGAGTGATATCCC-3' /SEQ ID NO :14

[0227] SP6 启动子引物 :5' -ATTTAGGTGACACTATAGAA-3' /SEQ ID NO :15

[0228] (2)pCOS_NK1 的构建

[0229] 用 EcoRI 和 BamHI 切断 pGBMTE_NK1,经琼脂糖凝胶电泳切出约 1.5kb 的条带,在用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化后,插入到 pCOS1 载体的 EcoRI-BamHI 位点制备成 pCOS_NK1。

[0230] (3)pCHO2-NK1-FLAG 的构建

[0231] 在以下反应条件下进行 PCR。

[0232] 模板 :pGBMTE_NK1

[0233] 引物 :SAS1 (5' -GGGAATTCATGTTGCCATCTTTAGTTCC-3' /SEQ ID NO :16) ⇌ SAS2 (5' -AAGGATCCACTCCTCTCTCTGGAGAC-3' /SEQ ID NO :17)

[0234] 反应条件 :94℃下 2 分钟;94℃下 15 秒,55℃下 30 秒,68℃下 1 分钟,进行 25 个循环

[0235] 使用 KOD plus (TOYOBO ;添加了缓冲液,dNTPs 和 MgSO₄)进行 PCR。在用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化后,用 EcoRI 和 BamHI 切断,经琼脂糖凝胶电泳切出约 1kb 的条带。在用 QIAquickGel 提取试剂盒纯化后,插入到 pCHO2-FLAG 载体的 EcoRI-BamHI 位点制备成 pCHO2-NK1-FLAG。用引物 SAS1, SAS2, S3, S4, S5, EF1 α , polyA 确认碱基序列。

[0236] EF1 α :5' -GCCTCAGACAGTGGTTCAAA-3' /SEQ ID NO :18

- [0237] IgG1polyA5' -AGAACCATCACAGTCTCGCA-3' /SEQ ID NO :19
- [0238] (4)pCHO2-SGNKI-FLAG 的构建
- [0239] 在以下反应条件下进行 PCR。
- [0240] A :模板 :pCOS2-SGhMPL-FLAG
- [0241] 引物 :Hmp1-sig1(5' -AAGAATTCCACCATGGCTGGACCTGCCAC-3' /SEQ ID NO :20) ⇌ NK1-sig2(5' -ACAGGGTTTGGCCAGGCTTGGGCTTCCTGCACTGTCCAGAG-3' /SEQ IDNO :21)
- [0242] B :模板 :pGBMTE_NK1
- [0243] 引物 :NK1-sig1(5' -GCAGGAAGCCCAAGCCTGGCCAAACCCTGT-3' /SEQ ID NO :22) ⇌ SAS2
- [0244] C :模板 :反应系统 A 和 B 的产物的混合物
- [0245] 引物 :Hmp1-sig1<->SAS2
- [0246] 反应条件 :94℃下 2 分钟 ;94℃下 15 秒,55℃下 30 秒,68℃下 1 分钟,进行 25 个循环。
- [0247] 使用 KOD plus (TOYOBO ;添加了缓冲液,dNTPs 和 MgSO₄) 进行 PCR。在用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化后,用 EcoRI 和 BamHI 切断,经琼脂糖凝胶电泳切出约 0.9kb 的条带。在用 QIAquickGel 提取试剂盒纯化后,插入到 pCHO2-FLAG 载体的 EcoRI-BamHI 位点制备成 pCHO2-SGNKI-FLAG。用引物 NK1-sig1,NKI-sig2,SAS2,S3,S4,S5,EF1 α ,polyA 确认碱基序列。
- [0248] 推测经测定的由以上 (1) 至 (4) 的步骤获得的克隆的碱基序列编码由 429 个氨基酸构成的膜蛋白质。将该序列与 Sagami Chemical 研究中心的序列 (WO 01/49728) 相比较,发现中央部分的序列与 Sagami Chemical 研究中心的序列相同,但是 N 末端不同,并且了解到在蛋白质序列中也存在差异。这次克隆到的克隆,在所有得到的克隆中 C 末端相同,但是由于获得了多个像是 5' 端的剪切变异体的克隆,因此按以下方式进行 5' RACE 以测定原来的序列。
- [0249] 用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (CLONTECH) 从 1 μ g 使用 RNA-Bee_RNA ISOLATION REAGENT (Tel-Test) 从 NK 细胞中提取的 RNA (0.4 μ g/ μ l, 20 μ l 于 DEPC-DDW 中) 合成出 cDNA (5' -RACE-Ready cDNA, 100 μ l 于 Tricine-EDTA 缓冲液中), 在以下反应条件下进行 5' -RACE PCR。
- [0250] 第 1 轮 :
- [0251] 模板 :2.5 μ l 5' -RACE-Ready cDNA
- [0252] 引物 :10 \times Universal 引物 A Mix (添加 ;以 1x 使用) < = > SAS2
- [0253] 10 \times Universal 引物 A Mix : (长, 0.4 μ M : 5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG TATCAACGCAGAGT-3' /SEQ ID NO :23)
- [0254] (短, 2 μ M : 5' -CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' /SEQ ID NO :24)
- [0255] 第 2 轮 :
- [0256] 模板 : :5ul 第一轮 PCR 产物
- [0257] 引物 :嵌套式 Universal 引物 A (NUP) (5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' /SEQ ID NO :25) ⇌ SA4
- [0258] 反应条件 :94℃下 30 秒 ;

- [0259] 94℃下 5 秒,72℃下 3 分钟,进行 5 个循环;
- [0260] 94℃下 5 秒,70℃下 10 秒,72℃下 3 分钟,进行 5 个循环;
- [0261] 94℃下 5 秒,68℃下 10 秒,72℃下 3 分钟,进行 30 个循环;
- [0262] 72℃下 7 分钟。
- [0263] 对第 2 轮 PCR 的产物进行琼脂糖凝胶电泳,切出约 650bp 的条带。用 QIAquick Gel 提取试剂盒纯化后,插入到 pGEM T-Easy 载体中。用引物 SA3,4,T7,SP6 和 NUP 确认碱基序列。
- [0264] 其结果是,序列经确认的 5 个克隆的所有的编码序列与上述碱基序列相同(其中,1 个克隆在 5' 端短)。因此,认为这次获得的克隆是实际上表达的碱基序列。
- [0265] 根据使用 Prosite, Pfam, Psort 等的基序检索结果,发现发现以下这些序列上的特征:
- [0266] N-糖基化位点:(N[[^]P][ST][[^]P])60:NQTL,245:NHSA;和 268:NYSC
- [0267] ITIM 基序(Yxx[VL]):351:YANV,366:YSVV
- [0268] Ig 样区域:27-80,120-177,216-273
- [0269] 跨膜区域:309-325
- [0270] 根据上文所述信息,推测这次分离的基因是作为配体识别属于 FcR 超家族的典型的 MHC I 型的抑制性受体(KIR)成员。由于该基因具有在 NK 细胞中特异性表达的特征,下面将其称之为 NKIR 基因。
- [0271] [实施例 2] 用家兔多克隆抗体检测 NKIR 蛋白质
- [0272] 构建大肠杆菌表达系统,进行 NKIR 细胞外区域的融合蛋白质的表达纯化(图 1)。详细的步骤如下所示:
- [0273] (1)NKIR 融合蛋白质大肠杆菌表达质粒 pET32a-NK-sol 的制备
- [0274] 在以下反应条件下进行 PCR。
- [0275] 模板:pGEMTB-NK1
- [0276] 引物:NK 融合(5'-CTCGGATCCTTGCCATCTTTAGTTCCTGTGTT-3'/SEQ ID NO:26) ⇌ NKr2(5'-GCTGTCGACTTAGTTGCTGGCGGGAGTGAACAAGAC-3'/SEQ ID NO:27)
- [0277] 反应条件:94℃下 2 分钟;
- [0278] 94℃下 20 秒,60℃下 30 秒,68℃下 2 分钟,进行 25 个循环。
- [0279] 使用 KOD plus(TOYOBO;添加了缓冲液,dNTPs 和 MgSO4)进行 PCR。在用 Micro Spin S-300HR 柱(Amersham Bio sciences)纯化后,用 BamHI 和 SalI 切断,经琼脂糖凝胶电泳切出约 0.9kb 的条带。在用 MicroSpin S-300HR 柱纯化后,插入到 pET-32(a)(Novagen)载体的 BamHI-SalI 位点制备成 pET32a-NK-sol。
- [0280] (2)NKIR 蛋白质动物细胞表达质粒 PCOS2-NK-FLAG 的制备
- [0281] 在以下反应条件下进行 PCR。
- [0282] 模板:pGEMTB-NK1
- [0283] 引物:NKflag(5'-GCCAATTCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGTTGCCATCTTTAGTTCCTGTGTT-3'/SEQ ID NO:28) ⇌ NKr1(5'-CGTGTGACTCACTAGCAGAGAACCTCCTCACAGTC-3'/SEQ ID NO:29)
- [0284] 反应条件:94℃下 2 分钟;

[0285] 94℃下 20 秒,60℃下 30 秒,68℃下 2 分钟,进行 25 个循环。

[0286] 使用 KOD plus (TOYOBO ;添加了缓冲液, dNTPs 和 MgSO₄) 进行 PCR。在用 Micro Spin S-300HR 柱 (Amersham Biosciences) 纯化后,用 EcoRI 和 SalI 切断,经琼脂糖凝胶电泳切出约 1.3kb 的条带。在用 MicroSpin S-300HR 柱纯化后,插入到 pCOS2 的 EcoRI-SalI 位点制备成 pCOS2-NK-FLAG。

[0287] (3)NKIR 融合蛋白质和家兔 NKIR 多克隆抗体的制备

[0288] 通过硫氧还蛋白融合蛋白质表达质粒 pET32a-NK-so1,进行大肠杆菌 BL21 (DE3) 的转化。将在含有 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养过夜的大肠杆菌悬液以 1% 的终浓度扩散于含有 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中进行培养,在 600nm 处的吸收度达到 0.4 后,以 1mM 的终浓度添加 IPTG,进行蛋白质表达诱导。进行 4.5 小时培养后,通过离心收集菌体沉淀物,悬浮于 PBS。通过超音波破碎机破碎菌体后进行离心,除去上清,回收沉淀级分。用含有 7M 尿素的磷酸缓冲液 (PBS) 溶解后,用 0.45 μM 的过滤器进行过滤。用 HisTrap 试剂盒 (Amersham Biosciences) 从滤液中分离出 NKIR 融合蛋白质。针对 50mM Tris (pH8.3) 透析洗脱液,获得溶解的融合蛋白质试样。SDS-PAGE 后经考马斯染色对具有预期分子量的所得融合蛋白质进行确认。

[0289] 以所得 NKIR 融合蛋白质作为免疫原免疫家兔,制成多克隆抗体。将抗原蛋白质调制成为 0.2mg/0.5ml,加入 0.5ml 弗氏完全佐剂 (Becton Dickinson),在皮下接种 1ml (第 1、4、11 天)。在第 19 天、26 天、33 天时静脉注射 0.05mg 抗原蛋白质。采取血液试样,确认抗体滴度提高后,进行采血,在蛋白质 A 亲和柱上装上抗血清,纯化抗体蛋白质。获得的多克隆抗体,通过以下的 Western blotting 对所得多克隆抗体显示出的与 COS-7 动物细胞中瞬间表达的 NKIR 的结合性进行确认。

[0290] 按照制造商的指示使用 FuGENE6 (Roche Diagnostics) 将 pCOS2-NK-FLAG 导入到 COS-7 细胞中。培养 2 天后,加入溶解液 (10% 甘油,50mM Tris pH7.6),150mM NaCl,5mM NP-40,和蛋白酶抑制剂 (完全)) 悬浮细胞后离心,获得含有可溶性膜蛋白质级分的上清。在可溶性级分中添加抗 FLAG M2 抗体树脂,免疫沉淀 FLAG-NKIR。在对所得试样进行 SDS-PAGE 后,转移到 PVDF 膜上,用抗 NKIR 多克隆抗体检测。使用稀释 1000 倍的从家兔获得的多克隆抗体 (4.1mg/ml IgG) 作为第一抗体,稀释 3000 倍的 HRP 标记的抗家兔抗体 (Amersham Biosciences) 作为第二抗体。检测中使用 ECL Western Blotting 检测系统 (Amersham Biosciences)。此外,使用稀释 1000 倍的从抗 FLAG M2 抗体 (Sigma) 作为对照,使用稀释 3000 倍的 HRP 标记的抗小鼠抗体 (Amersham Biosciences) 作为第二抗体,对 FLAG-NKIR 蛋白质的存在进行确认 (图 2)。

[0291] [实施例 3] 组织表达分析和 NK 细胞株中的表达分析

[0292] 使用市售的 cDNA panel (Multiple Tissue cDNA (MTC) panel ;Clontech Laboratories, Inc.) 作为模板,通过 PCR 进行组织表达图谱分析。

[0293] 在以下反应条件下进行 PCR。

[0294] 模板 :MTC panel I, II, Human Immune System 和 Human Blood Fraction (Clontech Laboratories, Inc.)

[0295] 引物 :NKIR07 (5' -AGGTCAGAGTGCAGGCTCCTGTATC-3' /SEQ ID NO :30) ⇔ NKIR08 (5' -TAGAACTGTCCTTCTCCCCACGGT-3' /SEQ ID NO :31)

[0296] 反应条件:94℃下 30 秒;

[0297] 94℃下 30 秒,65℃下 2 分钟,进行 35 个循环。

[0298] 用 TaKaRa Ex Taq(添加缓冲液,dNTP)进行 PCR。反应在 50 μl 下进行,提供 5 μl 反应液进行琼脂糖凝胶电泳,确认出 0.6kb 条带。在对照反应中使用附加于 MTC panel 上的 G3PDH 引物作为引物。

[0299] 结果显示,基因在脾脏、白血球等免疫系统中特异表达(图 3)。当使用上述 MTC panel 的 Blood Fraction 和 Immune System 的子设备,分析对象增加时,在 Blood Fraction 中,检出基因表达局限于单细胞、休眠 CD8+,此外在 Immune System 中,检出基因表达局限于白血球、淋巴结(图 3)。

[0300] 使用由 ATCC 购买的 NK-92 株(目录编号:CRL-2407)制备的细胞裂解液,进行 Western blotting,该细胞株是一种株化的天然杀伤细胞(NK)株。

[0301] 在 10ng/ml 白介素-2(SIGMA-ALDRICH)存在下,在 NK-92 传代培养基(含有 12.5% 胎儿牛血清(Invitrogen),12.5% 马血清(Invitrogen),2mM 谷氨酸盐(Invitrogen),0.1mg/l 青霉素(Invitrogen),0.1mg/l 链霉素(Invitrogen),1mM 丙酮酸钠(Invitrogen),100 μM 2-巯基乙醇(Invitrogen),2mM 叶酸(SIGMA-ALDRICH)和 20mM 肌醇(SIGMA-ALDRICH)的 α-MEM 培养基(Invitrogen))中培养 NK-92 细胞株,将培养获得的 1×10^7 细胞悬浮于 500 μl 的 NP40 溶解缓冲液(1% NP40,150mM NaCl,50mM Tris-HCl(pH8.0))中,在冰上静置 30 分钟后,以 15000rpm 的超离,分离出上清,将其作为细胞裂解液在 Western blotting 分析中使用。

[0302] 以 PIERCE 制造的牛血清白蛋白(Fraction V)作为对照,用 Dc 蛋白质检测试剂盒(BIO-RAD Laboratories)测定出细胞裂解液的蛋白质浓度。

[0303] 用于 Western blotting 分析的 SDS-PAGE 中使用 PAG-Mini(4-20%梯度凝胶,第一化学药品株式会社),并向其提供 10 μg 和 20 μg 的 NK-92 株的细胞裂解液。用 NP40 裂解缓冲液将在用于制备多克隆抗体的免疫家兔时使用的免疫原稀释 200 倍,同时提供 1 μl 的样品作为阳性对照。在 20mA 的条件下进行电泳,在以 20volts 下 45 分钟的条件用 SEMI-DRY TRANSFER CELL(BIO-RAD Laboratories)将电泳后的凝胶转移到 PVDF 膜(Hybond-P,Amersham Biosciences)上。按照手册中的方法使 ECL+plus Western Blotting Detection System(Amersham Biosciences)进行 Western blotting。但是,阻断试剂中以 2% 的浓度使用 ECL-Advance 阻断试剂(Amersham Biosciences)。使用稀释 1000 倍的从前述家兔获得的多克隆抗体(4.1mg/ml IgG)作为第一抗体,此外使用稀释 3000 倍的抗家兔 Ig(整个抗体连接了辣根过氧化物酶(AmershamBiosciences))作为二级抗体,鉴定出了与抗 NKIR 多克隆抗体交叉的分子种类。

[0304] 其结果显示,在 NK-92 细胞株中表达一种具有 60kDa 的分子量的蛋白质,该蛋白质与在家兔中以大肠杆菌中表达的 NKIR 蛋白免疫获得的多克隆抗体交叉(图 4)。

[0305] 进而,为了证实该 NKIR 分子在 NK 细胞表面表达,采用抗 NKIR 抗体进行了对 NK-92 株的流式细胞仪分析。

[0306] 将 5×10^5 细胞悬浮于 100 μl 的 FACS 缓冲液(含有 2.5% 胎儿牛血清和 0.02% NaN₃ 的磷酸盐缓冲液)中,以 82 μg/ml 的终浓度添加抗 NKIR 多克隆抗体。还制备了添加了相同浓度的家兔纯化 IgG 的细胞作为阴性对照。在冰上静置 1 小时后,以低速离心

(300×g, 5 分钟) 回收细胞, 用 FACS 缓冲液清洗, 再次进行低速离心, 回收细胞。接着, 将回收的细胞悬浮于含有终浓度为 14 μg/ml 的从山羊获得的结合了 FITC 的山羊抗家兔 IgG 抗体 (Beckman Coulter) 的 FACS 缓冲液中后, 在冰上静置 30 分钟。在通过低速离心进行细胞回收, 并且用 FACS 缓冲液清洗后, 悬浮于 500 μl 的 FACS 缓冲液中, 进行流式细胞仪分析 (Beckman Coulter, EPICS)。结果显示, 该 NKIR 分子在细胞表面表达 (图 5)。

[0307] [实施例 4] 通过使用由 NK-92 株获得的 cDNA 的 RACE 法对 NKIR 基因的全长克隆
[0308] 用由 NK-92 株制备的总 RNA 通过 5' 和 3' 端 -RACE 法再次进行 NKIR 基因的全长克隆。

[0309] 用 RNeasy (QIAGEN) 试剂盒从经实施例 3 中记载的方法培养的 5.4×10^7 个 NK-92 细胞中制备出总 RNA, 获得 377.7 μg 的总 RNA。以由此制备的 1 μg 的 RNA 作为模板, 使用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech) 进行 5' 和 3' 端 -RACE。5' -RACE 时使用 NKIR08 作为基因特异性引物, 3' -RACE 时使用 NKIR07 作为基因特异性引物。由于两次反应都在 1 次 PCR 反应中获得长度约为 1.3kb 的主要扩增产物, 从琼脂糖凝胶中切出该扩增片段, 用 QIAquick (QIAGEN) 试剂盒纯化后, 克隆到 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中。将产生的 TOP10F' 由来的转化株各 8 株培养在含有 0.1mg/ml 氨苄青霉素的 2ml LB 培养基中, 用 QIAprep 试剂盒 (QIAGEN) 从培养的大肠杆菌中制备出质粒, 确定序列。其结果是, 从 5' -RACE 反应中, 获得了具有在前述确定的序列之外还在 5' 端插入长度为 36 个碱基的 cDNA, 在以后的研究中作为 pTOPONKIR626 使用。此外, 从 3' -RACE 反应中获得了 cDNA 克隆, pTOPONKIR620, 其中含有约为 500 个碱基的下游延伸片段。其碱基序列在序列表中表示为 SEQ ID NO :3, 或者由该碱基序列编码的蛋白质的氨基酸序列在序列表中表示为 SEQ ID NO :4。在人基因组上的 1 号染色体的 NKIR 区域中确认了该序列。

[0310] 因此, 以 5' 端的 36 个碱基的插入序列为目标, 用 pCOS1 作为载体骨架构建分别含有实施例 1 中分配的序列、重新分离的序列的表达载体, 在 COS-7 细胞中瞬间表达。

[0311] 以 pGEM-TE NK1 作为模板, 使用 NKIR09 (5' -GAATTCACACACCCACAGGACCTGCA-3' / SEQ ID NO :32) 和 NKIR10 (5' -GGATCCACTGAAGGACCCACAGAAAG-3' / SEQ ID NO :33)

[0312] 引物各 0.2 μM 进行 PCR。用 HF 聚合酶试剂盒 (Clontech) 作为 PCR 试剂盒, 反应条件如下: 94°C 下变性 30 秒后, 进行 25 个 94°C 下 15 秒 +55°C 下 30 秒 +72°C 下 1 分钟的循环后, 在 72°C 下进行 5 分钟延长反应。给琼脂糖凝胶电泳提供反应液, 用 QIAquick Gel 提取试剂盒 (QIAGEN) 纯化所产生的 1.5kb 片段后, 克隆到 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中, 转化大肠杆菌 TOP10F'。用 QIAminiprep 试剂盒 (QIAGEN) 从所产生的氨苄青霉素抗性株中制备出质粒, 进行序列分析。选择没有 PCR 误差的克隆 pTOPONKIR219 用于以后的研究。

[0313] 接着, 5 μg pTOPONKIR219 和 1.15 μg PBLUESCRIPT II SK+ (STRATAGENE), 分别经 20 个单位的 EcoRI 和 BamHI 在 37°C 消化 1 小时后, 提供给琼脂糖凝胶电泳, 用 QIAquick Gel 提取试剂盒 (QIAGEN) 分别纯化所产生的 1.5kb 和 3.0kb 的片段后, 使用 LigaFAST 连接试剂盒 (Promega) 对每一份 40 μl 的洗脱液中的 1 μl 进行连接, 转化大肠杆菌 TOP10F'。用 QIAminiprep 试剂盒 (QIAGEN) 从产生的氨苄青霉素抗性株中制备出质粒, 将经 PstI 酶限制性检验观察到了长度约为 1.3kb 的消化片段的克隆 pBSNKIR224 用于以后的研究。接着, 经琼脂糖凝胶电泳分离出分别为 pBSNKIR224 和 pTOPONKIR626 的经 BstP1 和 Bgl II 双重消化产生的 4kb 和 0.4kb 的片段, 经 QIAquick Gel 提取试剂盒 (QIAGEN) 纯化后, 用 LigaFAST

连接试剂盒 (Promega) 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。用 QIAminiprep 试剂盒 (QIAGEN) 从所产生的氨苄青霉素抗性株中制备出质粒, 进行序列分析, 将经确认在 5' 端插入了 36bp 的克隆 pBSNKIRfu11605 用于以后的研究。

[0314] 最后, 在 pCOS1 的 EcoRI 和 NotI 位点插入从 pBSNKIR224 和 pBSNKIRfu11605 获得的长度为 1.4kb 的 EcoRI-NotI 片段, 分别制备成表达载体 pCOSNKIR610 和 pCOSNKIRfu11610。使用 MIRUS TransIT-LT1 (PanVera) 通过脂质转导法按照生产者的指导将作为 DNA 供体的两个质粒转化 COS-7, 培养 2 天后, 使用胰岛素 /EDTA 溶液 (Invitrogen) 剥离细胞后, 用含有 10% 胎儿牛血清 (Invitrogen) 的 DMEM 培养液 (Invitrogen) 清洗细胞两次, 用与实施例 3 中记载的方法相同的步骤进行流式细胞仪分析。

[0315] 结果, 只有在用具有从 NK-92 分离的序列的 5' 端' 插入有 36 个碱基的序列的 NKIR 表达质粒进行转染时, 确认出细胞级分在 FITC 检测中发生变化, 因此显示出具有 36 个碱基的插入的克隆, 以分泌型行使功能 (图 6)。

[0316] [实施例 5] 小鼠 NKIR 序列的克隆

[0317] 以人 NKIR 氨基酸序列作为 query, 对小鼠基因组序列进行 blast 检索 (tblastn), 鉴定出与全长序列 hit 的 1 号染色体区域 (图 7)。该小鼠染色体区域是与人 NKIR 经基因定位的人染色体区域在染色体结构上匹配的区域。

[0318] 基于预测的翻译区域设计引物 (mNKIRf1 (5' -CTCAGTAAAGGCAGAGTGGAGTACC-3' / SEQ ID NO :34) \Leftrightarrow mNKIRr1 (5' -ATACATTAGAACCCAGCCGCAATG-3' / SEQ ID NO :35)),

[0319] 根据小鼠脾脏 cDNA 文库进行 PCR 扩增, 克隆基因。对该序列进行确认, 其结果可以鉴定出经剪切的转录物的存在。

[0320] 以小鼠脾脏 Marathon-Ready cDNA (Clontech) 为模板, 在以下反应条件下进行 5' -RACE 和 3' -RACE PCR。

[0321] 第 1 轮 : 模板 : Marathon Ready cDNA, 2.5 μ l

[0322] 引物 :

[0323] 用于 3' -RACE 的 AP1 (5' -CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' / SEQ ID NO :36) \Leftrightarrow mNKIRf1

[0324] 用于 5' -RACE 的 AP1 \Leftarrow mNKIRr1

[0325] 第 2 轮 : 模板 : 第 1 轮 PCR 产物稀释 30 倍的稀释物, 2.5 μ l 引物 :

[0326] 用于 3' -RACE 的 AP2 (5' -ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' / SEQ ID NO :37) \Leftrightarrow mNKIRf3 (5' -CTCAAGAAGTTCCCCTTGGTTGTCTC-3' / SEQ ID NO :38) 用于 5' -RACE 的 AP2 \Leftrightarrow mNKIRr3 (5' -GCCAGATAGTTAGCATGTTGCTCTTG-3' / SEQ ID NO :39)

[0327] 第 1 轮 PCR 反应条件 : 94 $^{\circ}$ C 下 1 分钟 ; 94 $^{\circ}$ C 下 10 秒, 68 $^{\circ}$ C 下 3 分钟, 进行 35 个循环。

[0328] 第 2 轮 PCR 反应条件 : 94 $^{\circ}$ C 下 1 分钟 ; 94 $^{\circ}$ C 下 10 秒, 68 $^{\circ}$ C 下 3 分钟, 进行 20 个循环。

[0329] 用 TaKaRa LA Taq (TAKARA) (添加了缓冲液, dNTPs, MgCl₂) 按照制造者的指示制备反应液进行 PCR。对第 2 轮 PCR 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切出扩增的条带。经 QIAquick Gel 提取试剂盒 (QIAGEN) 纯化后, 插入到 pGEM T-Easy 载体中。转化 DH5 α , 从所得克隆中制备出质粒, 确定碱基序列。

[0330] 其结果是,预测其为由 268 个氨基酸构成的膜蛋白质。所得克隆的碱基序列在序列表中表示为 SEQ ID NO :5,或者由该碱基序列编码的蛋白质的氨基酸序列在序列表中表示为 SEQ ID NO :6。在人-小鼠序列的比较中(图 8),小鼠序列与人的序列相比,其具有在 N 末端、C 末端都缩短了的结构,但是其在相当区域保持了 1 个 N 型糖链添加部位,1 个 ITIM 基序,跨膜区域,两个 Ig 样区域。

[0331] 根据使用 Prosite, Pfam, Psort 等的基序检索结果,发现以下这些序列上的特征:

[0332] N-糖基化位点:(N[[^]P][ST][[^]P]) 180 :NYSC, 188 :NISR

[0333] ITIM 基序 (Yxx[VL]) :259 :YANV

[0334] Ig 样区域 :33-89, 128-185

[0335] 跨膜区域 :221-237

[0336] [实施例 6] 2KIR3DL 的克隆

[0337] 检测 ITIM 活性的检测系统,使用 T 细胞作为受体细胞,改变对 NFAT 级联控制下的荧光素酶活性进行测定的方法从而得以实施 (FryAM, Lanier LL, Weiss A., J Exp Med. (1996), 184, 295-300)。

[0338] 用人脾脏 cDNA 文库克隆已知 KIR 基因 2KIR3DL。在以下反应条件下进行 PCR。

[0339] 模板:人脾脏 Marathon-Ready cDNA (Clontech)

[0340] 引物:p58KIR01 (5' -GAATTCATGTCGCTCATGGTCGTCAG-3' /SEQ IDNO :40) ⇌ p58KIR02 (5' -GGATCCTCAGGGCTCAGCATTGGAA-3' /SEQ IDNO :41)

[0341] 反应条件:94°C 下 30 秒;94°C 下 15 秒,52°C 下 30 秒,72°C 下 1 分钟,进行 30 个循环;72°C 下 5 分钟

[0342] 用 HF 聚合酶 (Clontech) 进行 PCR。经琼脂糖凝胶电泳分离长度为 1kb 的片段后,用 QIAquick (QIAGEN) 纯化。将纯化产物克隆到 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中,转化大肠杆菌 TOP10F'。用 QIAprep 试剂盒 (QIAGEN) 从转化株中制备出质粒,选择没有 PCR 误差的克隆 (pTOP058KIR303) 用于进一步研究。

[0343] [实施例 7] 框架内融合的构建

[0344] 按以下步骤构建由上述实施例 6 获得的 2KIR3DL 的细胞外区域与 NKIR 的细胞质内 ITIM 基序的框架内融合。

[0345] 首先在以下反应条件下进行 PCR。

[0346] 第 1 轮 PCR A

[0347] 模板:pTOP058KIR303

[0348] 引物:p58KIR01 ⇌ p58NKIR04 (5' -AGGGGCCAGCTTTTCTCCAGCGATGAAGGAGAAAGAAGA-3' /SEQ ID NO :42)

[0349] 第 1 轮 PCR B

[0350] 模板:pBSNKIR224

[0351] 引物:p58KIR03 (5' TCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGAGAAAAGCTGGGCCCT-3' /SEQ ID NO :43) ⇌ T3+ (5' -GCAATTAACCCTCACTAAAGGGAAC-3' /SEQ ID NO :44)

[0352] 反应均在以下记载的条件下进行:

[0353] 94°C 下 30 秒;94°C 下 15 秒,55°C 下 30 秒,72°C 下 45 秒,进行 30 个循环;72°C 下 2 分钟。

[0354] 用 HF 聚合酶 (Clontech) 进行 PCR。经琼脂糖凝胶电泳从 PCR A 分离长度为 0.8kb 的片段、从 PCR B 分离长度为 0.4kb 的片段后,用 QIAquick(QIAGEN) 纯化。分别使用每份 50 μ l 纯化产物中的 10 μ l 作为下文所示第 2 轮 PCR 的模板。

[0355] 模板:上述反应产物各 10 μ l

[0356] 反应在以下记载的条件下进行:

[0357] 94 $^{\circ}$ C 下 30 秒;94 $^{\circ}$ C 下 15 秒,55 $^{\circ}$ C 下 30 秒,72 $^{\circ}$ C 下 90 秒,进行 15 个循环。

[0358] 反应后,在 50 μ l 反应液中以终浓度 1 μ M 添加下述模板。

[0359] 引物:p58KIR01< = >T3+

[0360] 反应条件:94 $^{\circ}$ C 下 30 秒;94 $^{\circ}$ C 下 15 秒,55 $^{\circ}$ C 下 30 秒,72 $^{\circ}$ C 下 2 分钟,进行 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 下 4 分钟

[0361] 经琼脂糖凝胶电泳分离出长度为 1.2kb 的片段后,用 QIAquick(QIAGEN) 纯化。克隆到 pCR2.1-TOPO 中,转化大肠杆菌 TOP10F'。用 QIAprep 试剂盒(QIAGEN) 从转化株中制备出质粒,选择没有 PCR 误差的克隆(pBSKIR58NKIR314) 用于进一步研究。

[0362] 接着,1 μ g 的 pCXND3 和 pBSKIR58NKIR314 分别经 20 个单位的 EcoRI 和 NotI 在 37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时后,提供给琼脂糖凝胶电泳,用 QIAquickGel 提取试剂盒(QIAGEN) 分别纯化所产生的 7.8kb 和 1.2kb 的片段后,使用 LigaFAST 连接试剂盒(Promega) 对每一份 40 μ l 的洗脱液中的 1 μ l 进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。挑选产生氨苄青霉素抗性株,先用 p58KIR01 和 p58NKIR10 引物各 0.5 μ l 进行克隆 PCR。这时使用 Premix ExTaq(TaKaRa) 作为 PCR 多聚酶,反应条件是:94 $^{\circ}$ C 下变性 5 分钟后,进行 35 个 94 $^{\circ}$ C 下 30 秒、55 $^{\circ}$ C 下 30 秒、72 $^{\circ}$ C 下 90 秒的循环。将所产生的反应产物的 1/5 的量提供给琼脂糖凝胶电泳,将观察到长度为 1.3kb 的 PCR 片段的克隆 pCXND3KIR58NKIR313 用于以后的研究。

[0363] [实施例 8] 稳定的转化株的获得

[0364] 由上述实施例 7 获得的 pCXND3KIR58NKIR313 作为 DNA 供体,从 T 细胞株 Jurkat 株获得稳定的转化株候选株 ChimeraA10 株。获得的方法如下所述。

[0365] 使用 pCXND3KIR58NKIR313 作为 DNA 供体, Jurkat 株作为受体细胞,通过电穿孔法进行转导。20 μ g 的 DNA 供体预先在 37 $^{\circ}$ C 下用 20 个单位的 Pvu II(TaKaRa) 消化 1 小时,在氯仿/苯酚处理后接着进行乙醇沉淀,然后溶解于 20 μ l 的无菌水中。作为受体细胞,用钾-磷酸盐缓冲(K-PBS) 液清洗经含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基传代的 Jurkat 细胞后,以 10^7 细胞/ml 悬浮于 K-PBS,制备 0.8ml 的细胞悬浮液。在电穿孔中使用 Gene Pulsar II(Bio-Rad),在 0.3kV、950 μ FD 的脉冲条件下进行。实施脉冲后,悬浮于 48ml 的传代培养基中,在没有选择压的条件下培养过夜后,用终浓度为 400 μ g/ml 的遗传霉素(Invitrogen) 给予选择压,获得稳定的转化株候选株 ChimeraA10 株。除了使用 GL183 单克隆抗体(Beckman Coulter) 作为第一抗体,并以结合了 FITC 的抗家兔 IgG 抗体(Beckman Coulter) 作为二级抗体之外,其余以与实施例 3 记载的方法相同的步骤进行流式细胞仪分析。

[0366] 其结果显示,可以识别出经 FITC 染色的细胞级分,上述蛋白质在 ChimeraA10 株中表达(图 9)。

[0367] [实施例 9] 双重转化株的制备

[0368] 以上述实施例 8 获得的 ChimeraA10 株作为受体细胞,用荧光素酶报告质粒

pNFAT1ucZEO324 转导, 获得双重转化株。

[0369] 如下方式构建 pNFAT1ucZEO324。

[0370] 2.5 μg 包含于 Mercury Pathway Profiling Luciferase system 2(Clontech) 中的荧光素酶报告基因 pNFAT-TA-Luc 经 20 个单位的 AccI(Takara) 在 37℃ 下消化 1 小时, 或者由 dam 株 SCS-110 株 (Stratagene) 制备的 5 μg pCOS II ZEO 经 20 个单位的 ClaI(Takara) 在 37℃ 下消化 1 小时, 提供给琼脂糖凝胶电泳。用 QIAquick Gel 提取试剂盒 (QIAGEN) 分别纯化出长度为 5kb、2.2kb 的消化片段。

[0371] 由 pNFAT-TA-Luc 获得的片段在 37℃ 下经牛肠碱性磷酸酶处理 30 分钟后, 用 QIAquick 核苷酸转移试剂盒 (QIAGEN) 纯化。使用 LigaFAST 连接试剂盒 (Promega) 对连接两片段, 转化大肠杆菌 DH5 α。用 QIAminiprep 试剂盒 (QIAGEN) 从产生的氨苄青霉素抗性菌株中制备出质粒, 经 EcoR I 和 SalI 双重消化进行限制性检验, 观察到长度为 4.15kb 和 3.15kb 的消化片段的克隆作为正向插入克隆 pNFAT1ucZEO324 用于以后的研究, 观察到了长度为 5.15kb 和 2.15kb 的消化片段的克隆作为反向插入克隆 pNFAT1ucZEO324 用于以后的研究。

[0372] 以该 pNFAT1ucZEO324 提供 DNA, 使用在 ChimeraA10 株作为受体细胞, 通过电穿孔进行传导。20 μg 的供体 DNA 预先在 37℃ 下用 20 个单位的 Pvu II (TaKaRa) 消化 1 小时后, 在氯仿 / 苯酚处理后接着进行乙醇沉淀, 然后溶解于 20 μl 的无菌水中。作为受体细胞, 用钾 - 磷酸盐缓冲 (K-PBS) 液清洗经含有 10% FBS 和 400 μg/ml 的遗传霉素的 RPMI1640 培养基传代的 ChimeraA10 细胞后, 以 10^7 细胞 /ml 悬浮于 K-PBS, 制备 0.8ml 的细胞悬浮液。在电穿孔中使用 Gene Pulsar II (Bio-Rad), 在 0.3KV、950 μFD 的脉冲条件下进行。实施脉冲后, 悬浮于 48ml 含有 400 μg/ml 的遗传霉素的传代培养基中, 在没有选择压的条件下培养过夜后, 用终浓度为 100 μg/ml 的零霉素 (Invitrogen) 给予选择压, 获得稳定的转化株候选株。用 DNeasy 组织试剂盒 (QIAGEN) 从所得零霉素抗性株中制备基因组 DNA。用 0.4ml 最终洗脱液中的 5 μl 作为模板进行 PCR 反应。使用 Premix ExTaq 作为 PCR 多聚酶, 使用 Luc01 (5' -TTCATACAGAAGGCGTGGAG-3' /SEQ ID NO :45) 和 Luc02 (5' -CGTTCGCGGGCGCAACTGCA-3' /SEQ ID NO :46) 作为引物, 反应条件是 :94℃ 下变性 5 分钟后, 进行 25 个 94℃ 下 15 秒、55℃ 下 30 秒、72℃ 下 45 秒的循环后, 再进行 72℃ 下 5 分钟的延伸反应。通过琼脂糖凝胶电泳选择产生长度为 0.5kb 的 PCR 片段的克隆, 经荧光素酶活性检测进行最终筛选。

[0373] 按以下方法实施荧光素酶检测 : 将由 ChimeraA10 细胞株获得的 pNFAT1ucZEO324 的稳定转化株以 6.7×10^4 细胞 /ml 的浓度悬浮于含有 400 μg/ml 的遗传霉素和 100 μg/ml 的零霉素的传代培养基中后, 以 75 μl / 孔接种于涂布抗人 CD3 的微孔板 (Beckton Dickinson) 和常规的免疫微孔板中。在 37℃ 下培养 20 小时后, 添加等量 (75 μl) 的 Dual-Glo 荧光素酶缓冲液 (Promega), 静置 10 分钟后, 用光度计 MicroLumat LB96P (EG & G Berthold) 对各孔的化学发光进行测定, 每孔测定 5 秒。

[0374] 选择只在涂布抗人 CD3 的微孔板培养下显示化学发光的菌株 chimeraA10ZEOR12 株作为稳定转化株。此外, 以与上述方法相同的方法对该菌株进行流式细胞仪分析。

[0375] 结果显示, 该菌株表达 ChimeraA10 株中表达的融合蛋白质 (图 9)。

[0376] [实施例 11] 由 NKIR 获得的 ITIM 活性测定

[0377] 用 chimeraA10ZEOR12 株进行对由 NKIR 获得的 ITIM 基序的功能评价。方法如下

所示。

[0378] 以 5×10^5 细胞/ml 的浓度将 chimeraA10ZEOR12 株悬浮于含有 $400 \mu\text{g/ml}$ 的遗传霉素和 $100 \mu\text{g/ml}$ 的零霉素的传代培养基中,以平均每孔 $100 \mu\text{l}$ 接种于涂布抗人 CD3 的微孔板 (Beckton Dickinson) 中。在 37°C 下培养 6 小时后,以 $1 \mu\text{g/ml}$ 终浓度添加 GL183 抗体 (BeckmanCoulter),在 37°C 下培养过夜。接着以含有 $400 \mu\text{g/ml}$ 的遗传霉素和 $100 \mu\text{g/ml}$ 的零霉素的传代培养基两次清洗后,在用含有浓度分别为 0、2、 $10 \mu\text{g/ml}$ 的大鼠来源的抗小鼠 IgG 抗体的 $100 \mu\text{l}$ 培养基悬浮清洗细胞后,以与实施例 10 记载的方法相同的方法测定荧光素酶活性。

[0379] 结果显示,由通过大鼠来源的抗小鼠 IgG 抗体的交联显示出在 3 个例子中平均抑制 33.3% 荧光素酶活性 (图 10),这表示 NKIR 分子的细胞质内区域发现的 ITIM 基序有 ITIM 活性。

[0380] [实施例 12] CD8 α 链的克隆

[0381] ITIM 活性的功能检测系统,与实施例 6 相同,使用 T 细胞作为受体细胞,改变对 NFAT 级联控制下的荧光素酶活性进行测定的方法从而得以实施 (Fry AM, Lanier LL, Weiss A., J Exp Med. (1996), 184, 295-300)。

[0382] 以休眠 CD8⁺Marathon cDNA 文库 (Clontech) 作为模板,克隆已知的 CD8 α 链基因。在以下反应条件下进行 PCR。

[0383] 引物: CD01 (5' -GAATTCATGGCCTTACCAGTGACCGC-3' /SEQ ID NO :47) \Leftrightarrow CD02 (5' -GATCCTTAGACGTATCTCGCCGAAA-3' /SEQ ID NO :48)

[0384] 反应条件: 94°C 下 30 秒; 94°C 下 15 秒、 50°C 下 30 秒、 72°C 下 30 秒, 30 个循环; 72°C 下 4 分钟

[0385] 用 GC 聚合酶 (宝酒造) 进行 PCR。用琼脂糖凝胶电泳分离长度为 0.7kb 的片段后,用 QIAquick (QIAGEN) 纯化。将纯化产物克隆到 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中,转化大肠杆菌 TOP10F'。用 QLAprep 试剂盒 (QIAGEN) 从转化株中制备出质粒,选择没有 PCR 误差的克隆 (pCD8fu110113) 用于进一步研究。

[0386] [实施例 13] CD8-NKIR 融合蛋白质表达载体的构建

[0387] 按以下方法构建由上述实施例 12 获得的 CD8 α 链的细胞外区域与 NKIR 的细胞质内 ITIM 基序的融合蛋白质。

[0388] 首先,在以下的反应条件下进行融合 PCR。

[0389] 第 1 轮 PCR A

[0390] 模板: pCD8fu110113

[0391] 引物: CD03 (5' -GAATCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGC-3' /SEQ ID NO :49) \Leftrightarrow CDNKIR12 (5' -ACCAGCCAGTTGCTGGCGGGTCCAGCCCCCTCGTGTGCA-3' /SEQ ID NO :50)

[0392] 第 1 轮 PCR B

[0393] 模板: pBSNKIR224

[0394] 引物: CDNKIR11 (5' -TGCACACGAGGGGGCTGGACCCCGCCAGCAACTGGCTGGT-3') /SEQ ID NO :51) \Leftrightarrow T3+ (SEQ ID NO :44)

[0395] 反应均在以下记载的条件下进行:

[0396] 94°C 下 30 秒; 94°C 下 15 秒, 55°C 下 30 秒, 72°C 下 1 分钟,进行 30 个循环; 72°C 下

4 分钟。

[0397] 用 GC 聚合酶 (宝酒造) 进行 PCR。经琼脂糖凝胶电泳从 PCR A 分离长度为 0.5kb 的片段、从 PCR B 分离长度为 0.6kb 的片段后,用 QIAquick(QIAGEN) 纯化。分别使用每份 50 μ l 纯化产物中的 10 μ l 作为下文所示第 2 轮 PCR 的模板。

[0398] 模板:上述 PCR A 和 PCR B 反应产物各 10 μ l

[0399] 反应在以下记载的条件下进行:

[0400] 94°C 下 30 秒;94°C 下 15 秒,55°C 下 30 秒,72°C 下 90 秒,进行 15 个循环。

[0401] 反应后,在 50 μ l 反应液中以终浓度 1 μ M 添加下述引物。

[0402] 引物:CD03< = >T3+

[0403] 反应条件:94°C 下 30 秒;94°C 下 15 秒,55°C 下 30 秒,72°C 下 30 秒,进行 35 个循环;72°C 下 4 分钟

[0404] 经琼脂糖凝胶电泳分离出长度为 1.1kb 的片段后,用 QIAquick(QIAGEN) 纯化。克隆到 pCR2.1-TOPO(Invitrogen) 中,转化大肠杆菌 TOP10F'。用 QIAprep 试剂盒(QIAGEN) 从转化株中制备出质粒,选择没有 PCR 误差的克隆(pTOPOCD8NKIRfu11)用于进一步研究。

[0405] 接着,1 μ g 的 pCXND3 和 pTOPOCD8NKIRfu11 分别经 20 个单位的 EcoRI 和 NotI 在 37°C 消化 1 小时后,提供给琼脂糖凝胶电泳,用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN) 分别纯化所产生的 7.8kb 和 1.1kb 的片段后,使用 LigaFAST 连接试剂盒(Promega) 对每一份 40 μ l 的洗脱液中的 1 μ l 进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。挑选产生氨苄青霉素抗性株,将观察到正向插入长度为 1.1kb 的片段的克隆 pCXND3CD8NKIRfu11 用于以后的研究。

[0406] [实施例 14]CD8-NKIR 融合蛋白质表达载体的构建

[0407] 按以下方法构建由上述实施例 12 获得的 CD8 α 链的细胞外区域与 KIR 的细胞质内 ITIM 基序的融合蛋白质。该构建体可以用作 ITIM 功能检测的阳性对照。

[0408] 首先,在以下的反应条件下进行融合 PCR。

[0409] 第 1 轮 PCR A

[0410] 模板:pCD8fu110113

[0411] 引物:CD03(SEQ ID NO:49) \Leftrightarrow CDKIR12(5'-ATCAGAACATGCAGGTGTCTTCCAGCCCCCTC GTGTGCA-3')/SEQ ID NO:52)

[0412] 第 1 轮 PCR B

[0413] 模板:pBSKIR306

[0414] 引物:CDKIR11(5' -

[0415] TGCACACGAGGGGGCTGGACAGACACCTGCATGTTCTGAT-3')/SEQ ID NO:53) \Leftrightarrow T3+(SEQ ID NO:44)

[0416] 反应均在以下记载的条件下进行:

[0417] 94°C 下 30 秒;94°C 下 15 秒,55°C 下 30 秒,72°C 下 1 分钟,进行 30 个循环;72°C 下 4 分钟。

[0418] 用 GC 聚合酶 (宝酒造) 进行 PCR。经琼脂糖凝胶电泳从 PCR A 分离长度为 0.5kb 的片段、从 PCR B 分离长度为 0.4kb 的片段后,用 QIAquick(QIAGEN) 纯化。分别使用每份 50 μ l 纯化产物中的 10 μ l 作为下文所示第 2 轮 PCR 的模板。

[0419] 模板:上述 PCR A 和 PCR B 反应产物各 10 μ l

[0420] 反应在以下记载的条件下进行：

[0421] 94℃下 30 秒；94℃下 15 秒，55℃下 30 秒，72℃下 90 秒，进行 15 个循环。

[0422] 反应后，在 50 μl 反应液中以终浓度 1 μM 添加下述引物。

[0423] 引物：CD03< = >T3+

[0424] 反应条件：94℃下 30 秒；94℃下 15 秒，55℃下 30 秒，72℃下 30 秒，进行 35 个循环；72℃下 4 分钟

[0425] 经琼脂糖凝胶电泳分离出长度为 0.9kb 的片段后，用 QIAquick (QIAGEN) 纯化。克隆到 pCR2.1-TOPO (Invitrogen) 中，转化大肠杆菌 TOP10F'。用 QIAprep 试剂盒 (QIAGEN) 从转化株中制备出质粒，将没有 PCR 误差的克隆的长度为 0.9kb 的 EcoRI-NotI 插入片段插入到 pCXND3 的 EcoRI-NotI 位点，获得 pCXND3CD8KIRfu11 以用于进一步研究。

[0426] [实施例 15]NFAT- 荧光素酶报告基因稳定表达细胞株的建立

[0427] 以由实施例 9 获得的荧光素酶报告质粒 pNFATlucZEOF324 提供 DNA，并且以 Jurkat 株作为受体细胞，通过电穿孔法进行转导。20 μg 的 DNA 供体预先在 37℃下用 20 个单位的 Pvu II (TaKaRa) 消化 1 小时，在氯仿 / 苯酚处理后接着进行乙醇沉淀，然后溶解于 20 μl 的无菌水中。作为受体细胞，用钾 - 磷酸盐缓冲 (K-PBS) 液清洗经含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基传代的 Jurkat 细胞后，以 10⁷ 细胞 /ml 悬浮于 K-PBS，制备 0.8ml 的细胞悬浮液。在电穿孔中使用 Gene Pulsar II (Bio-Rad)，在 0.3KV、950 μFD 的脉冲条件下进行。实施脉冲后，悬浮于 48ml 的传代培养基中，在没有选择压的条件下培养过夜后，用终浓度为 100 μg/ml 的零霉素 (Invitrogen) 给予选择压，获得稳定的转化株候选株。用 DNeasy 组织试剂盒 (QIAGEN) 从所得零霉素抗性株中制备基因组 DNA。用 0.4ml 最终洗脱液中的 5 μl 作为模板进行 PCR 反应。使用 Premix ExTaq 作为 PCR 多聚酶，使用 Luc01 (5'-TTCATACAGAAGGCGTGGAG-3'/SEQ ID NO :45) 和 Luc02 (5'-CGTTCGCGGGCGCAACTGCA-3'/SEQ ID NO :46) 作为引物，反应条件是：94℃下变性 5 分钟后，进行 25 个 94℃下 15 秒、55℃下 30 秒、72℃下 45 秒的循环后，再进行 72℃下 5 分钟的延伸反应。通过琼脂糖凝胶电泳选择产生长度为 0.5kb 的 PCR 片段的克隆，经荧光素酶活性检测进行最终筛选。

[0428] 按以下方法实施荧光素酶检测：将由 Juakat 细胞株获得的 pNFATlucZEOF324 的稳定转化株以 6.7×10⁴ 细胞 /ml 的浓度悬浮于含有 100 μg/ml 的零霉素的传代培养基中后，以 75 μl / 孔接种于涂布抗人 CD3 的微孔板 (Beckton Dickinson) 和常规的免疫微孔板中。在 37℃下培养 20 小时后，添加等量 (75 μl) 的 Dual-Glo 荧光素酶缓冲液 (Promega)，静置 10 分钟后，用光度计 MicroLumat LB96P (EG&G Berthold) 对各孔的化学发光进行测定，每孔测定 5 秒。

[0429] 选择只在涂布抗人 CD3 的微孔板培养下显示化学发光的菌株 F11 株作为稳定转化株。

[0430] [实施例 16] 双重转化株的制备

[0431] 由上述实施例 15 获得的 F11 株作为受体细胞，转导上述实施例 13 中获得的 CD-NKIR 融合的 pCXND3CD8NKIRfu11 和实施例 14 获得的 CD-KIR 融合的 pCXND3CD8KIRfu11 获得双重转化株。

[0432] pCXND3CD8NKIRfu11 和 pCXND3CD8KIRfu11 各 20 μg，在 37℃下用 20 个单位的 Pvu I (宝酒酿) 消化 2 小时，用等量苯酚 / 氯仿 (50% (v/v) ;Nacalai Tesque) 纯化，用 1/10

量的 3M 醋酸钠 (Nacalai Tesque) 和 2 倍量的乙醇沉淀后,将风干的试样溶解于 20 μ l 的无菌水中进行使用。作为电穿孔及其后建立时的方法,除了使用含有 100 μ g/ml 的零霉素和 10% (v/v) 非活化胎儿牛血清和 1% (v/v) 青霉素和链霉素溶液的 RPIM1640 培养基,以 700 μ g/ml 遗传霉素实施作为选择药剂之外,其余以与实施例 9 相同的条件实施。通过使用抗 CD8-FITC 抗体 (Bectondickinson) 对所得单个克隆来源的抗药性克隆进行 FACS 分析,为每一个选择出 6-8 个表达克隆。

[0433] 对这些转化株,通过实施例 15 中记载的报告基因活性测定,最终选择出 3 个带有报告基因活性的 CD8 嵌合克隆 (NKIR#16NKIR#19 为 pCXND3CD8NKIRfu11 的转化株, KIR#24 为 pCXND3CD8KIRfu11 的转化株)。这 3 个克隆的 CD8 嵌合结构示于图 11-1 中。图 11-2 表示的是采用实施例 17 中使用的抗 CD8 抗体,LT8 (Serotec) 和结合了 FITC 的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (Coulter) 对这些克隆的分析结果。3 株 CD8 嵌合克隆都观察到了 LT8 特异染色。

[0434] [实施例 17]NKIR 来源的 ITIM 活性测定

[0435] 用由实施例 16 获得的双重转化株 NKIR#16, NKIR#19 和 KIR#24 及其宿主 F11 株实施荧光素酶报告基因检测,进行 NKIR 来源的 ITIM 活性测定。

[0436] 使宿主 F11 株在传代培养基 (含有 100 μ g/ml 的零霉素和 10% (v/v) 非活化胎儿牛血清和 1% (v/v) 青霉素和链霉素溶液的 RPIM1640 培养基) 中生长。使 CD8 嵌合克隆在含有浓度为 700 μ g/ml 遗传霉素的上述培养基中生长。以 5.33×10^5 细胞 /ml 悬浮于各个的增殖培养基后,以每孔 37.5 μ l 分别加注在平底 96-孔板上,37 $^{\circ}$ C 下培养 16 小时。每孔添加 12.5 μ l (终浓度为 1.5 μ g/ml) 经各个增殖培养基稀释为 6 μ g/ml 的抗 CD8 抗体 (LT8, Serotec, MCA1226XZ) 作为第一抗体。在对照组中添加不含抗体的各种增殖培养基。37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时后,每孔添加 12.5 μ l (终浓度为 1.2 μ g/ml) 经各个增殖培养基稀释为 6 μ g/ml 的家兔抗小鼠 IgG1 抗体 (H143.225.8, Southern Biotech, 1145-01) 作为交联剂。在对照组中添加不含抗体的各种增殖培养基。37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时后,每孔添加 12.5 μ l (终浓度为 40 μ g/ml) 经各个增殖培养基稀释为 240 μ g/ml 的 ConA (SIGMA)。37 $^{\circ}$ C 下培养 8 小时和 10 后,加入等量 (75 μ l) 的荧光素酶试剂 (promega),室温下静置 10 分钟后,用实施例 15 记载的方法测定发光。

[0437] 报告基因检测的结果示于图 12 中。所有检测都以一式三分的方式实施,柱状图表示平均值,SD 值记载为误差棒。在 ConA 刺激后 8 小时和 10 小时的比较中,10 小时的结果显示出更高的效果,但是二者显示出基本相同的倾向,因此下面更为详细地记载 10 小时后的结果。就宿主 F11 而言,无论存在或不存在 LT8 抗体或交联剂都显示出大致一定的活性值。与之相对,就阳性对照克隆 CD8-KIRfu11 转导 CD8 嵌合克隆 KIR#24 的活性而言,观察到在 LT8 存在下活性减弱,这种活性减弱显示出所假设的不受交联剂影响的模式。另一方面,两个 CD8-NKIRfu11 转导 CD8 嵌合克隆均观察到在 LT8 存在下活性减弱,这种活性减弱不受交联剂影响。此外,减弱的程度,就 CD8-KIR 转染株 #24 而言为 16.6%,CD8-NKIR 转染株 #16、#19 分别为 21.1%、30.2%,据此提示含有 NKIR 分子的细胞质内的 ITIM 基序的序列与已知的 KIR2DL3 分子的细胞质内的 ITIM 具有相同程度或比其程度更高的 ITIM 活性。

[0438] 工业上利用的可能性

[0439] 根据本发明,提供了在 NK 细胞中表达的新型蛋白质,编码该蛋白质的 DNA,含有该 DNA 的载体,含有该载体的宿主细胞,以及该蛋白质的制备方法。进而,还提供了鉴定与该蛋

白质结合的或调节其活性的化合物的方法。预计本发明的蛋白质或 DNA, 或者与本发明的蛋白质结合的或调节其活性的化合物可应用于与本发明的蛋白质相关的疾病的新的预防药物和治疗药物的开发中。

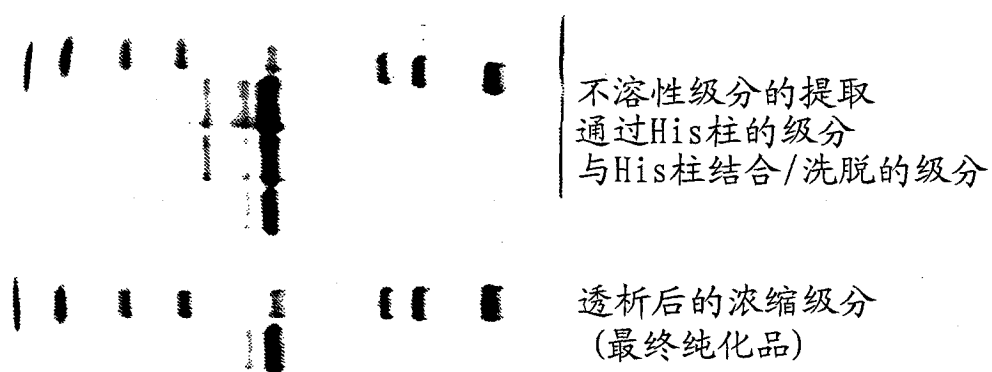


图 1

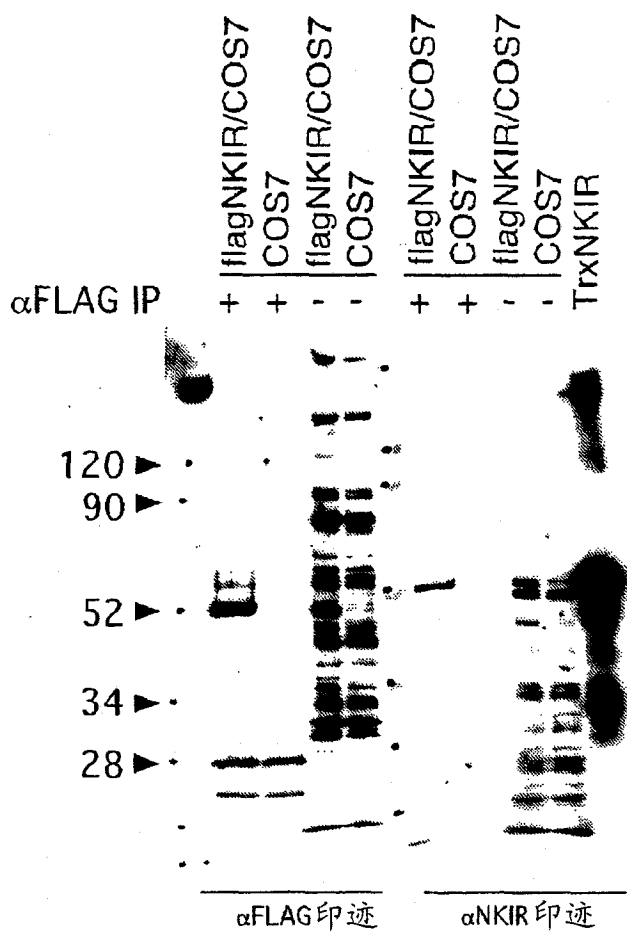


图 2

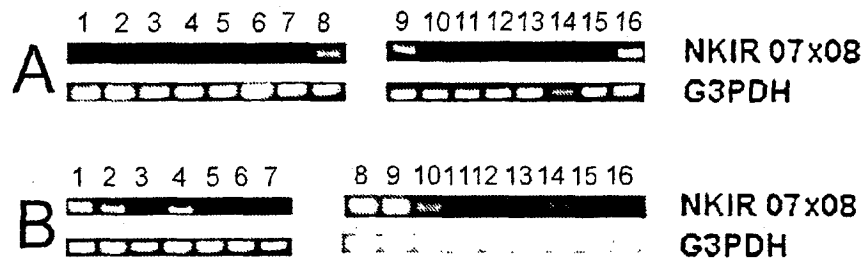


图 3

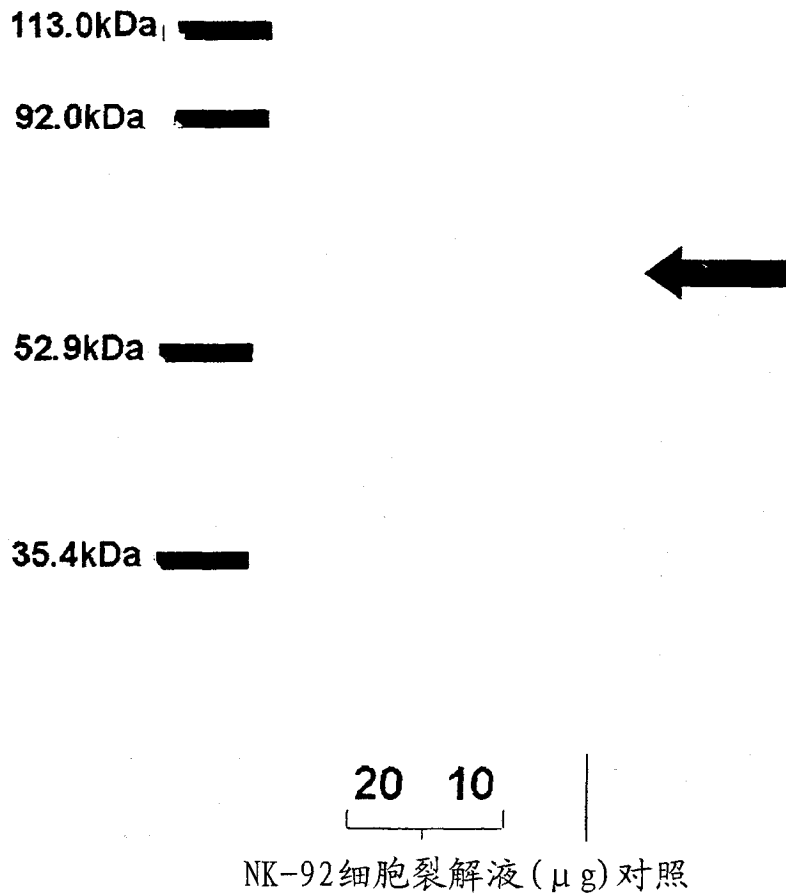


图 4

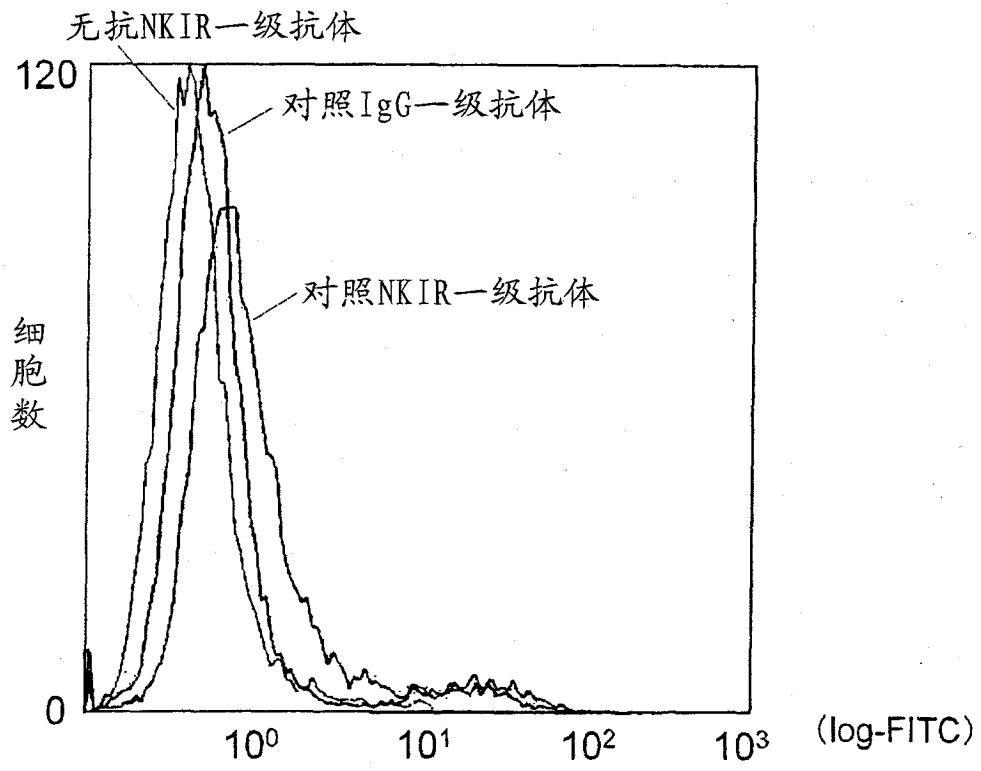
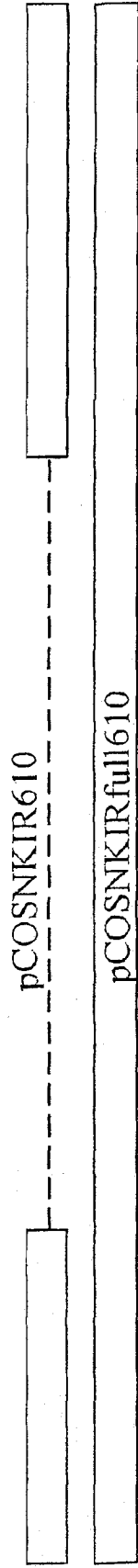


图 5

ATGTTGCCATCTTTAGGGCCCAATGCTGCTGGACGGCTGTGCTCTTTGTTCCCTGTGTGGGAAA
 M L P S L G P M L L W T A V L L E V P C V G K



载体骨架: pCOS1

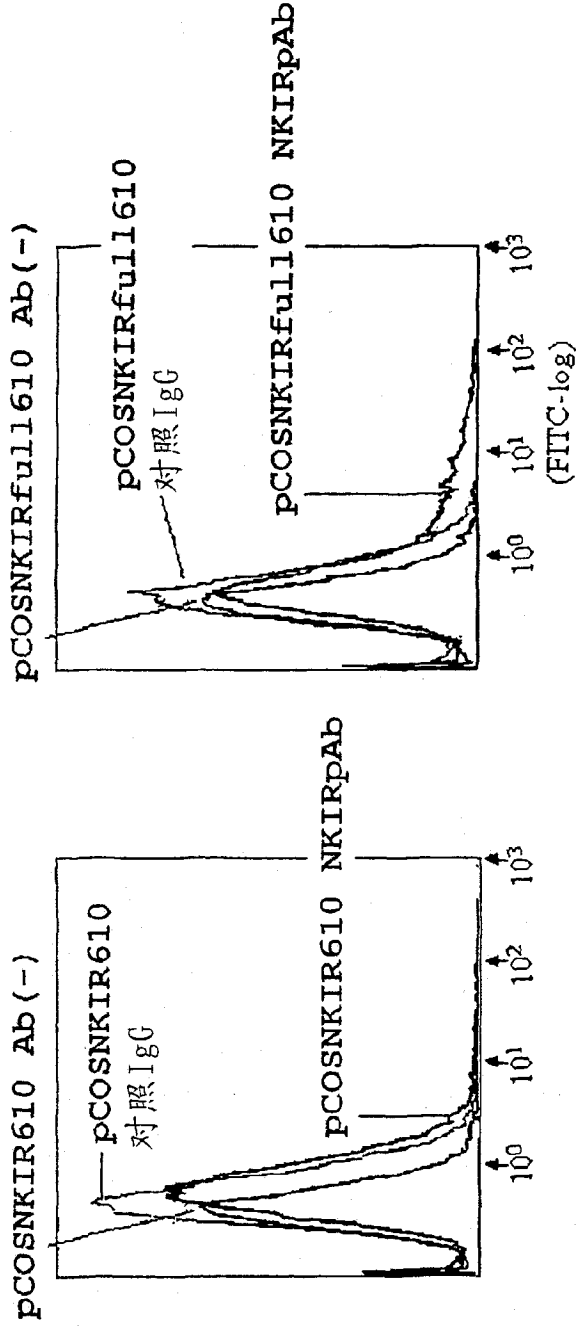


图 6

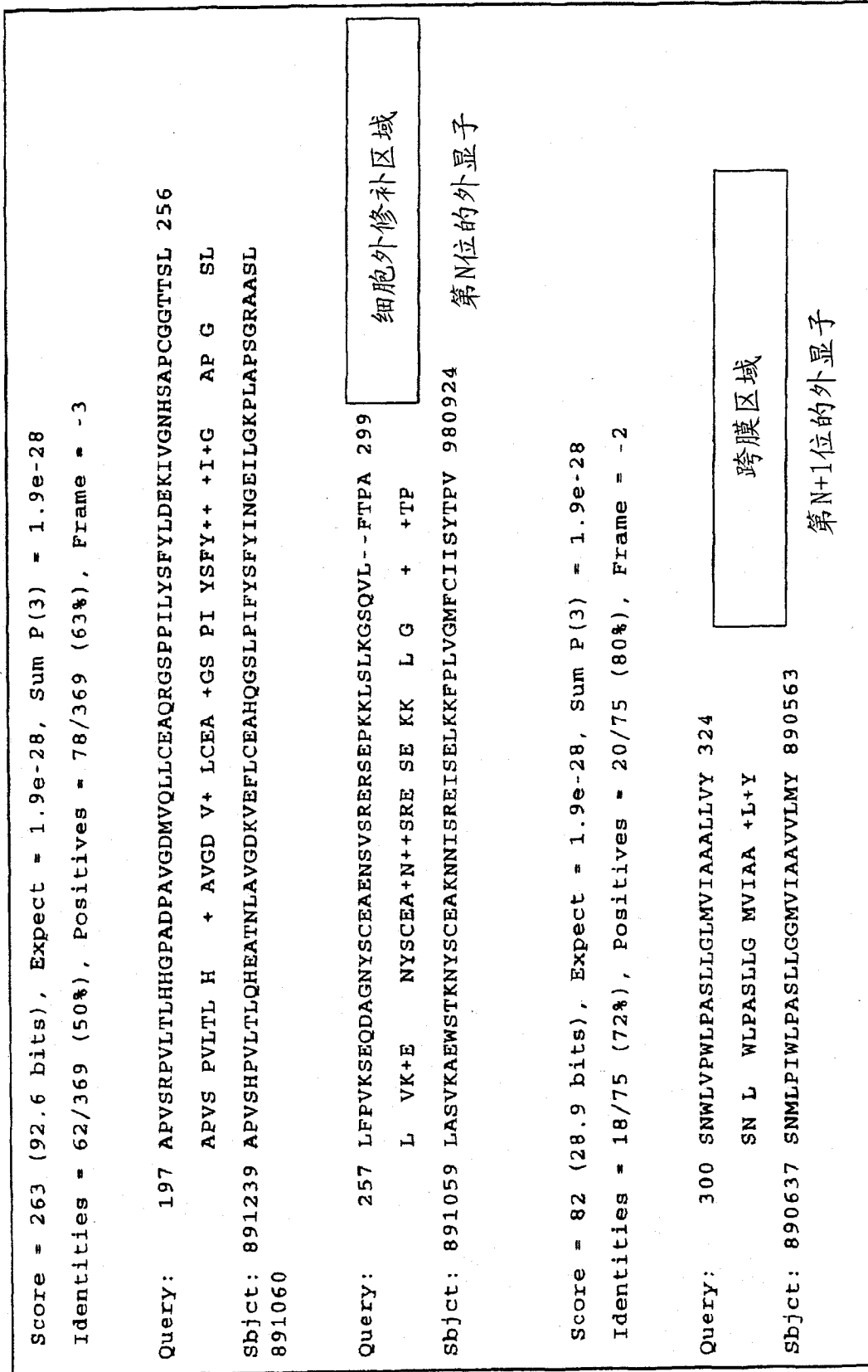


图 7

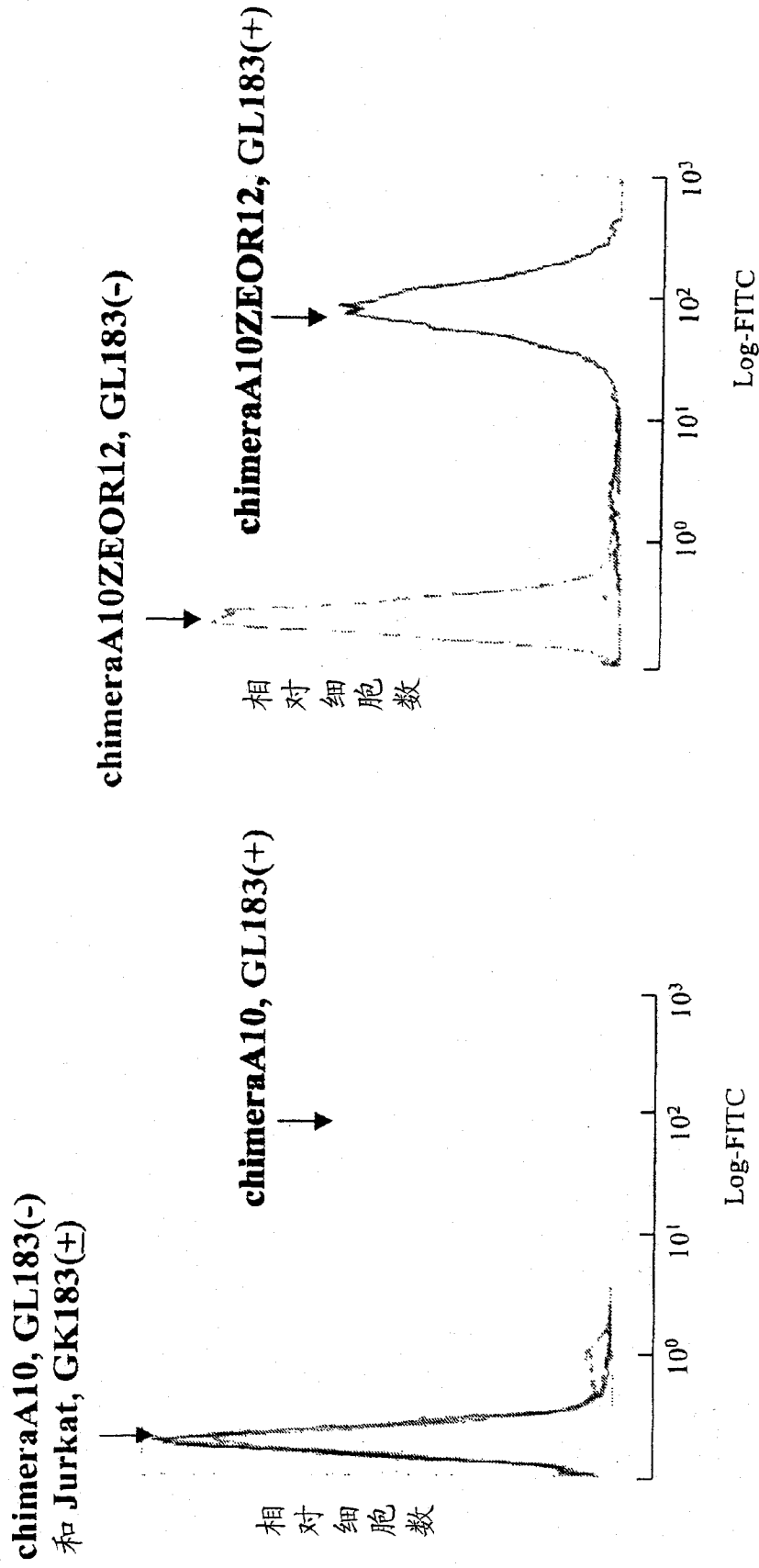
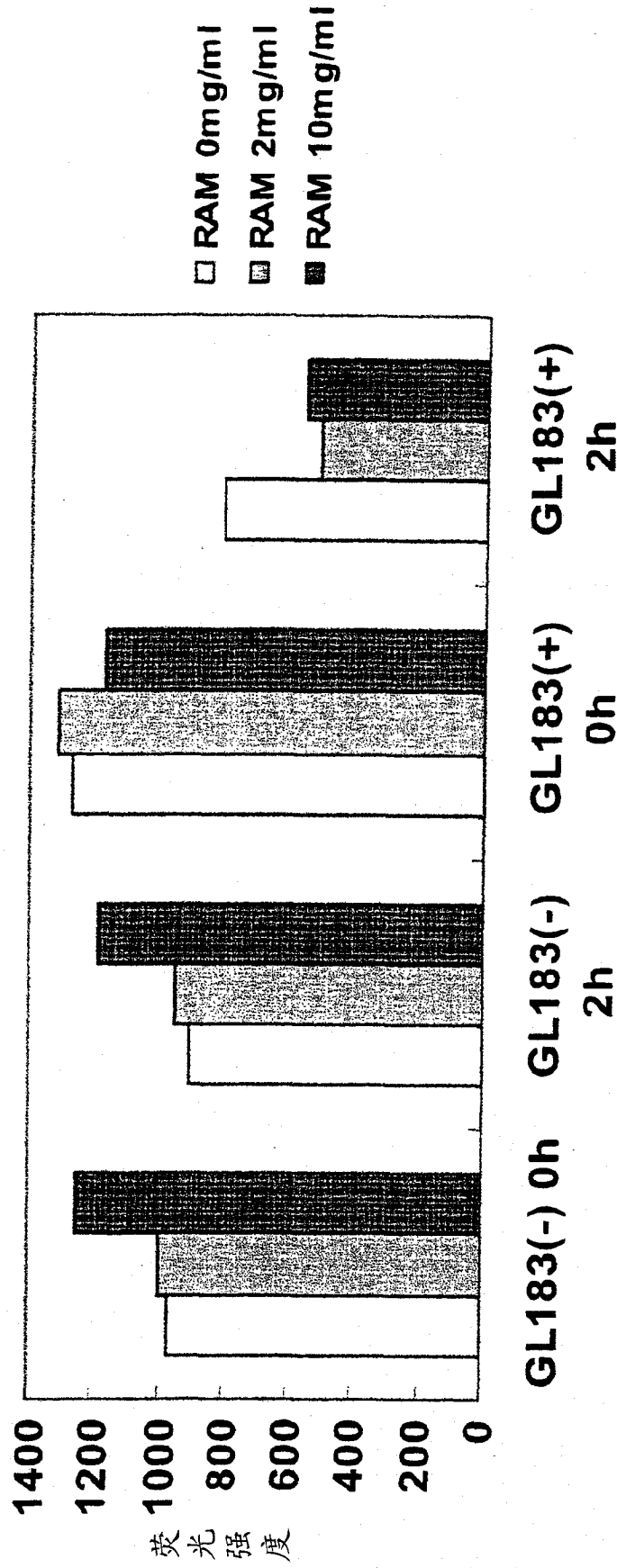


图 9



存在一级抗体或不存在一级抗体下二级抗体的反应时间

图 10

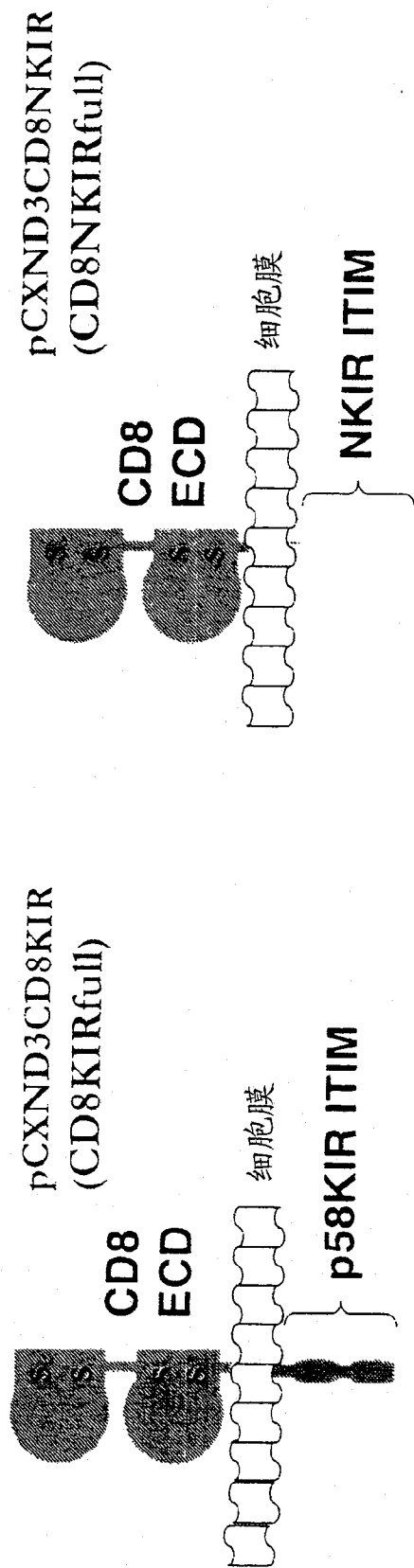


图 11-1

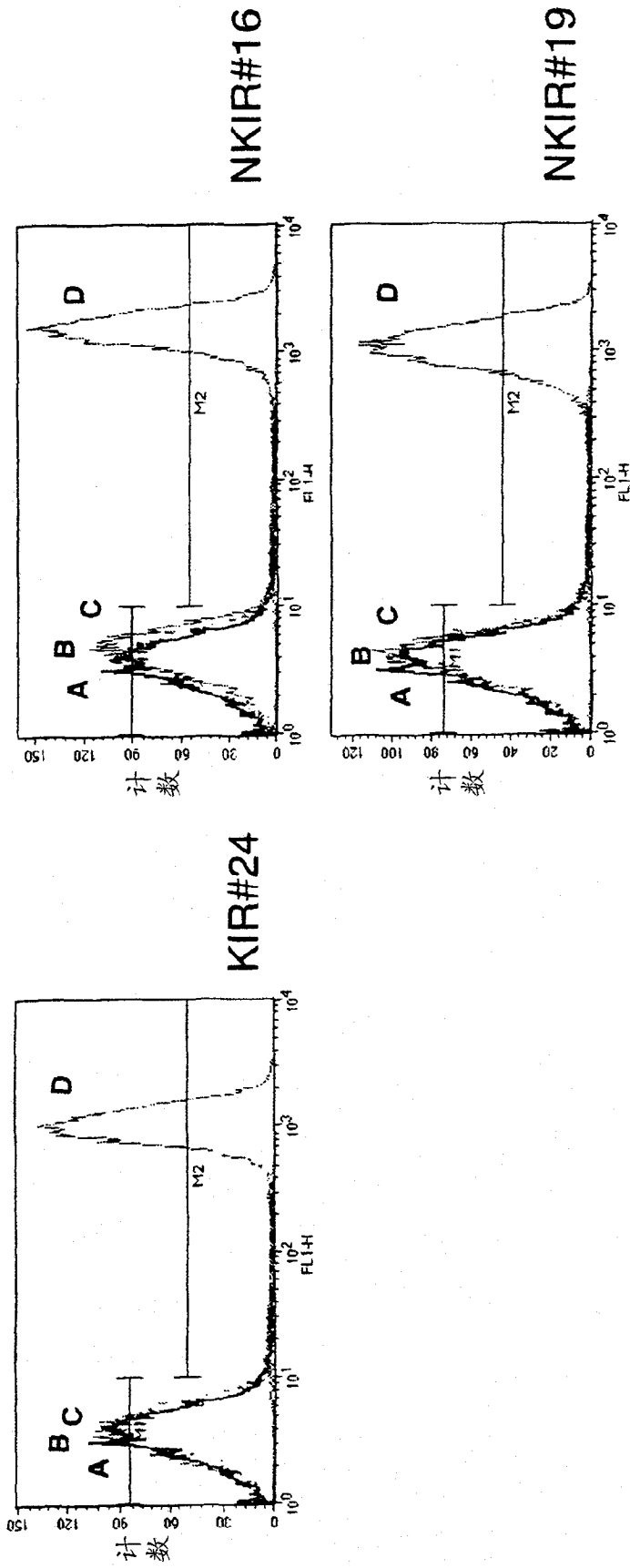
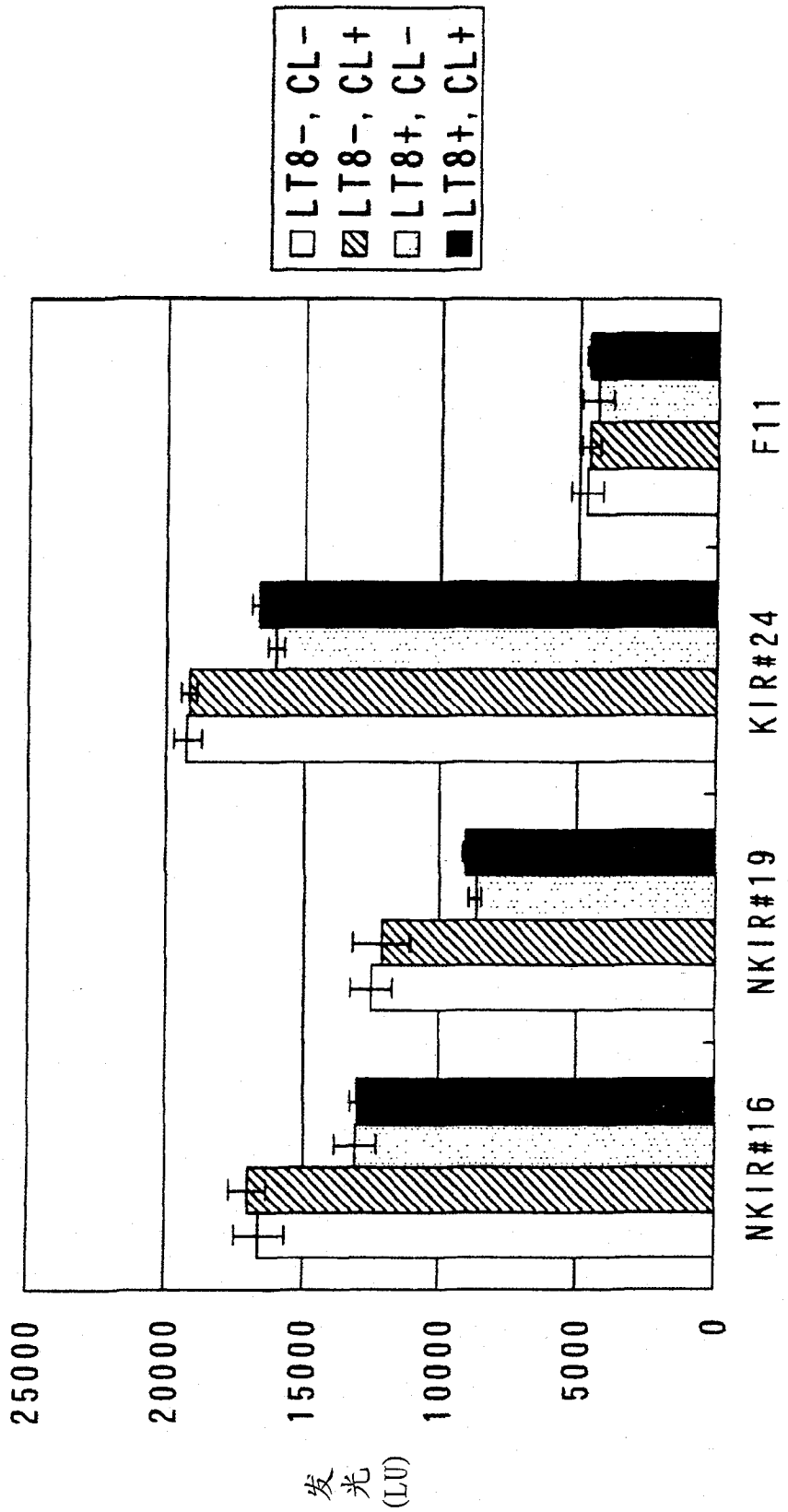


图 11-2



克隆

图 12

专利名称(译)	在NK细胞中表达的蛋白质		
公开(公告)号	CN1886506B	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200480035368.6	申请日	2004-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	桥本真一		
申请(专利权)人(译)	中外制药株式会社 松岛纲治 桥本真一		
当前申请(专利权)人(译)	中外制药株式会社 松岛纲治 桥本真一		
[标]发明人	松岛纲治 桥本真一 土屋政幸 平田裕一 吉田贤二 尾岛和行		
发明人	松岛纲治 桥本真一 土屋政幸 平田裕一 吉田贤二 尾岛和行		
IPC分类号	C12N15/09 A61K45/00 A61P11/16 A61P11/06 A61P31/12 A61P31/14 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 A61K31/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/566		
CPC分类号	A61K31/00 G01N33/564 G01N2500/00 G01N33/566 C07K14/705 A61P11/16 A61P11/06 A61P25/18 A61P31/12 A61P31/14 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08		
代理人(译)	郭文洁		
审查员(译)	唐华东		
优先权	2003338331 2003-09-29 JP		
其他公开文献	CN1886506A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

对纯化的免疫细胞的表达频率进行分析，成功地发现了在天然杀伤(NK)细胞中特异表达的NKIR基因。NKIR基因编码受体，通过使用这种受体，可以鉴定出受体的激动剂或拮抗剂。

