

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-523681

(P2005-523681A)

(43) 公表日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 31/12	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00	C O 7 K 14/47 Z N A	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-532654 (P2003-532654)	(71) 出願人	591123609 イミュネックス・コーポレーション IMMUNEX CORPORATION アメリカ合衆国カリフォルニア州9132 0-1799, サウザンド・オークス, ワ ン・アムジェン・センター・ドライブ
(86) (22) 出願日	平成14年10月4日 (2002.10.4)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月4日 (2004.6.4)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/031994	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02003/029436	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成15年4月10日 (2003.4.10)		
(31) 優先権主張番号	60/327, 252		
(32) 優先日	平成13年10月4日 (2001.10.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 U L 1 6 結合タンパク質4

(57) 【要約】

U L B P ファミリーの新規メンバーである、U L B P 4 を単離し、そして特徴付けている。U L B P 4 は、免疫エフェクター細胞、特にNK細胞の有用な活性化因子である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸 32 ~ 207 に少なくとも 92% 同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含んでなり、

該ポリペプチドが NKG2D に結合可能である、
単離 ULBP4 タンパク質。

【請求項 2】

アミノ酸配列がアルファ - 1 ドメインおよびアルファ - 2 ドメインをコードする、請求項 1 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 3】

アミノ酸配列が配列番号 2 のアミノ酸 32 ~ 207 に少なくとも 95% 同一である、請求項 1 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 4】

アミノ酸配列が配列番号 2 のアミノ酸 32 ~ 207 に少なくとも 99% 同一である、請求項 1 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 5】

可溶性である、請求項 1 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 6】

配列番号 2 のアミノ酸 32 ~ 207 を含んでなる、請求項 1 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 7】

配列番号 2 のアミノ酸 31 ~ 217 を含んでなる、請求項 6 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 8】

配列番号 2 を含んでなる、請求項 7 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 9】

さらに異種ペプチドを含んでなる、請求項 1 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 10】

異種ペプチドがペプチドタグである、請求項 9 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 11】

異種ペプチドが、オリゴマー化を促進するペプチド部分である、請求項 9 の ULBP4 タンパク質。

【請求項 12】

配列番号 1 の残基 94 ~ 621 に少なくとも 95% 同一のヌクレオチド配列からなる核酸を含んでなり、該核酸が NKG2D に結合可能なポリペプチドをコードする、単離 ULBP4 ポリヌクレオチド。

【請求項 13】

ポリペプチドがアルファ - 1 ドメインおよびアルファ - 2 ドメインを含んでなる、請求項 12 の ULBP4 ポリヌクレオチド。

【請求項 14】

ヌクレオチド配列が配列番号 1 の残基 94 ~ 621 に少なくとも 99% 同一である、請求項 12 の ULBP4 ポリヌクレオチド。

【請求項 15】

配列番号 1 の残基 94 ~ 621 を含んでなる、請求項 12 の ULBP4 ポリヌクレオチド。

【請求項 16】

ポリペプチドがさらに異種ペプチドを含んでなる、請求項 12 の ULBP4 ポリヌクレオチド。

【請求項 17】

ポリペプチドが配列番号 2 のアミノ酸 31 ~ 217 を含んでなる、請求項 12 の ULBP4 ポリヌクレオチド。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

請求項 12 の U L B P 4 ポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

【請求項 19】

請求項 18 のベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 20】

U L B P 4 ポリペプチドを産生する方法であって、U L B P 4 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で、請求項 19 の宿主細胞を培養することを含んでなる、前記方法。

【請求項 21】

請求項 17 の U L B P 4 ポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項 22】

哺乳動物細胞である、請求項 21 の宿主細胞。

10

【請求項 23】

U L B P 4 タンパク質を産生する方法であって、U L B P 4 ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で、請求項 21 の宿主細胞を培養することを含んでなる、前記方法。

【請求項 24】

宿主細胞または培地から U L B P 4 タンパク質を単離することをさらに含んでなる、請求項 23 の方法。

【請求項 25】

請求項 23 の方法によって産生される U L B P 4 タンパク質。

【請求項 26】

配列番号 2 のアミノ酸 32 ~ 207 に少なくとも 92 % 同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含んでなり、該ポリペプチドが N K G 2 D に結合可能である、U L B P 4 タンパク質をコードする、単離 U L B P 4 ポリヌクレオチド。

20

【請求項 27】

請求項 1 の U L B P 4 タンパク質を含んでなる薬剤組成物。

【請求項 28】

請求項 5 の U L B P 4 タンパク質を含んでなる薬剤組成物。

【請求項 29】

配列番号 2 からなるタンパク質に特異的に結合する単離抗体。

【請求項 30】

配列番号 2 のアミノ酸 32 ~ 207 からなるタンパク質に特異的に結合する、請求項 29 の抗体。

30

【請求項 31】

ヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項 29 の抗体。

【請求項 32】

細胞毒性剤または放射性剤に融合している、請求項 29 の抗体。

【請求項 33】

請求項 29 の抗体を含んでなる薬剤組成物。

【請求項 34】

N K G 2 D を発現する細胞を活性化する方法であって、請求項 1 の U L B P 4 タンパク質の有効量と細胞を合わせることを含んでなる、前記方法。

40

【請求項 35】

細胞の細胞毒性が増進される、請求項 34 の方法。

【請求項 36】

細胞によるサイトカインまたはケモカインの産生が刺激される、請求項 34 の方法。

【請求項 37】

細胞が N K 細胞である、請求項 34 の方法。

【請求項 38】

細胞が T 細胞である、請求項 34 の方法。

【請求項 39】

50

免疫反応を下方調節する方法であって、療法的に有効な量の請求項 29 の抗体を患者に投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 40】

患者が自己免疫疾患を患っている、請求項 39 の方法。

【請求項 41】

タンパク質を検出するかまたは定量化する方法であって、請求項 29 の抗体と U L B P 4 タンパク質をインキュベーションし、そして抗体 - U L B P 4 タンパク質複合体の量を解析し、それによって、試料中のタンパク質を検出するかまたは定量化することを含んでなる、前記方法。

【請求項 42】

腫瘍増殖を阻害する方法であって、療法的に有効な量の請求項 1 の U L B P 4 タンパク質を患者に投与することを含んでなる、前記方法。

10

【請求項 43】

腫瘍除去後、患者に残存する腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、除去した腫瘍から培養した腫瘍細胞を患者に再導入することを含んでなる、

ここで、請求項 1 の U L B P 4 タンパク質が、培養した腫瘍細胞の表面上に発現され、そして

培養した腫瘍細胞が非分裂性である

前記方法。

【請求項 44】

請求項 1 の U L B P 4 タンパク質をコードする核酸が、培養した腫瘍細胞内に導入されている、請求項 43 の方法。

20

【請求項 45】

培養した腫瘍細胞が放射線照射されている、請求項 43 の方法。

【請求項 46】

療法的に有効な量の請求項 1 の U L B P 4 タンパク質を患者に投与することを含んでなる、感染を治療する方法。

【請求項 47】

感染がウイルス感染である、請求項 46 の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願へのクロス・リファレンス

本出願は、米国仮出願第 60 / 327 , 252 号、2001 年 10 月 4 日提出の優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般的に、U L 16 結合タンパク質 (U L B P) ファミリーの新規メンバー、U L B P 4 に関する。より具体的には、本発明は、精製され、そして単離された U L B P 4 ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸分子、および U L B P ポリペプチド

40

【背景技術】

【0003】

背景

U L B P 類 (U L 16 結合タンパク質) は、ヒト M H C クラス I 関連細胞表面タンパク質の新規ファミリーである。U L B P 1 は、ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) 糖タンパク質、U L 16 に結合するポリペプチドとして同定された (C o s m a n ら, 2001, I m m u n i t y 14 : 123 - 133)。U L B P 2 および U L B P 3 が続いて発見され、そしてこれらは U L B P 1 とある程度の相同性を有する (同上)。U L B P ポリペプチドは、M H C クラス I タンパク質の特徴を、すべてではないが、いくつか共

50

有する。ULBP類はMHCクラスIタンパク質に特徴的なアルファ-1およびアルファ-2ドメインを有するが、アルファ-3ドメインを欠き、そしてベータ-2ミクログロブリンと会合しない。同上。

【0004】

ヒトの非古典的MHCクラスIタンパク質の別のファミリーのいくつかのメンバー、MIC類もまた、UL16に結合する。Grohら(1996)PNAS USA 93:12445。MICAおよびMICBポリペプチドは、以下に論じるように、ULBP類と類似の特性をいくつか共有する。

【0005】

ULBP類およびMIC類は、自然免疫系の重要な成分であるナチュラルキラー(NK)細胞の重要な活性化因子である。活性化されたNK細胞は、ウイルスに感染した細胞および新生物細胞などの、ターゲティングされる細胞を認識し、そして溶解させる。

【0006】

NK細胞は、標的細胞上のMHCクラスI分子に特異的な受容体を介して、細胞標的からのシグナルを認識する。これらのNK細胞受容体には、キラー細胞Ig様受容体(KIR)、Ly49、およびNKG2受容体ファミリーが含まれる。受容体の構造に応じて、特異的リガンドとの結合は、NK細胞に活性化シグナルまたは阻害性シグナルのいずれかを搬送するであろう。Lanier(1998), Ann Rev Immunol 16:359。最近まで、阻害性NK細胞受容体(KIR類)に生成されるシグナルは、いかなる活性化受容体に生成されるシグナルより優勢であり、したがってMHCクラスIレベルが下方制御されている細胞は、「自己喪失(missing-self)」仮説にしたがって、殺されると考えられていた。Ljunggrenら(1990), Immunology Today 11:237。しかし、活性化リガンドであるULBP類またはMIC類が、NK細胞耐性でMHCクラスIを発現している標的細胞上に発現されると、細胞はNK細胞殺傷に感受性になる。Cosmanら、上記; Bauerら(1999), Science 285:727-29。さらに、現在、ULBP類の可溶性組換え型をヒトNK細胞に投与すると、該分子がNK細胞に結合し、そして腫瘍標的に対するNK細胞毒性を刺激することが見出されている。Kubinら(2001), Eur. J. Immunol. 31:1428-37。ULBP類およびMIC類は、活性化シグナルをNK細胞に伝達し、この活性化シグナルは、MHCクラスI抗原の阻害性受容体の結合によって生成される負のシグナルを無効にする(override)ことが可能である。

【0007】

ULBP類は、NK細胞がサイトカインIFN-ガンマ、GM-CSF、TNF-アルファ、およびTNF-ベータ、並びにケモカインMIP1-アルファ、MIP1-ベータ、およびI-309を産生するのを誘導することが見出されている。IL-12でNK細胞を同時刺激すると、これらの因子の産生をさらに追加する効果を有する。Cosmanら、上記; Kubinら、上記。

【0008】

MICA発現は、特定の上皮腫瘍で、HCMV感染細胞で、そしてストレスに反応して、上方制御される。Grohら(1996), PNAS USA 93:12445-50; Grohら(1999), PNAS USA 96:6879-84。MIC類と対照的に、ULBPメッセージは、広範囲の細胞、組織、および腫瘍によって、そして多様な細胞株上で発現される(Cosmanら、上記)。したがって、いくつかの種類の細胞が、ULBPが仲介するシグナルをNK細胞に潜在的に搬送可能であり、そしてULBPが仲介する殺傷の標的でありうる。

【0009】

ULBP類およびMIC類のアミノ酸配列には遠い関連しかないが、どちらのタンパク質ファミリーも、NKG2D/DAP10ヘテロ複合体への結合によって、NK細胞に活性化シグナルを搬送する。NKG2Dはホモ二量体C型レクチンであり、ヒトNK細胞上

のみでなく、ヒトCD8⁺ T細胞および T細胞上にも発現される。NK G2D発現はまた、ネズミNK細胞上で、そして活性化されたネズミCD8⁺ T細胞およびマクロファージ上でも報告されている。Bauer、上記；Diefenbachら(2000), Nature Immunol. 1:119-126. T細胞では、NK G2DはCD28と類似の方式の同時刺激受容体として作用する。Grohら(2001), Nature Immunol. 2:255. NK G2Dの細胞質ドメインは短く、そしてシグナル伝達は、DAP10膜アダプタータンパク質との会合を通じて仲介される。Wuら(1999), Science 285:730-32. DAP10はPI3-キナーゼのp85サブユニットおよびアダプタータンパク質Grb2に結合可能である。Wuら、上記；Changら(1999), J. Immunol. 163:4651-54. 10

ULBP1、2、および3ポリペプチドは、組換え発現させたNK G2D/DAP10ヘテロ二量体に結合する。抗NK G2D抗体は、NK細胞へのULBP1、2、および3の結合を遮断する。Cosmanら、上記；Sutherlandら(2002), J. Immunol. 168(2):671-79. この証拠によって、NK G2Dが、初代ヒトNK細胞上に発現される受容体であり、ULBPを認識するという結論が裏付けられる。

【0010】

NK細胞、T細胞、またはマクロファージが、ケモカインおよびサイトカインの細胞産生を誘導し、そして標的細胞に対する細胞毒性を誘導する活性を活性化するのに有効な剤は、標的細胞溶解に、特に病原体に感染した細胞および腫瘍細胞の溶解に有用である。NK細胞、T細胞、マクロファージを、特にNK G2D/DAP10受容体複合体を介して活性化する能力を有する新規リガンドは、例えばNK細胞および/またはT細胞殺傷、並びに他のNK細胞および/またはT細胞依存療法を誘発することによって、免疫エフェクター細胞からの療法反応を活性化する剤として有用である。NK G2D/DAP10受容体は、 T細胞、CD8⁺T細胞、およびマクロファージ上に発現される。Bauerら(1999), Science 285:727-29; Diefenbachら(2000), Nature Immunology 1(2):119-26. これらの受容体の結合は、T細胞増殖、細胞毒性、およびサイトカイン産生を刺激することが可能である。Grohら(2001), Nature Immunol. 2:255; Dasら(2001), Immunity 15:83-93. 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

発明の概要

本発明は、ULBPタンパク質ファミリーの新規メンバーであるULBP4を提供する。本発明のULBP4ポリペプチドには、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するものとともに、配列番号2のアミノ酸配列に実質的なアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドおよびその有用な断片が含まれる。有用な断片には、NK G2Dに結合可能なものが含まれる。こうしたULBP4ポリペプチドは、NK細胞およびT細胞を含む、NK G2Dを発現する免疫エフェクター細胞を活性化する能力を有することが可能である。 40

【0012】

本発明はまた、ULBP4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子も提供する。本発明のポリヌクレオチド分子には、以下が含まれる：配列番号1に示すような核酸配列を有する分子；高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件下(例えば42、6XSSC、50%ホルムアミド)で、配列番号1の核酸配列にハイブリダイズするもの；配列番号2に実質的な配列同一性を有する、ULBP4タンパク質をコードするもの；および配列番号1の核酸配列と実質的な核酸配列同一性を有するもの。

【0013】

本発明には、ULBP4ポリペプチドの変異体および誘導体が含まれ、可溶性型および 50

融合タンパク質が含まれる。ULBPタンパク質の可溶性型は、水性溶液中で可溶性であり、そして例えば細胞外ドメインを含み、そして膜貫通領域またはGPIアンカーを欠くことが可能である。本発明の融合タンパク質には、所望の機能を与える異種タンパク質またはペプチドに融合したULBP4ポリペプチドが含まれる。異種タンパク質またはペプチドは、例えば、ULBP4ポリペプチドの精製、オリゴマー化、安定、分泌、またはターゲティングを容易にすることが可能である。本発明の融合タンパク質は、例えば、異種タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子とインフレームで、ULBP4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含有する発現構築物から産生可能である。本発明はまた、本発明のULBP4ポリヌクレオチド分子を含有する、ベクター、プラスミド、発現系、宿主細胞等も提供する。本発明のULBP4ポリペプチドを産生する遺伝子操作法には、既知の方法にしたがった、細胞不含発現系における、細胞宿主における、組織における、そして動物モデルにおけるポリヌクレオチド分子の発現が含まれる。

10

【0014】

本発明には、本発明の実質的に精製されたULBPポリペプチドおよび薬学的に許容しうるキャリアーを含有する、薬剤組成物がさらに含まれる。こうした薬剤組成物を、例えば、NK細胞、T細胞、および活性化マクロファージを含む、NKG2D/DAP10発現細胞の活性を誘導するため；サイトカインおよびケモカインの産生を誘導するため；NKG2D/DAP10発現細胞の細胞毒性を増進することによって、腫瘍細胞、およびウイルスに感染した細胞などの感染した細胞の溶解を誘導するため；そして例えば癌、ウイルス感染、および細菌感染の療法的治療のため、細胞、組織、または患者に投与する。

20

【0015】

抗ULBP4抗体もまた提供する。ULBP1、ULBP2、ULBP3、および/またはULBP4に結合するものを含む、抗ULBP抗体を用いて、例えばULBP発現細胞に療法剤をターゲティングし、ULBP発現細胞に対して、抗体に依存する細胞仲介型細胞毒性を誘導し、免疫反応を下方調節し、そして/またはULBPタンパク質を精製するか、同定するか、または該タンパク質の品質を保証することが可能である。こうした抗体は、多様な特性を有する可能性がある：ULBPポリペプチドに結合可能であり；ヒト抗体またはヒト化抗体であることが可能であり；アンタゴニスト性である、すなわちULBPタンパク質およびNKG2Dの相互作用によるNKG2D発現細胞の活性化を防止または阻害することが可能であり；NKG2DへのULBPタンパク質の結合を阻害する可能性も、また、しない可能性もあり；そして/または細胞毒性剤または放射性剤に融合させることが可能である。

30

【0016】

本発明はまた、NKG2D発現細胞活性の解析に；NKG2D受容体結合および活性化の解析に；そして感染および新生物細胞に対する自然免疫系反応に關与するシグナル分子の阻害性/刺激性の影響の解析に有用な、試薬、組成物、および方法も提供する。

【0017】

本発明の療法には、多くのありうる適用の中で：腫瘍細胞がULBPタンパク質を発現している可能性も、またはしていない可能性もある、腫瘍の治療；ウイルス感染および/または細菌感染を含む感染の治療；例えば自己免疫疾患、移植、または炎症性腸疾患を経験している患者における免疫反応の下方調節を含む、多数の適用における、ULBPポリペプチドおよび/または抗ULBP抗体の使用が含まれる。

40

【0018】

本発明は、腫瘍再増殖に対して患者に予防接種する方法であって：腫瘍を外科的に除去し；除去した腫瘍から腫瘍細胞を培養し；培養した腫瘍細胞に、請求項1のULBP4タンパク質をコードする核酸をトランスフェクションし；培養した腫瘍細胞に放射線照射し；そして放射線照射したトランスフェクション腫瘍細胞を患者に再導入することを含む、前記方法をさらに提供する。

【0019】

本発明のこれらおよび多様な他の特徴および利点は、以下の詳細な説明を読み、そして

50

付随する請求項を再検討すれば明らかであろう。

配列の簡単な説明

配列番号 1 は U L B P 4 をコードする核酸配列である。

【 0 0 2 0 】

配列番号 2 は配列番号 1 にコードされるアミノ酸配列である。

配列番号 3 は U L B P 1 のアミノ酸配列である。

配列番号 4 は U L B P 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 1 】

配列番号 5 は U L B P 3 のアミノ酸配列である。

配列番号 6 は W O 9 9 3 1 2 3 6 に開示される c D N A に関して予測されるアミノ酸配列である。 10

【 0 0 2 2 】

配列番号 7 は核酸プライマーである。

配列番号 8 は核酸プライマーである。

配列番号 9 は配列番号 1 の 3 ' セグメントである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 3 】

発明の詳細な説明

定義：

以下の定義は、本明細書に頻繁に使用される特定の用語の理解を容易にするために提供され、そして本開示の範囲を限定することを意味しない。 20

【 0 0 2 4 】

N K 細胞または T 細胞などの免疫エフェクター細胞の「活性化」は、炎症反応に關与するように細胞を刺激することを意味し、該反応には、例えば標的細胞の溶解（または免疫エフェクター細胞の細胞毒性の増進）並びに / あるいは炎症性サイトカインおよび / またはケモカインの分泌が含まれる可能性がある。免疫エフェクター細胞は、「*in vitro*」（すなわち細胞培養中）、「*in vivo*」（すなわち細胞が生存哺乳動物の一部である間）、および / または「*ex vivo*」（すなわち培養中に活性化されるが、後に生存哺乳動物に戻される）で活性化されることが可能である。

【 0 0 2 5 】

「Akt」は、細胞内で抗アポトーシス・シグナル伝達に關与するセリン / スレオニン・プロテインキナーゼを指す。Blume - Jensen ら (2001), *Nature* 411 (6835) : 355 - 365 . セリン / スレオニン・プロテインキナーゼ活性を測定する、実例となる技術は、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel ら監修 (Wiley & Sons, ニューヨーク (1988) および四半期の改訂) に示される。Akt の活性化は、タンパク質の活性化されたリン酸化型に關してイムノプロットすることによって、アッセイ可能である。Akt に対する抗体 (Ser473) は *Cell Signaling Technology* (マサチューセッツ州ビバリー) から入手可能である。さらに、Akt の活性化を評価するためのキットが *Upstate Biotechnology* (ニュー 40
 ヨーク州レークブラシッド) から入手可能である。

【 0 0 2 6 】

「アミノ酸」は、20 の天然存在アミノ酸いずれかとともに、修飾アミノ酸配列いずれかも指す。修飾には、翻訳後プロセッシングなどの天然プロセスが含まれることも可能であるし、または当該技術分野に知られる化学的修飾が含まれることも可能である。修飾には、限定されるわけではないが：リン酸化、ユビキチン化、アセチル化、アミド化、グリコシル化、フラビンの共有結合、ADP リボシル化、架橋、ヨウ素化、メチル化等が含まれる。

【 0 0 2 7 】

「抗体」は、本明細書において、最も広い意味で用いられ、そして具体的に、天然およ 50

び遺伝子操作、モノクローナルおよびポリクローナル、一本鎖および二本鎖、キメラ、ヒト化、二特異性、ディアボディ (diabody)、および抗原結合活性を保持するこれらの断片が含まれる。断片には Fab、Fc および Fv が含まれる。

【0028】

「アンチセンス」は、標的「センス」ポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列を指す。

「細胞ターゲティング部分」は、細胞にポリペプチドをターゲティングするのに用いる、天然存在であるか、または遺伝子操作したか、いずれかのポリペプチド上のシグナルいずれかを指す。ターゲティング部分には、抗体および受容体リガンドなどの、細胞抗原または受容体に結合するリガンドが含まれる。リガンド/受容体対の具体的な例には、上皮増殖因子 (EGF) および EGF 受容体、抗 PS1 抗体および前立腺癌細胞上に存在する PS1 抗原などが含まれる。多くのこうした細胞特異的リガンド/受容体対が知られ、そして本発明において、例えば ULBP ポリペプチドを標的細胞に搬送するため、融合タンパク質において有用である。

10

【0029】

「相補的」または「相補性」は、ポリヌクレオチド分子中のポリヌクレオチドが、第二のポリヌクレオチド分子中の別のポリヌクレオチドと塩基対形成する能力を指す。例えば、配列 A - G - T は、配列 T - C - A に相補的である。相補性は、部分的であることが可能であり、この場合、塩基対形成にしたがって、ポリヌクレオチドのいくつかのみがマッチし、あるいは、相補性は完全であることも可能であり、この場合、塩基対形成にしたがって、ポリヌクレオチドのすべてがマッチする。

20

【0030】

「発現」は、宿主細胞内で起こる転写を指し、そして場合によって、翻訳を指す。宿主細胞におけるポリヌクレオチド分子の発現レベルは、細胞内に存在する、対応する mRNA の量、または宿主細胞に産生される、DNA 分子がコードするタンパク質の量のいずれかに基づいて測定可能である (Sambrook ら, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.1 - 18.88)。

【0031】

「Fc」または「Fc ポリペプチド」は、Fc 領域の C_Hドメインを 1 以上含有する抗体の Fc 領域の天然型および突然変異型両方を指し、二量体化促進ヒンジ領域を含有する Fc ポリペプチドの一部切除 (truncated) 型が含まれる。例えば、本発明の融合タンパク質には、限定されるわけではないが、IgG1、IgG2、および IgG3 抗体を含む、ヒト IgG 抗体由来の Fc ポリペプチドが使用可能である。PCT 出願 WO 93/10151 (本明細書に援用される) に記載される 1 つの適切な Fc ポリペプチドは、ヒト IgG1 抗体の Fc 領域の N 末端ヒンジ領域から天然 C 末端に渡る一本鎖ポリペプチドである。別の有用な Fc ポリペプチドは、米国特許第 5,457,035 号および Baum ら (1994), EMBO J. 13:3992-4001) に記載される Fc 突然変異タンパク質 (mutain) である。この突然変異タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸 19 が Leu から Ala に変化し、アミノ酸 20 が Leu から Glu に変化し、そしてアミノ酸 22 が Gly から Ala に変化していることを除けば、WO 93/10151 に示される天然 Fc 配列のものと同一である。該突然変異タンパク質は、Fc 受容体に対し、減少した親和性を示す。

30

40

【0032】

「融合タンパク質」は、第二の異種タンパク質に連結された第一のタンパク質を指す。好ましくは、異種タンパク質は、第一のタンパク質および第二のタンパク質がインフレームで発現されるように、遺伝子操作技術を介して融合される。異種タンパク質は、融合タンパク質に、所望の特性、例えば検出シグナル、細胞におけるタンパク質の安定性増進または安定化、タンパク質のオリゴマー化の促進、融合タンパク質精製の促進、所望の細胞または組織へのターゲティング、あるいは例えば免疫エフェクター細胞の活性化などのさ

50

らなる生物学的活性を与えることが可能である。本発明の融合タンパク質に有用な異種タンパク質の例には、免疫グロブリン分子およびその一部、ヒスチジンタグ(6-His)などのペプチドタグ、ロイシンジッパー、サイトカイン、増殖因子、細胞ターゲティング部分、シグナルペプチド、療法剤等が含まれる。

【0033】

「遺伝子操作された」は、標的タンパク質を、上昇したレベルで、低下したレベルで、または突然変異型で発現する真核宿主細胞を生成するのに用いられる組換えDNA法またはRNA法いずれかを指す。言い換えると、組換えポリヌクレオチド分子が宿主細胞に導入され、それによって所望のタンパク質の発現を改変するように細胞が改変されている。宿主細胞を遺伝子操作する方法およびベクターが当該技術分野に周知であり；例えば多様な技術が、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubelら監修(Wiley & Sons, ニューヨーク, 1988, および四半期の改訂)に例示されている。遺伝子操作技術には、限定されるわけではないが、発現ベクター、ターゲティング化相同組換えおよび遺伝子活性化(例えばChappelに対する米国特許第5,272,071号を参照されたい)および操作した転写因子によるトランス活性化(例えばSegalら, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* 96(6):2758-63を参照されたい)が含まれる。

10

【0034】

「相同性」は、ポリヌクレオチド分子間のハイブリダイゼーションの有効性および強度に対して有意な影響を有する、ポリヌクレオチド間の相補性の度合いを指す。

20

単数または複数の「宿主細胞」は、異種ポリヌクレオチド分子を発現している細胞を指す。本発明の宿主細胞は、ULBP4をコードするポリヌクレオチドを発現するか、または細胞がULBP4に反応するのを可能にする受容体を発現する。本発明で有用な適切な宿主細胞の例には、限定されるわけではないが、昆虫および哺乳動物細胞が含まれる。こうした細胞の特定の例には、SF9昆虫細胞(SummersおよびSmith, 1987, *Texas Agriculture Experiment Station Bulletin*, 1555)、ヒト胚性腎細胞(293細胞)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(Puckら, 1958, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60:1275-1281)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA) (ATCC CCL 2)、ヒト肝臓細胞(Hep G2) (ATCC HB 8065)、ヒト乳癌細胞(MCF-7) (ATCC HTB 22)、ヒト結腸癌細胞(DLD-1) (ATCC CCL 221)、Daudi細胞(ATCC CRL-213)、CV-1細胞等が含まれる。

30

【0035】

「ハイブリダイゼーション」は、アニーリング期中の相補的ポリヌクレオチドの対形成を指す。2つのポリヌクレオチド分子間のハイブリダイゼーション強度は、2つの分子間の相同性、関与する条件のストリンジェンシー、形成されるハイブリッドの融解温度、およびポリヌクレオチド内のG:C比によって影響を受ける。

【0036】

ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Sambrook, J., E.F. Fritsch, およびT. Maniatis ((1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 第9章および第11章)および*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubelら監修, John Wiley & Sons, Inc, セクション2.10および6.3-6.4)に示されている。これらのパラメーターおよび適切な条件は、例えばポリヌクレオチドの長さおよび/または塩基組成に基づいて、当業者によって容易に決定可能である。ハイブリダ

40

50

イゼーション条件は、中程度のまたは高いストリンジェンシーのものであることが可能である。例えば、ストリンジェントな条件には、5 x SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) を含有する前洗浄溶液、約50%ホルムアミド、6 x SSCのハイブリダイゼーション緩衝液、およびRNA-RNAハイブリダイゼーションには、約55のハイブリダイゼーション温度(またはDNA-DNAハイブリダイゼーションには、約42のハイブリダイゼーション温度を伴う、約50%ホルムアミド)、並びに約60、0.5 x SSC、0.1% SDS中の洗浄条件が含まれることが可能である。一般的に、高ストリンジェントな条件は、上記のようなハイブリダイゼーション条件であるが、およそ68、0.2 x SSC、0.1% SDSでの洗浄を伴うと定義される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液において、SSPE (1 x SSPEは、0.15 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄、および1.25 mM EDTA, pH 7.4である)をSSC (1 x SSCは、0.15 M NaClおよび15 mMクエン酸ナトリウムである)の代わりに使用することが可能である; 洗浄はハイブリダイゼーション完了後、15分間行う。当業者に知られるように、そして以下にさらに記載するように、必要に応じて、所望の度合いの反応および二重鎖安定性を達成するよう、洗浄温度および洗浄塩濃度を調整可能であることを理解すべきである。

10

【0037】

核酸が、未知の配列の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする場合。既知の配列の核酸がハイブリダイズする場合、ハイブリッド長は、核酸の配列を並列し、そして最適配列相補性の単数または複数の領域を同定することによって、決定可能である。長さ50塩基対未満であると予測されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、該ハイブリッドの融解温度(T_m)より5~12低くあるべきであり、T_mは、以下の等式にしたがって決定する。長さ18塩基対未満のハイブリッドに関しては、 $T_m(\text{°C}) = 2(A + T \text{塩基数}) + 4(G + C \text{塩基数})$ である。長さ18塩基対を超えるハイブリッドに関しては、 $T_m(\text{°C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10}[Na^+]) + 0.41(\%G + C) - (600/N)$ であり、式中、Nはハイブリッド中の塩基数であり、そして[Na⁺]はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオン濃度である(1 x SSCの[Na⁺] = 0.165 M)。

20

【0038】

「同一性」は、核酸またはアミノ酸分子の対間の比較を指す。配列同一性を決定する方法が知られる。典型的な好ましいコンピュータプログラムは、遺伝学コンピュータグループ(GCG; ウィスコンシン州マディソン) ウィスコンシンパッケージ、バージョン10.0プログラム、「GAP」(Devereuxら, 1984, Nucl. Acids Res. 12:387; SmithおよびWaterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482-489)である。「GAP」プログラムの好ましいデフォルトパラメーターには:(1)ヌクレオチドに関する単一(unary)比較マトリックス(同一に対し1および非同一に対し0の値を含む)のGCG実行、およびSchwartzおよびDayhoff監修, Atlas of Polypeptide Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp.353-358, 1979に記載されるような、GribskovおよびBurgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986の加重アミノ酸比較マトリックス; または他の匹敵する比較マトリックス;(2)アミノ酸配列の各ギャップに対する30のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに1のペナルティ、またはヌクレオチド配列の各ギャップに対する50のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに3のペナルティ;(3)末端ギャップに対するペナルティなし; および(4)長いギャップに対する最大ペナルティなし、が含まれる。

30

40

【0039】

「単離された」は、通常会合している、少なくとも1つの混入物質(ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)から分離されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。

50

例えば、単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、天然に見られるものとは異なる背景にあるか、または異なる形である。

【0040】

「JAK2」は、とりわけ、サイトカイン受容体サブユニットと複合体を形成し、転写のシグナル伝達物質および活性化因子(S T A T)のシグナル伝達経路を調節し、そして標的細胞内の代謝事象を制御するのに関与することが知られる、チロシンキナーゼのヤヌス・ファミリー(Janus family)のメンバーを指す(Carter - Suら, 1998, Recent Prog. Horm. Res. 53:61-83)。チロシンキナーゼ活性を測定するための実例となる技術は、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら監修(Wiley & Sons, ニューヨーク, 1988, および四半期の改訂)に見られる。

10

【0041】

「核酸配列」は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列を指す。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、ポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。したがって、デオキシリボヌクレオチド配列は、アミノ酸配列をコードする。

【0042】

「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドの直鎖配列を指す。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、またはデオキシリボヌクレオチド、あるいは両方の混合物であることが可能である。本発明の背景におけるポリヌクレオチドの例には、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖または二本鎖RNA、並びに一本鎖および二本鎖DNAおよびRNAの混合物を有するハイブリッド分子が含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、1以上の修飾ヌクレオチドを含有することが可能である。

20

【0043】

「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」は交換可能に用いられ、アミノ酸ポリマー、あるいは2以上の相互作用するかまたは結合するアミノ酸ポリマーの組を示す。

【0044】

「精製する」、または「精製された」は、混入タンパク質を少なくとも5~10%含まない標的タンパク質を指す。混入タンパク質からのタンパク質の精製は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含む、既知の技術を用いて達成可能である。多様なタンパク質精製技術がCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら監修(Wiley & Sons, ニューヨーク, 1988, および四半期の改訂)に例示される。

30

【0045】

「選択可能マーカー」は、組換えDNAまたはRNA事象を経験している細胞を同定するマーカーを指す。選択可能マーカーには、例えば、メトトレキセートに対する耐性を与えるDHFRタンパク質(Wiglerら(1980), Proc Natl Acad Sci USA 77:3567-3570; O'Hareら(1981), Proc Natl Acad Sci USA, 78:1527-1531)、ミコフェノール酸に対する耐性を与えるGPTタンパク質(Mulligan & Berg(1981), Proc Natl Acad Sci USA, 78:2072-2076)、アミノ配糖体G-418に対する耐性を与えるネオマイシン耐性マーカー(Calberre-Garapinら(1981), J Mol Biol 150:1-14)、ハイグロマイシンに対する耐性を与えるHygroタンパク質(Santerreら(1984), Gene 30:147-156)、およびゼオシンTM耐性遺伝子

40

50

マーカー (Invitrogen) などの代謝拮抗剤耐性をコードする遺伝子が含まれる。さらに、単純疱疹ウイルス・チミジンキナーゼ、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を、それぞれ、tk⁻、hgprt⁻およびaprt⁻細胞で使用することが可能である。

【0046】

「STAT5」は、JAKキナーゼによって活性化され、核に転位置し、そして特定のDNA部位への結合によって転写制御に関与することが知られる転写因子の、転写のシグナル伝達物質および活性化因子 (STAT) ファミリーのメンバーを指す。STAT5活性を測定するための実例となる技術は、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら監修 (Wiley & Sons, ニューヨーク, 1988, および四半期の改訂) に例示されるような、DNA結合アッセイ、STAT5依存レポーターアッセイ、STAT5の³²P標識等を含む、いくつかの周知の技術のいずれかを通じて達成可能である。

10

【0047】

「ストリンジェンシー」は、ポリヌクレオチド間のハイブリダイゼーションが起こる条件 (温度、イオン強度、溶媒など) を指す。高ストリンジェンシー条件下で行われるハイブリダイゼーション反応は、高い度合いの相補的塩基対形成 (85% ~ 100% 同一性) を有するポリヌクレオチド分子間でのみ起こるのであるものである。中程度のストリンジェンシー条件下で行われるハイブリダイゼーション反応は、中程度の度合いの相補的塩基対形成 (50% ~ 84% 同一性) を有するポリヌクレオチド分子間で起こるのであるものである (Sambrook, J., E. F. Fritsch, および T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 第9章および第11章; および Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら監修, John Wiley & Sons, Inc., セクション 2.10 および 6.3 - 6.4)。

20

【0048】

「ULBP」は、N末端シグナル配列、中央に位置するアルファ-1およびアルファ-2ドメイン、並びにC末端細胞膜会合ドメインを含む特徴的な編成を有するMHCクラスI関連分子のファミリーを指す (表3)。ULBPファミリーメンバーは、エフェクター細胞受容体、NKGD/DAP10のリガンドであり、そしてNK細胞を活性化することが知られる。本明細書において、「ULBPポリペプチド」には、活性変異体およびNK細胞活性化活性を有する断片が含まれる。ULBPファミリーメンバーは、JAK2、STAT5、ERK MAPキナーゼ、およびAkt/PKBを活性化することによって、NK細胞に対するその影響の少なくともある程度を誘発するようである (Sutherlandら, June 2001, Immunol. Rev. 181: 185 - 192)。

30

【0049】

「変異体」は本明細書において、参照分子と異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチド分子を意味する。変異体には、参照ポリペプチドと比較した際、生じる変異体ポリペプチド中にアミノ酸置換、欠失、融合、または一部切除を生じるヌクレオチド変化が含まれることが可能である。本明細書において、「スプライシング変異体」は、前駆体ポリヌクレオチドの選択的スプライシングを通じて産生されて、前駆体ポリヌクレオチド配列の別個の部分が除去された転写物を生じるポリヌクレオチドを指す。

40

【0050】

「ベクター」、「染色体外ベクター」または「発現ベクター」は、第二のポリヌクレオチド分子、例えば外来 (foreign) ポリヌクレオチドまたは異種ポリヌクレオチドが挿入されていることも可能である、通常、二本鎖の、第一のポリヌクレオチド分子を指す。異種ポリヌクレオチド分子は、宿主細胞中に天然に見られる可能性もあるし、または

50

見られない可能性もあり、そして例えば宿主ゲノムに天然に存在する異種ポリヌクレオチドの1以上のさらなるコピーであることも可能である。ベクターは、外来ポリヌクレオチド分子を適切な宿主細胞に輸送するために適応させる。ひとたび宿主細胞に入ると、ベクターは、宿主細胞染色体に組み込み可能でありうる。ベクターは、場合によって、組み込まれたポリヌクレオチド分子とともに、トランスフェクションDNAからmRNAの転写を促進する要素およびmRNAからタンパク質の翻訳を促進する要素を含有する、細胞を選択するためのさらなる要素を含有することが可能である。本発明の方法に有用なベクターの例には、限定されるわけではないが、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、レトロウイルス、および人工染色体が含まれる。

【0051】

ULBPファミリー

ULBPリガンドファミリーは、腫瘍組織および免疫組織を含む、広い範囲の細胞、組織、および腫瘍上に発現される、細胞表面受容体群である(Cosmanら、2001、上記)。ULBP1、ULBP2、およびULBP3は、55%~60%のアミノ酸配列同一性を共有し、そして他のMHCクラスI関連細胞表面タンパク質同様、アルファ-1およびアルファ-2構造ドメインを所持する。伝統的なMHCクラスI関連細胞表面タンパク質とは異なり、ULBPは、アルファ-3ドメインを欠き、そしてしたがって、ベータ-2ミクログロブリンと会合しない。膜を貫通して結合したMHCクラスIタンパク質と比較すると、ULBP1、ULBP2、およびULBP3は各々、細胞膜にグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)連結されている。ULBPは、免疫エフェクター細胞活性、特にNK細胞およびT細胞活性の修飾に関与する、MHCクラスI関連リガンドファミリーである。ULBPタンパク質は、すべてではないが、多くの腫瘍細胞株および多様な組織由来の細胞上に発現されている。Cosmanら、上記。感染によって、NKG2Dリガンドの発現が上方制御されうる。例えば、細菌感染によって、NKG2Dリガンド、MICAの発現が上方制御されうる。Dasら(2001), *Immunity* 15:83-93; Tiengら(2002), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(5):2977-82. ULBP類は、MHCクラスI抗原に類似であるが、非伝統的MHCクラスI関連抗原、MICAおよびMICBに類似の、免疫監視における機能を有する。可溶性三量体型のULBP1、ULBP2、またはULBP3でNK細胞を処理すると、NK細胞によるIFN-ガンマ、GM-CSF、TNF-アルファ、TNF-ベータ、並びにケモカインMIP1-アルファ、MIP1-ベータ、およびI-309の産生が刺激される(Cosman(2001), *Immunity* 14:123-133、Kubinら、上記)。さらに、ULBPファミリーメンバーとIL-12を組み合わせると、GM-CSFおよびTNF-ベータ産生をさらに追加する効果、並びにI-309産生に対する強い相乗効果を有する。

【0052】

ULBPファミリーメンバーは、NK細胞に優勢な刺激シグナルを伝達し、NKが発現するKIR類へのMHCクラスIの結合によって生成される阻害性シグナルを克服する。ULBPファミリーメンバーは、NK細胞活性化の中心的な作用因子であり、そしてNKG2D/DAP10受容体複合体を有する他の免疫細胞、例えばT細胞および活性化マクロファージを刺激するのに関与する。最終的に、ULBPタンパク質は、免疫エフェクター細胞、例えばNK細胞を刺激して、細菌、ウイルスに感染した細胞、および腫瘍細胞を排除するとともに、NK細胞を刺激して、他の免疫系のエフェクター細胞を活性化させるサイトカインおよびケモカインを産生することを標的とする療法および治療に有用である。例えば抗ULBP抗体、非活性ULBP断片、ULBPオリゴマー、またはULBPの阻害性類似体(analog)による、ULBP発現またはNKG2D受容体の結合の阻害は、NK細胞活性化を阻害可能である。NK細胞活性化の阻害は、例えば臓器移植に対する免疫反応を減少させるのに、そして自己免疫疾患の治療に療法的に有用である。

【0053】

ULBP4

10

20

30

40

50

以下の実施例により完全に記載されるように、新規ULBPファミリーメンバーであるULBP4が、今や、単離され、そして精製されてた。ULBP4の予測されるアミノ酸配列(配列番号2)は、ULBPタンパク質ファミリーに特徴的な編成を有する。ULBP1、ULBP2、およびULBP3同様、ULBP4ポリペプチドは、シグナル配列、中央に位置するアルファ-1およびアルファ-2ドメイン、並びにC末端膜会合モチーフを所持する。天然ULBP4は、ULBP1、ULBP2、およびULBP3に見られるGPIドメインでなく、膜貫通結合ドメインを含有する。ULBP1、ULBP2、およびULBP3同様、ULBP4ポリペプチドは、伝統的なMHCクラスI分子に見られるアルファ-3ドメインを欠く。ULBP4は、以下に示すように、既知のULBPリガンドにも結合する(実施例3を参照されたい)。これらの構造的特徴および機能的特徴によって、ULBP4はULBPタンパク質ファミリーメンバーと同定される。 10

【0054】

ULBPポリペプチドは、多くの標的細胞上に発現され、そしてNK細胞とともに、CD8⁺ T細胞およびT細胞などの他の免疫系のエフェクター細胞上に位置するNKG2D/DAP10受容体複合体に結合し、そして該複合体を活性化する。NKG2D/DAP10複合体にULBPが結合すると、JAK2、STAT5、ERK MAPキナーゼ、およびAktシグナル伝達経路が活性化される(Sutherlandら(2001)、上記)。これらの経路の活性化の結果、NK細胞が活性化される。最終的に、ULBPがNK細胞を活性化すると、ULBP発現細胞に対するNK細胞の細胞毒性が刺激される。さらに、ULBPがNK細胞を刺激してサイトカインおよびケモカインを産生させ、これによってウイルス感染に対する免疫反応および腫瘍監視が増強される(Cosmanら、2001、上記)。ULBPファミリーの他のメンバー同様、本発明の新規ULBP4は、NK細胞刺激性受容体複合体であるNKG2D/DAP10に結合する。ULBP4は、NK細胞、T細胞、およびマクロファージを含む、免疫エフェクター細胞上のNKG2D受容体への結合を介して、エフェクター細胞に刺激シグナルを提供して、サイトカインおよびケモカインの産生を誘導し、そして特に腫瘍細胞および感染した細胞の、標的細胞殺傷を誘導する。 20

【0055】

ULBP4ポリペプチド

本発明のULBP4ポリペプチドには、以下の実施例1に示すようなアミノ酸配列(配列番号2)を有する単離ポリペプチドとともに、配列番号2のアミノ酸配列に実質的な同一性を有し、そしてUL16および/またはNKG2D受容体に対する結合などの、ULBPタンパク質の機能活性のいずれかを保持する、断片を含む変異体および誘導体が含まれる。ULBPポリペプチド活性は、例えば、以下の実施例3に記載するように、ULBPの変異体、誘導体、または断片を結合アッセイに供することによって、容易に測定可能である。 30

【0056】

以下の実施例2、表3に示すように、単離ULBP4ポリペプチドには、Met1で始まり、そしてAla23~Ser32の範囲のアミノ酸、場合によってGly30で終結すると予測されるアミノ酸配列を有する、シグナルペプチドとして機能する、N末端疎水性領域が含まれる。タンパク質の残りは、配列番号2のほぼHis31、または配列番号2のLeu24~Ser32の別のアミノ酸で始まり、そしてほぼAsp116まで伸長するアミノ酸配列を有するアルファ-1ドメイン；その後、ほぼアミノ酸Pro117で始まり、そしてほぼThr207まで伸長するアルファ-2ドメイン；そしてその後、ほぼアミノ酸Trp227で始まり、そしてほぼアミノ酸Trp248まで伸長する膜貫通ドメイン、その後、C末端テールを含有する。ULBP1~3は、予測される膜貫通ドメインを持たないが、その代わりに、結合したGPIを介して、これらの分子を細胞膜に連結する、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーシグナルモチーフを有する。ULBP4の誘導体には、例えば、グリコシル基、ポリエチレングリコール(PEG)基、脂質、リン酸、アセチル基等の他の化学部分との共有結合または凝集結合によっ 40 50

て修飾された U L B P 4 ポリペプチド、および末端欠失を有する U L B P 4 ポリペプチドが含まれる。

【0057】

本発明の U L B P 4 ポリペプチドのアミノ酸配列は、上記の表 1 および配列番号 2 に示す U L B P 4 アミノ酸配列に、場合によって、少なくとも約 92% 同一、少なくとも約 93% 同一、少なくとも約 94% 同一、少なくとも約 95% 同一、少なくとも約 96% 同一、少なくとも約 97% 同一、少なくとも約 98% 同一、または少なくとも約 99% 同一である。相同性（上記定義を参照されたい）とも称する同一性パーセントは、例えば Smith および Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482-489 のアルゴリズムを用いる、GAP プログラム（ウィスコンシン配列解析パッケージ、UNIX（登録商標）用バージョン 8、遺伝学コンピュータグループ（GCG）, University Research Park、ウィスコンシン州マディソン）などの、この目的に一般的に使用されるコンピュータプログラムいずれかを用いて、2 つのポリペプチド配列を比較することによって、容易に決定可能である。「GAP」プログラムの好ましいデフォルトパラメーターには：（1）Schwartz および Dayhoff 監修, Atlas of Polypeptide Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979 に記載されるような、Gribskov および Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986 の加重アミノ酸比較マトリックス、または他の匹敵する比較マトリックス；（2）アミノ酸配列の各ギャップに対する 30 のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに 1 のペナルティ；（3）末端ギャップに対するペナルティなし；および（4）長いギャップに対する最大ペナルティなし、が含まれる。配列比較の当業者に用いられる他のプログラムもまた、使用可能である。

10

20

【0058】

本発明の U L B P ポリペプチドは、好ましくは、単離型、そして好ましくは実質的に精製された型で提供される。例えば、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、および/または高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）を含む、既知の方法によって、組換え細胞培養からポリペプチドを回収し、そして精製することが可能である。

30

【0059】

変異体

本発明の範囲内の U L B P ポリペプチド変異体は、保存的置換アミノ酸を含有することが可能であり、つまり、ポリペプチドの二次構造および/または三次構造を改変しないアミノ酸によって、1 以上のアミノ酸を交換可能である。こうした置換には、1 つの脂肪族残基（Ile、Val、Leu、または Ala）の別のものでの置換、または塩基性残基 Lys および Arg、酸性残基 Glu および Asp、アミド残基 Gln および Asn、ヒドロキシル残基 Ser および Tyr、または芳香族残基 Phe および Tyr 間の置換などの、類似の物理化学特性を有する残基による、アミノ酸の交換が含まれることが可能である。表現型的にサイレントであるアミノ酸交換は、Bowle ら（（1990）, Science 247: 1306-1310）により完全に記載される。さらに、機能する U L B P 4 ポリペプチド変異体には、タンパク質の機能領域の外、例えばアルファ - 1 およびアルファ - 2 ドメインの外に、アミノ酸置換、欠失、またはアミノ酸配列への付加を有するものが含まれる。

40

【0060】

U L B P 1、U L B P 2、U L B P 3、および U L B P 4 を並列させ、4 つのタンパク質すべてに共通のアミノ酸を明らかにすることが可能である。以下の表 3 を参照されたい。当業者は、類似の生物学的機能および類似の全体構造を持つタンパク質の間で保存され

50

るアミノ酸は、保存されないアミノ酸よりも生物学的機能のために重要である可能性がより高いと認識するであろう。こうした保存アミノ酸の例には、例えば、ULBP4配列の44、49、50、61、62、64、77、84、87、および94位が含まれる。以下の表3を参照されたい。したがって、非保存残基の改変、特に保存的改変は、保存残基の改変よりも、生物学的に機能する変異体を産生する可能性がより高い。さらに、実質的にULBP4の三次元構造の障害となると予測される改変はまた、生物学的機能の障害となる可能性も高いであろう。したがって、実質的にULBP4の予測される三次元構造の障害とならない、非保存アミノ酸の改変は、生物学的に機能する変異体を産生する可能性が最も高い。三次元構造は、タンパク質データバンクの構造的代表上にクエリーアミノ酸配列を重ねるタンパク質スレッディングプログラムを用いてアミノ酸配列を解析すること

10

【0061】

ULBP4ポリペプチドのアミノ酸配列の修飾は、いくつかの既知の技術のいずれによっても達成可能である。例えば、オリゴヌクレオチド指示突然変異誘発によって、特定の位置に突然変異を導入可能である(Walderら(1986), Gene 42:133-139; Bauerら(1985), Gene 37:73-81; Smithら, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, (1981); 並びに米国特許第4,518,584号; および米国特許第4,737,462号)。

20

【0062】

ULBP4ポリペプチドは、変異体および断片を含めて、長さ少なくとも20アミノ酸、場合によって、長さ少なくとも30、40、50、60、70、80、100、120、130、140、160、180、200、または220アミノ酸であることが可能である。

【0063】

ULBP1、ULBP2、ULBP3、および/またはULBP4断片、変異体、および/または融合タンパク質を含むULBPタンパク質のいくつかの型は、ULBPアンタゴニストでありうる可能性がある。こうしたULBPアンタゴニストは、正常な活性化するULBPタンパク質の影響を遮断または阻害することが可能である。例えば、ULBPタンパク質のアンタゴニスト型は、NK細胞を活性化可能なULBPタンパク質による、免疫エフェクター細胞の活性化を遮断または阻害可能である。こうしたアンタゴニストは、NKG2Dへの結合から通常生じる炎症性シグナルが発生しないような方式で、NKG2Dに結合することによって、機能しうる。こうした結合したアンタゴニスト性ULBPタンパク質は、NKG2Dへの他の活性化リガンドのアクセスを遮断し、こうしてこれらのリガンドの影響の阻害を生じる。あるいは、ULBPタンパク質のアンタゴニスト型は、NKG2Dに結合し、そしてそれによって免疫エフェクター細胞を活性化することなく、NKG2Dのインターナリゼーションを引き起こすことによって、ULBPタンパク質による免疫エフェクター細胞活性化を遮断または阻害することが可能である。

30

40

【0064】

融合タンパク質

ULBP4ポリペプチドの変異体および誘導体には、例えば可溶性ULBP4ポリペプチドとともに、ULBP4ポリペプチド(ULBP4断片および変異体を含む)および異種ポリペプチドで形成される融合タンパク質が含まれる。異種ポリペプチドには、ULBP4ポリペプチドの精製、オリゴマー化、安定、または分泌を容易にするものが含まれる。他の異種ポリペプチドには、細胞または組織へのULBP4の搬送を促進するターゲティング部分、および例えば免疫エフェクター細胞を誘引または活性化することによって、免疫エフェクター細胞反応を促進するポリペプチド部分が含まれる。

50

【0065】

本発明の融合タンパク質は、異種ポリペプチドに連結されたULBPポリペプチドを含有する。異種ポリペプチドは、安定、検出、ターゲティング等の機能的特性を融合タンパク質に与えることが可能である。

【0066】

ULBP4ポリペプチドを異種ポリペプチドに融合させて、精製を容易にすることが可能である。入手しうる多くの異種ペプチド(ペプチドタグ)が、結合パートナーへの融合タンパク質の選択的結合を可能にする。ペプチドタグの限定されない例には、6-His、チオレドキシン、赤血球凝集素、GST、およびOmpAシグナル配列タグが含まれる。異種ペプチドを認識し、そして該ペプチドに結合する結合パートナーは、いかなる分子または化合物であることも可能であり、これらには、金属イオン(例えば金属アフィニティークラム)、抗体、抗体断片、あるいは異種ペプチドに優先的に結合して融合タンパク質の精製を可能にするタンパク質またはペプチドいずれかが含まれる。

10

【0067】

ULBP4ポリペプチドを修飾して、ULBP4オリゴマーの形成を促進することが可能である。例えば、ULBP4ポリペプチドを、例えばロイシンジッパーなどのオリゴマー化を促進するペプチド部分、および特定の抗体断片ポリペプチド、例えばFcポリペプチドに融合させることが可能である。ペプチド部分は、別のタンパク質と融合させた際に、二量体、三量体、および/またはより高次のオリゴマーの形成を引き起こすならば、オリゴマー化を促進する。これらの融合タンパク質を調製するための技術が知られ、そして例えばWO 99/31241およびCosmanら((2001), Immunity 14:123-133)に記載される。Fcポリペプチドへの融合は、プロテインAまたはプロテインGカラム上のアフィニティークロマトグラフィーによる精製を容易にするというさらなる利点を提供する。ロイシンジッパー(LZ)、例えばしばしば4または5のロイシン残基に他のアミノ酸残基が点在している反復7アミノ酸反復への融合が、Landschultzら((1988), Science, 240:1759)に記載されている。

20

【0068】

ULBP1、ULBP2、ULBP3、および/またはULBP4を含むULBPポリペプチドは、ターゲティング化細胞搬送のために修飾可能である。例えば、ULBPポリペプチドを、Her2、CEA、MUC-1等の特異的腫瘍細胞抗原、またはCDなどのウイルスに感染した細胞の特異的抗原に結合するリガンドに融合させることが可能である。リガンドは、例えば、細胞抗原に特異的に結合する抗体、例えば抗Her2抗体等であることが可能である。ULBP1、ULBP2、ULBP3、またはULBP4ポリペプチドなどのULBPポリペプチド、および特異的腫瘍細胞抗原に結合するリガンドを含んでなる分子は、NKGD2を発現している細胞の化学誘引物質および/または活性化因子として作用しうるサイトカインを、さらに含んでなることが可能である。こうした分子は、腫瘍細胞にNKGD2発現細胞を誘引して、そしてNKGD2発現細胞の細胞溶解活性を増加させることが可能である。例えば、ULBPポリペプチド、腫瘍細胞特異的抗原に結合する抗体、およびIL-15を含んでなる融合タンパク質は、ULBPポリペプチドおよびIL-15両方を介して、NK細胞を刺激して、腫瘍細胞を殺すことが可能である。

30

40

【0069】

本発明の融合タンパク質にはまた、療法剤に連結された抗ULBP抗体(本明細書に定義されるようなもの)を含有するものも含まれる。この態様において、抗ULBP抗体は、ULBPを発現している細胞に、付着した療法剤を搬送する細胞ターゲティング部分として働く。こうした融合タンパク質は、例えば、細胞毒等を、腫瘍細胞およびウイルスに感染した細胞に搬送するのに有用である。

【0070】

断片

50

ULBP4を含むULBPの有用な断片は、NKGD2D受容体に結合する能力および/またはNK細胞を活性化する能力など、十分なULBP活性を有するポリペプチドである。例えば、膜貫通ドメインを欠く断片は、ULBPポリペプチドを可溶性にし、そして活性を保持する。可溶性ULBP4ポリペプチドは、例えば、膜貫通ドメイン、表2および配列番号2に示すアミノ酸配列Trp227~Trp248のすべてまたは一部を欠失させることによって、産生可能である。こうした断片は、配列番号2のアミノ酸1~アミノ酸35の位で始まり、そして配列番号2のアミノ酸207~アミノ酸224の間で終わる可能性がある。場合によって、こうした断片は、アミノ酸207~218の間で、場合によってアミノ酸217で終わる。断片は、配列番号2のほぼアミノ酸31または32で始まり、そして配列番号2のほぼアミノ酸217で終わる可能性がある。こうした断片の組

10

【0071】

ULBP4ポリペプチドの断片を用いて、例えば、特異的抗ULBP4抗体を生成可能である。既知の選択技術を用いて、特異的エピトープを選択し、そしてこれを用いて、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を生成することが可能である。こうした抗体は、ULBP4活性をアッセイするのに有用性を有するとともに、ULBP4がNKGD2D受容体を活性化し、そしてNKGD2Dを発現している細胞の免疫エフェクター細胞活性を活性化するのを遮断または阻害するのに有用性を有する。こうした抗ULBP4抗体を用いて、細胞毒または放射性同位体などの療法剤を、腫瘍細胞などのULBP4発現細胞に

20

【0072】

抗体

本発明のポリペプチドを、全体でまたは部分的に用いて、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作成することが可能であり、該抗体は、ULBP4ポリペプチド発現を検出するための診断アッセイにおいて、ULBP4ポリペプチドの分子作用を特徴付ける試薬ツールとして、ULBP4タンパク質を産生する商業的過程の品質管理アッセイにおいて、および/または療法剤として有用である。抗ULBP4抗体は、ULBP4タンパク質に特異的に結合可能である。結合特異性は、競合的置換を含むいくつかの方法で試験可能である。例えば、非放射性ULBP4タンパク質は、特異的に結合する抗ULBP4抗体に結合した放射性ULBP4を置換することが可能であるが、ULBP4に特異的に結合する抗ULBP4抗体に特異的に結合しない非放射性タンパク質は、該放射性ULBP4を置換不能である。対照的に、放射性ULBP4タンパク質と組み合わせた関連しないタンパク質は、特異的に結合する抗ULBP4抗体が結合した放射性ULBP4の量にほとんど影響を持たない可能性がある。ULBP4を含むULBPポリペプチドに対する抗体は、例えば自己免疫疾患、腫瘍、感染、および炎症性腸疾患などの不適切な炎症によって特徴付けられる疾患の治療のための療法剤として有用である可能性がある。ULBP4ポリペプチドの全体または一部を用いて、抗体を生成することが可能である。特に、ULBP4ポリペプチドのユニークなエピトープを含有するポリペプチド、例えばULBP4のC末端の15アミノ酸を、慣用的な技術を用いた抗体調製に使用することが可能である

。ペプチドエピトープの選択法および抗体産生法が知られる。例えばAntibodies: A Laboratory Manual, HarlowおよびLand(監修), 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennetら(監修), 1980, Plenum Press, ニューヨークを参照されたい。1つの態様において、抗ULBP4抗体を療法剤(例えば毒素および/または放射性化合物など)に融合させて、ULBP4発現細胞への剤の搬送を促進することが可能である。いくつかの抗ULBP4抗体は、ULBP4およびNKGD2D間の相互作用に干渉するか、またはこうした相互作用をアン

30

40

50

タゴナイズすることが可能である。こうした抗体は、例えば、ULBP4を発現する細胞によるかまたは可溶性ULBPポリペプチドによる、NK細胞、T細胞、および/またはマクロファージが仲介する細胞毒性の増進を阻害することが可能である。こうした抗体を、本明細書において、アンタゴニスト性抗体と称する。こうした抗体は、自己免疫疾患を治療する療法剤として特に適切である可能性がある。他の抗ULBP4抗体は、ULBP4およびNKGD2間の相互作用と干渉することなく、ULBP4に結合しうる。

【0073】

エピトープが単離されていてもまたはポリペプチドの一部のままであっても、本発明のポリペプチドのエピトープによって、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体がどちらも誘発可能であり、そして慣用的技術によって、調製可能である。例えば、*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennetら(監修), (1980) Plenum Press, ニューヨーク; *Antibodies: A Laboratory Manual*, HarlowおよびLand(監修), (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー; KohlerおよびMilstein, 米国特許第4,376,110号; 「ヒトB細胞ハイブリドーマ技術」(Kozborら(1984), *J. Immunol.* 133:3001-05; Coleら(1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-30; および「EBVハイブリドーマ技術」(Coleら, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96(1985))を参照されたい。本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図される。こうしたハイブリドーマは、慣用的技術によって産生しそして同定することが可能である。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、*in vitro* または*in vivo*で培養可能である。こうしたモノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、およびそのいかなるサブクラスも含む、いかなる免疫グロブリンクラスのものであることも可能である。

【0074】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を共にスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術(Takedaら(1985), *Nature* 314:452-454; Morrisonら(1984), *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851-6855; Boulianneら(1984), *Nature* 312:643-646; Neubergerら(1985), *Nature* 314:268-70)を用いることが可能である。キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、ブタmAbに由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなどである。

【0075】

本発明のモノクローナル抗体にはまた、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型も含まれる。こうしたヒト化抗体は、既知の技術によって調製可能であり、そして抗体をヒトに投与した際、減少した免疫原性という利点を提供する。キメラおよびさらなる操作モノクローナル抗体の産生法には、Riechmannら((1988), *Nature* 332:323)、Liuら((1987), *PNAS* 84:3439)、Larrickら((1989), *BioTechnology* 7:934)、並びにWinterおよびHarris((1993), *TIPS* 14:139)に記載されるものが含まれる。抗体をヒト化するのに有用な技術はまた、米国特許第6,054,297号に論じられる。

【0076】

トランスジェニック的に抗体を生成する方法、特にトランスジェニック非ヒト動物にお

10

20

30

40

50

いて生成されるヒト抗体は、GB 2, 272, 440、米国特許第5, 569, 825号および第5, 545, 806号、並びに関連特許に見出すことが可能である。好ましくは、ヒトで使用するため、抗体はヒトのものであるかまたはヒト化されており；こうしたヒト抗体またはヒト化抗体を生成する技術もまた周知であり、そして例えばMedarex Inc (ニュージャージー州プリンストン) およびAbgenix Inc. (カリフォルニア州ファームト) から商業的に入手可能である。別の好ましい態様において、ヒト抗体可変ドメインのファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって、ヒトで使用するための完全なヒト抗体を産生する。Vaughanら(1998), Nat Biotechnol. 16(6): 535-539；および米国特許第5, 969, 108号。

10

【0077】

特異的エピトープを認識する抗原結合抗体断片は、既知の技術によって生成可能である。例えば、抗体断片には、限定されるわけではないが、抗体分子のペプシン消化によって産生可能なF(ab')₂断片、およびF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成可能な抗体断片が含まれる。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築し(Huseら(1989), Science 246: 1275-1281)、所望の特異性を持つモノクローナルFab断片の迅速で、有用で、そして容易な同定を可能にする。用語「抗体」は、本明細書において、最も広い意味で用いられ、そして具体的に、天然型および突然変異型両方の、一本鎖モノクローナル抗体、ポリエピトープ特異性を持つ抗体組成物とともに、所望の生物学的活性を示す抗体断片(例えばFab、F(ab')₂、Fv、Fc)が含まれる。1以上のFc領域のC_Hドメインを含有する抗体のFc領域の型は、二量体化促進ヒンジ領域(FcまたはFcポリペプチド)を含有するFcポリペプチドの一部切除型、および特に、ヒトIgG1抗体由来のFcポリペプチドを含めて、本発明のULBP融合タンパク質において有用である。

20

【0078】

一本鎖抗体の産生に関して記載される技術(米国特許第4, 946, 778号；Bird(1988), Science 242: 423-426；Houstonら(1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883；およびWardら(1989), Nature 334: 544-546)を適応させ、ULBP遺伝子タンパク質に対する一本鎖抗体を産生することもまた可能である。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖および軽鎖断片を連結して、一本鎖ポリペプチドを生じることによって形成する。こうした一本鎖抗体はまた、細胞内でも有用である(すなわち細胞内発現抗体(intrabodies)として)可能性があり、例えば、Marascoら((1999), J. Immunol. Methods 231: 223-238)に記載されるように、HIV感染の遺伝子治療に有用である可能性がある。さらに、その後、当業者に周知の技術を用いて、ULBPポリペプチドに対する抗体を利用して、ULBPポリペプチドを「模倣」し、そしてULBPポリペプチドの結合パートナーに結合することが可能な抗イディオタイプ抗体を生成することが可能である(例えばGreenspan & Bona(1993), FASEB J 7(5): 437-444；およびNissinoff(1991), J. Immunol. 147(8): 2429-2438を参照されたい)。こうした抗体はまた、抗ULBP4抗体を検出し、そして定量化する方法にも使用を見出しうる。さらに、こうした抗イディオタイプ抗体は、例えば、NKG2Dに結合可能であり、そしてNKG2Dを発現している免疫エフェクター細胞を活性化する可能性も、また、しない可能性もある。したがって、こうした抗体は、NK細胞、T細胞、および/またはマクロファージを含む、NKG2Dを発現している免疫エフェクター細胞を活性化する可能性があるし、あるいはNKG2Dを介した、こうした細胞の活性化を遮断または阻害する可能性もある。

30

40

【0079】

本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体には、二特異的抗体(すなわち第一の抗原結合ドメインを介して本発明のポリペプチドと免疫反応性であり、そしてまた、第二の

50

抗原結合ドメインを介して異なるポリペプチドとも免疫反応性である抗体)が含まれる。多様な二特異性抗体が調製されており、そして *in vitro* および *in vivo* 両方で有用であることが見出されている(例えば米国特許第5,807,706号;並びに Cao および Suresh (1998), Bioconjugate Chem 9: 635-644 を参照されたい)。さらに、米国特許第5,959,083号に記載されるように、抗体の F(ab')₂ 断片の重鎖をコードする DNA と、第二の F(ab')₂ 分子の重鎖 (C_H1 ドメインが C_H3 ドメインで交換されているもの) をコードする DNA、または抗体の一本鎖 FV 断片をコードする DNA いずれかを融合させることによって、四価二特異性分子が調製可能である。二特異性抗体はまた、米国特許第5,807,706号に記載されるように産生可能である。さらに、2つの可変ドメインを共有結合することによって一本鎖可変断片 (sFv) が調製されてきており; 生じた抗体断片は、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーの長さに応じて、二量体または三量体を形成することが可能である。Kortt ら (1997), Protein Engineering 10: 423-433.

ULBP1、ULBP2、ULBP3、および ULBP4 を含む ULBP タンパク質に結合するペプチボディ (peptibody) などのペプチボディを、本明細書に論じる抗体に関する療法的使用のいずれにおいても、抗体の代わりに使用することが可能である。ペプチボディは WO 01/83525 および WO 00/24782 に記載される。

【0080】

ポリヌクレオチド配列

本発明はまた、上に論じる ULBP4 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子も提供する。本発明の ULBP ポリヌクレオチド分子には、以下の分子が含まれる: 表1 および配列番号1に示す核酸配列を有するポリヌクレオチド分子; 表1 および配列番号1の核酸配列に、非常にまたは中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子; 並びに、表1 および配列番号1の核酸配列であって、特に、Leu24、His31、Ser32、または Leu24~Ser32 の間のアミノ酸いずれかで始まり、そしてほぼ Thr207、His217 または Thr207~His217 のアミノ酸まで伸長するアミノ酸配列を有する ULBP4 ポリペプチドのアルファ-1 およびアルファ-2 ドメインをコードする核酸を含む前記核酸配列と、実質的な核酸配列同一性を有するポリヌクレオチド分子。こうしたポリヌクレオチドには、配列番号1の残基70~残基94で開始し、そして配列番号1の残基621~残基651で終わる領域が含まれる。

【0081】

本発明の有用な ULBP4 ポリヌクレオチド分子は、好ましくは、表1 および配列番号2に示すようなアミノ酸配列を有する ULBP4 ポリペプチドをコードする単離分子、並びに、ULBP4 ポリヌクレオチドの誘導体、変異体、および有用な断片である。ULBP4 ポリヌクレオチド配列には、表1 および配列番号1の核酸配列に対する欠失、置換、または付加が含まれることが可能である。

【0082】

本発明の ULBP4 ポリヌクレオチド分子は、cDNA、化学的に合成したDNA、PCRによって増幅したDNA、RNA、またはそれらの組み合わせであることが可能である。遺伝暗号の縮重のため、2つのDNA配列が異なり、そしてなお同一のアミノ酸配列をコードする可能性がある。したがって、本発明は、ULBP4 ポリペプチドをコードする核酸配列を有する単離ポリヌクレオチド分子であって、該核酸配列が、表1 および配列番号2に示すような完全アミノ酸配列を有する ULBP4 ポリペプチド、またはその変異体、誘導体、および断片をコードする、前記単離ポリヌクレオチド分子を提供する。

【0083】

本発明の ULBP4 ポリヌクレオチドは、表1 および配列番号1に示す核酸配列に、少なくとも92%同一である核酸配列を有する。場合によって、核酸配列は、表1 および配列番号1に示す核酸配列に、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、

10

20

30

40

50

少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。2つの核酸配列の同一性パーセントを、視覚的検査および数学的計算によって決定することが可能であり、またはより好ましくはコンピュータプログラムを用いて配列情報を比較することによって、比較を行う。典型的な好ましいコンピュータプログラムは、遺伝学コンピュータグループ(GCG; ウィスコンシン州マディソン)、ウィスコンシンパッケージ、バージョン10.0プログラム、「GAP」(Devereuxら, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12:387)である。「GAP」プログラムの好ましいデフォルトパラメーターには:(1)ヌクレオチドに関する単一比較マトリックス(同一に対し1および非同一次元に対し0の値を含む)のGCG実行または他の匹敵する比較マトリックス;(2)ヌクレオチド配列の各ギャップに対する50のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに3のペナルティ;(3)末端ギャップに対するペナルティなし;および(4)長いギャップに対する最大ペナルティなし、が含まれる。配列比較の当業者に使用される他のプログラム、例えばBLASTNプログラム、バージョン2.0.9またはUW-BLAST2.0アルゴリズムも使用可能である。あるいは、既知の方法によって、例えばGreg Schulerが作成したMACAWプログラム(Schulerら, 1991 *Proteins* 9:180-190)などのソフトウェアプログラム中で2つの配列を並列させることによって、核酸配列同一性を決定する。

10

【0084】

本発明のULBP4ポリヌクレオチド分子にはまた、高ストリンジェンシー条件下(上に定義するようなもの)で、表1および配列番号1に示す核酸配列にハイブリダイズする核酸配列を有する、単離ポリヌクレオチド分子も含まれる。ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、表1および配列番号1に示す核酸配列の、少なくとも15の隣接するヌクレオチド、好ましくは少なくとも20の隣接するヌクレオチド、そしてより好ましくは少なくとも30の隣接するヌクレオチド、そしてさらにより好ましくは少なくとも100の隣接するヌクレオチドに対するものである。

20

【0085】

本明細書に記載する、ULBP4をコードするポリヌクレオチド分子の有用な断片には、プローブおよびプライマーが含まれる。こうしたプローブおよびプライマーは、例えば、*in vitro*でULBP4ポリヌクレオチドを増幅して、そして該ポリヌクレオチドの存在を検出するため、PCR法において、並びに、ULBP4の解析のため、サザンプロットおよびノーザンプロットにおいて、使用可能である。本発明のULBP4ポリヌクレオチド分子を発現している細胞もまた、こうしたプローブの使用によって同定可能である。こうしたプライマーおよびプローブを産生し、そして使用する方法が知られる。PCRのため、ULBP4ポリヌクレオチド分子の末端領域に対応する、5'および3'プライマーを使用し、慣用的な技術を用いて、ULBP4ポリヌクレオチドを単離し、そして増幅することが可能である。1つの典型的なハイブリダイゼーションプローブまたはプライマーは、ULBP4のユニークな3'膜貫通領域から取った、9以上の隣接核酸を含んでなる:

30

G A G T G G C A G G C T G G T C T C T G G C C C T T G A G G
A C G T C T T A G (配列番号9)。

40

【0086】

ULBP4ポリヌクレオチドの他の有用な断片には、標的であるULBP4 mRNA(センス鎖を用いる)、またはDNA(アンチセンス鎖を用いる)配列に結合可能な、一本鎖核酸配列を含んでなる、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。

【0087】

さらに他の有用な核酸には、ULBPタンパク質の発現を阻害可能な、干渉するRNA(ULBP mRNA由来の配列を含む、二本鎖RNAであることが可能なもの)、または干渉するRNAをコードする配列(ULBP mRNA由来の配列を含んでなるRNAヘアピンをコードするDNAを含むもの)が含まれる。例えばBosherおよびLab

50

ouesse (2000), *Nature Cell Biol.* 2: E31 - E36; Fjoseら (2001), *Biotechnol. Ann. Rev.* 7: 31 - 57を参照されたい。

【0088】

ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド分子を含有するベクター、並びにこうしたベクターで形質転換された宿主細胞も提供する。ULBP1、ULBP2、ULBP3、およびULBP4の1以上を含む、本発明のポリヌクレオチド分子いずれかは、一般的に、宿主における増殖のため、選択可能マーカーおよび複製起点を含むベクター内に含有されることが可能である。ベクターにはさらに、哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫遺伝子由来のものなどの、適切な転写または翻訳制御配列が、所望によりULBPポリヌクレオチド分子に連結されて、含まれる。こうした制御配列の例には、転写プロモーター、オペレーター、またはエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、並びに転写および翻訳を調節する適切な配列が含まれる。ヌクレオチド配列は、制御配列が、標的タンパク質をコードするDNAに機能的に関連する場合、機能可能であるように連結されている。したがって、プロモーターヌクレオチド配列がULBP配列の転写を指示する場合、プロモーターヌクレオチド配列は、ULBP DNA配列に機能可能であるように連結されている。

10

【0089】

本発明の標的ULBP4ポリペプチドをコードするULBP4ポリヌクレオチド分子のクローニングに適したベクターの選択は、ベクターが形質転換されるであろう宿主細胞、および適用可能な場合、標的ポリペプチドを発現しようとする宿主細胞に応じるであろう。ULBP4ポリペプチドの発現に適した宿主細胞には、原核生物、酵母、およびより高次の真核細胞が含まれ、この各々を以下に論じる。

20

【0090】

こうした宿主細胞において発現しようとするULBPポリペプチドはまた、異種タンパク質由来の領域を含む融合タンパク質であることも可能である。上に論じるように、例えば、ULBPポリペプチドの分泌、安定性改善、精製促進、ターゲティング、またはオリゴマー化を可能にするため、こうした領域を含むことが可能である。例えば、適切なシグナルペプチドをコードする核酸配列を発現ベクターに取り込むことが可能である。シグナルペプチド(分泌リーダー)をコードする核酸配列を、ULBP配列にインフレームで融合させて、ULBPがシグナルペプチドを含んでなる融合タンパク質として翻訳されるようにすることが可能である。意図する宿主細胞において機能するシグナルペプチドは、ULBPポリペプチドの細胞外分泌を促進する。異種シグナルペプチドで天然シグナル配列を交換することが可能である。哺乳動物宿主細胞で機能するシグナルペプチドの例には、米国特許第4,965,195号に記載されるインターロイキン-7(IL-7)のシグナル配列、Cosmanら((1984), *Nature* 312: 768)に記載されるインターロイキン-2受容体のシグナル配列; EP特許第0 367 566号に記載されるインターロイキン-4受容体シグナルペプチド; 米国特許第4,968,607号に記載されるI型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド; EP特許第0 460 846号に記載されるII型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド; ヒトIgKのシグナル配列(METDTLLLVLLLVPGSTG); およびヒト成長ホルモンのシグナル配列(MATGSR TSLLLAFGLLCLPWLQEGSA)が含まれる。好ましくは、シグナル配列は、細胞からULBPが分泌される際にULBPポリペプチドから切断されるであろう。本発明を実施するのに使用可能な他のシグナル配列には、酵母因子およびSf9昆虫細胞中のミツバチ(honeybee)メラチン・リーダーが含まれる。Brake(1989), *Biotechnology* 13: 269 - 280; Homaら(1995), *Protein Exp. Purif.* 6: 141 - 148; Reavyら(2000), *Protein Exp. Purif.* 6: 221 - 228.

30

40

50

本発明の標的ポリペプチドの発現に適した宿主細胞には、原核生物、酵母、およびより高次の真核細胞が含まれる。これらのポリペプチドの発現に使用するのに適した原核宿主には、エシェリキア属 (*Escherichia*)、バチルス属 (*Bacillus*)、およびサルモネラ属 (*Salmonella*) の細菌とともに、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、およびブドウ球菌属 (*Staphylococcus*) のメンバーが含まれる。原核細胞における、例えば大腸菌 (*E. coli*) における発現のため、ULBPポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子には、好ましくは、組換えポリペプチドの発現を促進するN末端メチオニン残基が含まれる。N末端Metは、場合によって、発現されたポリペプチドから切断されることが可能である。

10

【0091】

細胞宿主で使用するための発現ベクターは、一般的に、1以上の表現型的に選択可能なマーカーを含んでなる。こうした遺伝子は、例えば抗生物質耐性を与えるタンパク質または独立栄養必要条件を供給するタンパク質をコードする。広い範囲のこうしたベクターは、商業的供給源から容易に入手可能である。例には、pGEMベクター (*Promega*)、pSPORTベクター、およびpPROEXベクター (*Invitrogen*、*Life Technologies*、カリフォルニア州カールスバッド)、Bluescriptベクター (*Stratagene*)、およびpQEベクター (*Qiagen*) が含まれる。

【0092】

ULBPはまた、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、およびクロイベロミセス属 (*Kluyveromyces*) を含む属由来の酵母宿主細胞で発現可能である。好ましい酵母宿主は、*S. cerevisiae* および *P. pastoris* である。酵母ベクターは、しばしば、2 μ 酵母プラスミド由来の複製起点配列、自律複製配列 (ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終結のための配列、および選択可能マーカー遺伝子を含むであろう。酵母および大腸菌両方で複製可能なベクター (シャトルベクターと称する) もまた、使用可能である。酵母ベクターの上述の特徴に加え、シャトルベクターにはまた、大腸菌における複製および選択のための配列も含まれるであろう。酵母宿主で発現される標的ポリペプチドの直接分泌は、ULBPをコードするヌクレオチド配列の5'端に、酵母因子リーダー配列をコードするヌクレオチド配列を含むことによつて達成可能である。Brake (1989), *Biotechnology* 13: 269 - 280.

20

30

ULBPポリペプチドの発現のため、昆虫宿主細胞培養系も使用可能である。本発明の標的ポリペプチドは、好ましくは、例えばLuckowおよびSummers ((1988), *Biotechnology* 6: 47) の概説に記載されるように、バキュロウイルス発現系を用いて発現される。

【0093】

哺乳動物宿主細胞において、本発明のULBPポリペプチドを発現可能である。適切な哺乳動物宿主細胞株の限定されない例には、サル腎臓細胞のCOS-7株 (*Gluzman* ら (1981), *Cell* 23: 175 - 182)、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (*Puck* ら (1958), *PNAS USA* 60: 1275 - 1281)、CV-1 (*Fischer* ら (1970), *Int. J. Cancer* 5: 21 - 27) およびヒト子宮頸癌細胞 (HELA) (*ATCC CCL 2*) が含まれる。

40

【0094】

本発明のULBPポリペプチドの発現に適した発現ベクターの選択は、用いようとする特定の哺乳動物宿主細胞に応じるであろう。適切な発現ベクターの例には、pcDNA3.1/Hygro⁺ (*Invitrogen*)、pDC409 (*McMahan* ら (1991), *EMBO J.* 10: 2821 - 2832)、およびpSVL (*Pharm*

50

a c i a B i o t e c h) が含まれる。哺乳動物宿主細胞で使用するための発現ベクターには、ウイルスゲノム由来の転写および翻訳調節配列が含まれることが可能である。U L B P 4 を発現するのに使用可能な、一般的に用いられるプロモーター配列およびエンハンサー配列には、限定されるわけではないが、ヒトサイトメガロウイルス (C M V)、アデノウイルス 2、ポリオーマウイルス、およびシミアンウイルス 40 (S V 40) 由来のものが含まれる。哺乳動物発現ベクターの構築法は、例えば、O k a y a m a および B e r g ((1982) M o l . C e l l . B i o l . 2 : 161 - 170)、C o s m a n 5 ((1986) M o l . I m m u n o l . 23 : 935 - 941)、C o s m a n 5 ((1984) N a t u r e 312 : 768 - 771)、E P - A - 0367566、および W O 91 / 18982 に開示される。

10

【0095】

特定のベクターへの挿入を促進する、U L B P ポリヌクレオチド分子の修飾 (例えば制限部位を修飾することによる)、特定の発現系または宿主における使用を容易にすること (例えば好ましい宿主コドンを用いる) などが知られ、そして本発明における使用のため、意図される。U L B P ポリペプチドを産生するための遺伝子操作法には、既知の方法にしたがった、細胞不含発現系における、細胞宿主における、組織における、そして動物モデルにおける、ポリヌクレオチド分子の発現が含まれる。

【0096】

薬剤組成物

本発明は、断片、変異体、および / または融合タンパク質、またはこうした U L B P ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体を含む、本発明の実質的に精製された U L B P ポリペプチド、並びに薬学的に許容しうるキャリアーを含有する、薬剤組成物を提供する。こうした薬剤組成物を : N K 細胞、T 細胞 (T 細胞および T 細胞を含む)、および活性化マクロファージを含む N K G 2 D / D A P 10 発現細胞の活性を誘導するため ; サイトカインおよびケモカインの産生を誘導するため ; 腫瘍細胞、およびウイルスまたは細菌に感染した細胞などの感染した細胞に対する免疫エフェクター細胞の細胞毒性を誘導するため ; そして例えば癌、ウイルス感染、および細菌感染の療法的治療のためを含む多様な目的のため、細胞、組織、または患者に投与する。U L B P ポリペプチドは、例えばターゲティング部分に融合させた、融合タンパク質であることが可能である。

20

【0097】

本発明はまた、N K 細胞および / または T 細胞活性の解析に ; N K G 2 D 受容体結合および活性化の解析に ; そして感染および新生物細胞に対する自然免疫系反応に關与するシグナル分子の阻害性 / 刺激性の影響の解析に有用な、試薬、組成物、および方法も提供する。

30

【0098】

U L B P を発現しているベクターを含む、本発明の U L B P ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、薬剤組成物として処方し、そして選択した投与経路に適応させた多様な型で、宿主、好ましくはヒト患者を含む哺乳動物宿主に投与することが可能である。化合物は、好ましくは、薬学的に許容しうるキャリアーと組み合わせて投与され、そしてターゲティング抗体および / またはサイトカインを含む、特異的搬送剤と組み合わせるかまたは該搬送剤とコンジュゲート化することが可能である。

40

【0099】

U L B P は、経口、非経口などの既知の技術によって (皮下注射、静脈内、筋内、胸骨内 (i n t r a s t e r n a l) または注入技術を含む)、吸入スプレーによって、局所的に、粘膜を通じた吸収によって、または直腸投与で、慣用的な非毒性の薬学的に許容しうるキャリアー、アジュバントまたはビヒクルを含有する投薬型単位処方、投与可能である。本発明の薬剤組成物は、経口投与に適した懸濁物または錠剤、鼻スプレー、クリーム、無菌注射可能水性または油性 (o l e a g e n o u s) 懸濁物または座薬などの無菌注射可能調製物の形であることが可能である。

【0100】

50

懸濁物としての経口投与のため、薬剤処方の際該技術分野に周知の技術にしたがって、組成物を調製可能である。組成物は、塊を分割するための微結晶性セルロース、懸濁剤としてのアルギン酸またはアルギン酸ナトリウム、粘性増進剤としてのメチルセルロース、および甘味料またはフレーバー剤を含有することが可能である。即時放出型錠剤として、組成物は、当該技術分野に知られる、微結晶性セルロース、デンプン、ステアリン酸マグネシウムおよびラクトースまたは他の賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、希釈剤および潤滑剤を含有することが可能である。

【0101】

吸入またはエアロゾルによる投与のため、薬剤処方の際該技術分野に周知の技術にしたがって、組成物を調製可能である。組成物は、当該技術分野に知られる、ベンジルアルコールまたは他の適切な防腐剤、生物学的利用能を増進するための吸収促進剤、フルオロカーボンまたは他の可溶化剤または分散剤を用いて、生理食塩水の溶液として調製可能である。

10

【0102】

注射可能溶液または懸濁物として投与するため、当該技術分野に周知の技術にしたがって、合成モノまたはジグリセリドを含む無菌油、およびオレイン酸を含む脂肪酸などの、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて、組成物を処方可能である。

【0103】

座薬として直腸投与するため、周囲温度で固形であるが、直腸腔中で液化するかまたは溶解して薬剤を放出する、ココアバター、合成グリセリドエステルまたはポリエチレングリコールなどの適切な非刺激性賦形剤と混合することによって、組成物を調製可能である。

20

【0104】

好ましい投与経路には、経口、非経口とともに、静脈内、筋内または皮下経路が含まれる。より好ましくは、本発明の化合物は、非経口投与、すなわち注入または注射によって、静脈内、動脈内、筋内、病巣内、皮下、または腹腔内注射される。局所投与、すなわち疾患部位での投与が意図され、経皮搬送、および移植または皮膚パッチからの徐放も同様である。本発明の1つの態様において、化合物は、注射によって、腫瘍に直接；または静脈内注射による全身搬送によって、投与可能である。他の代替法には、点眼薬、丸薬、ロゼンジ、シロップ、およびチューインガムなどの経口調製物、並びにローション、ゲル、スプレー、および軟膏などの局所調製物が含まれる。大部分の場合、ポリペプチドである療法分子は、局所投与、あるいは注射または吸入によって投与可能である。

30

【0105】

化合物の溶液または懸濁物は、水中、等張生理食塩水(PBS)中で調製し、そして場合によって非毒性界面活性剤と混合することが可能である。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、DNA、植物油、トリアセチンおよびその混合物中で、分散物もまた調製可能である。これらの調製物は、貯蔵および使用の通常の条件下で、微生物の増殖を防止するための防腐剤を含有することが可能である。

【0106】

注射または注入使用に適した薬剤投薬型には、無菌、水性溶液または分散物、あるいは無菌注射可能または注入可能溶液または分散物の即時調製に適応させた、活性成分を含んでなる無菌粉末が含まれることが可能である。最終的な投薬型は、製造および貯蔵条件下で、無菌で、流動体であり、そして安定であるべきである。液体キャリアーまたはビヒクルは、溶媒または液体分散媒体であることが可能であり、例えば水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、または液体ポリエチレングリコール等のポリオール、植物油、非毒性グリセロールエステル、およびその適切な混合物を含んでなる、溶媒または液体分散媒体であることが可能である。適切な流動性は、例えば、リポソームの形成によって、分散物の場合は必要な粒子サイズの維持によって、または非毒性界面活性剤の使用によって、維持可能である。微生物作用の防止は、多様な抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によって達成可

40

50

能である。多くの場合、等張剤、例えば糖、緩衝剤、または塩化ナトリウムを含むことが望ましいであろう。注射可能組成物の吸収延長は、吸収を遅延させる剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムヒドロゲルおよびゼラチンを、組成物中に含むことによって、実行可能である。

【0107】

無菌注射可能溶液は、上に列挙するように、多様な他の成分を含む適切な溶媒中に、必要な量の化合物を取り込み、そしてその後、必要に応じてフィルター滅菌することによって調製される。無菌注射可能溶液の調製用の無菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、該技術は、活性成分に、先の無菌ろ過溶液に存在するさらなる所望の成分いずれかを加えた粉末を生じる。

10

【0108】

投薬量

患者治療に最も適切な療法投薬および療法措置は、治療しようとする疾患または状態によって、そして患者の体重および他のパラメーターにしたがって、多様であろう。ULBPポリペプチドまたはULBPポリペプチドに対する抗体の有用な用量は、全身投与される、約0.01~100mg ULBP/kg/日（またはそれ未満、以下を参照されたい）である可能性がある。より長い治療期間を用いると、はるかに少ない用量、例えば0.001~1mg ULBP/kg/日の範囲でもまた、療法的に有用な結果が生じるであろうと期待される。

【0109】

用量は、適切な頻度いずれかで、そして適切な期間いずれかの間、投与可能である。例えば、用量は、多くのあり得る投薬措置のうちで、毎日、1日おき、3日ごと、週2回、週1回、10日ごと、2週間ごと、3週間ごと、1ヶ月ごと、または2ヶ月ごとに投与可能である。各用量の頻度および/または量は、治療期間全体で一定である必要はない。治療は、1日以上から数年の間の、いかなる適切な期間、続けることも可能である。

20

【0110】

有効な投薬量および治療プロトコルは、慣用的な手段によって決定可能であり、実験動物において、低用量で開始し、そしてその後、効果を監視しながら投薬量を増加させ、そして体系的に投薬措置もまた変化させることによって決定可能である。臨床医学者は、既定の被験者に対する最適投薬量を決定する際に、多くの要因を考慮に入れることが可能である。要因には、患者の大きさ、患者の年齢、患者の全身状態、治療しようとする特定の疾患、疾患の重症度、患者における他の薬剤の存在などが含まれる。試験投薬量は、動物研究の結果および臨床的文献を考慮した後、選択されるであろう。

30

【0111】

アッセイ

NK細胞、またはNKGD2Dを発現する他の細胞、例えばCD8⁺ T細胞、T細胞、またはマクロファージのULBP刺激を修飾する、例えば増加させるかまたは減少させる剤は、例えばNKGD2D/DAP10受容体に対するULBP結合のアッセイおよび/またはULBP/NKGD2D複合体形成の解析、NK細胞またはT細胞が仲介する細胞毒性の解析、あるいはケモカインおよび/またはサイトカインのNK細胞またはT細胞産生の解析によって、同定可能である。ULBP4ポリペプチドの存在下で、そして試験剤の存在下または非存在下で、NK細胞をインキュベーションし、そしてULBP4活性またはULBP4阻害と、ULBP/NKGD2D複合体形成、NK細胞またはT細胞が仲介する細胞毒性、あるいはケモカインおよび/またはサイトカインのNK細胞またはT細胞産生を相関させると、こうした剤のスクリーニングが可能になる。こうしたアッセイにおいて、未処理対照に対して、ULBP処理細胞のNKGD2D受容体仲介活性が不均衡に減少しているかまたは増加していると、試験剤によるULBP4活性の刺激または阻害と相互に関連付けられる。

40

【0112】

NKGD2D発現細胞（NK細胞、またはT細胞、またはマクロファージ）における、U

50

ULBP4を含むULBPポリペプチドに対する特異的標的活性、例えば抗アポトーシス性セリン/スレオニンキナーゼAkt、PKB、JAK2チロシンキナーゼとともに、STAT5転写因子、およびERKMAPキナーゼのULBP活性化もまた解析し、そして試験剤の阻害に対する活性と関連させることが可能である。

【0113】

好ましくは、ULBPの可溶性型を用いて、NKG2D発現細胞において、ULBP標的活性を刺激する。場合によって、NKG2D発現細胞はNK細胞であることが可能である。ULBP4に刺激された活性を、試験剤の存在下および非存在下で測定し、そしてその後、比較する。試験剤の非存在下よりも、試験剤の存在下で、ULBP4に活性化された試験活性が低いならば、試験剤がULBPの活性を減少させることが示される。試験剤の非存在下よりも、試験剤の存在下で、ULBP4に活性化された試験活性が高いならば、試験剤がULBPの活性を増加させたことが示される。ULBPの刺激剤および阻害剤を用いて、ULBPが仲介する活性を増大させるか、阻害するか、または修飾することが可能であり、そしてしたがって該剤は、潜在的な療法的使用を有することが可能である。例えば、ULBPの阻害剤は、例えば自己免疫疾患において、または臓器移植を経験する患者において、NK細胞の細胞毒性を減少させるのに有用である可能性がある。

【0114】

療法適用

本発明のULBP4ポリペプチドを含むULBPポリペプチドは、有効なNK細胞、T細胞、および/またはマクロファージ活性化剤である。本発明の方法において、ULBPポリペプチドの免疫エフェクター細胞活性化効果は、ピコモル~ミリモル量のULBPポリペプチドで、そして好ましくはナノモル~マイクロモル量の可溶性ULBPポリペプチドで免疫エフェクター細胞を処理することによって達成される。活性化NK細胞は、細菌を溶解し、ウイルスに感染した細胞を溶解し、そして腫瘍細胞の除去に参与することが示されている。例えば、Whitesideら(1996), *Anticancer Res.* 16(4C):2537-64; Yamaueら(1989), *Cancer Immunol Immunother.* 29(2):79-86を参照されたい。ULBPがNK細胞を刺激すると、免疫系の他の成分を活性化するサイトカインおよびケモカインが産生され、そしてしたがって、この刺激は、ウイルス感染または細菌感染における治療として、そして特定の種類の腫瘍細胞治療において、有用である。やはりULBP受容体NKG2Dを発現するNK細胞以外の細胞、例えばCD8⁺T細胞およびT細胞もまた、NKG2Dリガンドに活性化されることが可能である。Dieffenbachら(2000), *Nature Immunology* 1(2):119-26; Bauerら(1999), *Science* 285:727-29.

(1) サイトカイン/ケモカイン産生

ULBP1、ULBP2、ULBP3、および/またはULBP4を含む、単離され、そして好ましくは精製されたULBPポリペプチドを用いて、NK細胞、CD8⁺T細胞、マクロファージ、および/またはT細胞などの細胞からのサイトカインおよびケモカイン産生を刺激することも可能である。所望により、上に論じたように、この方法で用いるULBPポリペプチドをLZまたはFc部分に融合させ、三量体または二量体などの多量体であることが可能なULBP-LZ融合タンパク質、または二量体などの多量体であることが可能なULBP-Fc融合タンパク質を生成する。初代NK細胞をIL-15または他の同様の物質で、ある期間、好ましくは15~20時間、処理して、NK細胞へのULBP結合を最大にする。その後、処理した細胞を、好ましくは約0.05~約20.0μg/ml、所望により約0.5~約5.0μg/mlまたは約0.8~約3.0μg/mlの濃度の可溶性ULBPポリペプチドで刺激する。刺激した細胞を、ある期間、好ましくは約15~20時間、さらにインキュベーションして、そして上清を収集する。慣用法によって上清からサイトカインおよびケモカインを単離し、そして精製する。ULBPが誘導する、NK細胞などの細胞の活性化を介して産生されるサイトカインおよびケモカインには、GM-CSF、インターフェロン、TNF-アルファ、MIP1-

アルファ、M I P I - ベータおよびC CケモカインI - 309が含まれる。I L - 15で処理したNK細胞を、場合によって、可溶性U L B P 4およびI L - 12の組み合わせで刺激して、さらにより高い収量を達成する。

【0115】

(2) 腫瘍および感染の治療

U L B P 4変異体、断片、および融合タンパク質を含むU L B Pポリペプチドはまた、腫瘍および感染、例えば細菌感染またはウイルス感染治療用の療法剤としても、有用性を見出す。したがって、本発明は、腫瘍増殖を阻害するかまたは停止し、腫瘍細胞を殺し、または患者における腫瘍のサイズおよび/または数を減少させる方法を含む。本発明は、個体にU L B Pポリペプチドを投与することによって、ウイルス感染または細菌感染を治療する方法をさらに含む。ウイルス感染または細菌感染、あるいは真核生物による感染であることが可能な感染の治療は：検出可能な感染性粒子または生物の量の減少；感染性ウイルスまたは生物の検出可能な核酸またはタンパク質の量の減少；および/または感染に関連する症状の減少を含む。

10

【0116】

可溶性U L B Pポリペプチドであって、変異体、断片、および/または融合タンパク質であることが可能であり、N K G 2 Dに結合し、そしてN K G 2 Dを発現する細胞、好ましくはNK細胞、T細胞、および/またはマクロファージを活性化することが可能な、前記可溶性U L B Pポリペプチドを投与することによって、癌または感染を治療可能である。あるいは、抗イディオタイプ抗体であって、抗U L B P抗体に結合可能であり、N K G 2 Dに結合し、そしてN K G 2 Dを発現する細胞を活性化することが可能である、前記抗イディオタイプ抗体を投与することによって、こうした状態を治療可能である。癌または感染がU L B Pタンパク質を発現する場合、U L B Pタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、癌または感染を治療可能である。癌性細胞または感染細胞に対する抗体の結合によって、抗体に依存する細胞伸介型細胞毒性が刺激され、癌性細胞または感染細胞の死を導くことが可能である。所望により、抗体を細胞毒性剤または放射性剤に融合させて、抗体結合の細胞毒性効果をさらに増進することが可能である。

20

【0117】

すべてではないが、いくつかの癌細胞はU L B Pタンパク質を発現する。例えばC o s m a nら、上記；O n d aら(2001), B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m . 285:235-43を参照されたい。U L B Pタンパク質を発現している可能性も、また、していない可能性もある癌細胞近傍に局在するU L B Pタンパク質の数を増加させるため、U L B P 1、U B L P 2、U B L P 3、および/またはU L B P 4を含むU L B Pタンパク質を、腫瘍特異的抗原に結合する抗体または他のポリペプチド(*in vitro*で腫瘍抗原に結合すると選択されたものなど)に融合させ、そして腫瘍を治療するのに用いることが可能である。さらに、こうしたU L B P融合タンパク質は、さらに、サイトカイン、例えばI L - 15、I L - 2および/またはI L - 12をさらに含むことが可能であり、そしてこの三重融合タンパク質を用いて、癌または感染を治療することが可能である。サイトカインおよび抗体がともに生物学的機能を保持する、腫瘍特異的抗体に融合させたサイトカインは、多様なセッティングで、有効な抗癌剤であることが見出されている。例えばG i l l i e sら(2002), C a n c e r I m m u n o l . I m m u n o t h e r . 51:449-60; R u e h l m a n nら(2001), C a n c e r R e s . 61:8498-503; H o l d e nら(2001), C l i n i c a l C a n c e r R e s . 7:2862-69を参照されたい。U L B Pタンパク質をサイトカイン：抗体融合体に付加すると、腫瘍細胞に対する免疫反応がさらに刺激される可能性がある。

30

40

【0118】

さらに別の態様において、腫瘍を除去する手術後に、患者に残存する腫瘍細胞の増殖を防止または阻害する方法を提供する。U L B P 1、U L B P 2、U L B P 3、および/またはU L B P 4、並びにその断片、変異体、および/または融合体を含むU L B Pタンパ

50

ク質をコードする核酸を、患者から外科的に除去した腫瘍から培養した腫瘍細胞に導入することが可能である。その後、例えば放射線照射することによって、さらなる増殖を防止するように、これらの細胞を処理することが可能である。表面上に発現されるULBPタンパク質を有する、こうした非分裂細胞を、該細胞を除去した患者に再導入することが可能である。こうした細胞はワクチンとして働き、外科的に除去されたのと同じ種類の腫瘍細胞に対する免疫反応を上昇させることが可能である。こうした治療は、手術後に患者に残存する腫瘍細胞の増殖を防止または阻害可能である。

【0119】

(3) ターゲティング部分としての抗ULBP抗体

抗ULBP4抗体を含む抗ULBP抗体は、抗体に依存する細胞仲介型細胞毒性、補体結合、または他の機構を通じた、免疫系による破壊のため、腫瘍細胞または感染細胞を含む、ULBP発現細胞をターゲティングするのに療法的に有用でありうる。さらに、抗ULBP抗体を細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤(cytostatic agent)、または放射性剤に融合させることが可能であり、こうした抗体は、腫瘍細胞、あるいはウイルス、細菌、または真核生物に感染した細胞などの、ULBP発現細胞に対して、これらの療法剤をターゲティングするのに、療法的に有用である可能性がある。あるいは、放射性剤または発光剤に融合させた抗ULBP4抗体を用いて、ULBP4発現細胞を検出することが可能である。多くの細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、発光剤、または放射性剤が当該技術分野に知られ、そしてこれらは他の抗体に融合され、細胞増殖を停止するか、細胞を殺すか、または特定の抗原を発現している細胞を検出してきた。こうした剤の例には：メイトンシン誘導体(DM1など)、エンテロトキシン(ブドウ球菌エンテロトキシンなど)、ヨウ素同位体(ヨウ素-125など)、テクネチウム同位体(Tc-99mなど)、シアニン蛍光色素(Cy5.5.18など)、またはリボソーム不活性化タンパク質(ボウガニン(bougainin)、ゲロニン、またはサポリン-S6など)が含まれる。投与に際して、抗ULBP抗体および所望の細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、発光剤、または放射性剤を含有する融合タンパク質は、標的ULBP発現細胞に結合し、こうしてその検出を可能にするか、あるいは細胞を殺すかまたはその増殖を阻害するため、細胞に療法剤を運ぶ。腫瘍細胞がULBP4を発現する場合、例えばこうしたターゲティング部分を用いて、腫瘍細胞を殺すか、またはその増殖を防止することが可能である。

【0120】

(4) IL-12との相乗効果

ULBPタンパク質およびIL-12は、強く相乗作用して、IL-15で前処理したNK細胞からのインターフェロン-ガンマ産生を誘導する。ULBPタンパク質はまた、ケモカインのmRNAレベルも上方制御する。特に、ケモカインI-309およびリンホタクチンがULBPタンパク質に上方制御されることが示された。さらに、NK細胞において、GM-CSF、リンホタクチン-アルファおよびTNF-アルファを含む、NK細胞活性化の既知のマーカであるサイトカインが、ULBPの投与に際して上方制御される。上に論じられるように、NK細胞は、多様な細胞種を溶解することによって、細胞毒性効果を発揮することが可能である。したがって、宿主系がNK細胞を活性化し、そして活性化されたNK細胞を、感染した細胞または腫瘍細胞にターゲティングする能力は、感染および腫瘍と戦う際の重要な特徴である。

【0121】

(5) NKG2D/Dap10への結合

実施例として、以下に記載し、そして立証するように、ULBP4を含むULBPポリペプチドは、NK細胞、CD8⁺ T細胞、 T細胞、およびいくつかのマクロファージに発現される抗原であるNKG2D/Dap10に結合する。NKキラー細胞の活性化の結果、サイトカインが産生され、そしてNK細胞殺傷が誘導される。ULBPタンパク質が重要なサイトカインの産生と相乗作用する能力があることから、ULBPタンパク質がNK細胞の細胞溶解機能を活性化可能であることが示される。したがって、ULBPタンパク質は、抗腫瘍療法剤として、そしてウイルス感染または細菌感染、あるいは原生

動物を含む真核生物感染を含む感染を治療する療法剤として、有用性を見出す。

【0122】

さらに、NK細胞、マクロファージ、T細胞、またはCD8⁺T細胞に結合し、そしてこれらの細胞を活性化することが可能であり、そしてまた、腫瘍細胞にも結合可能である、二機能性分子または多機能性分子が、本発明にしたがって有用である。適切な二機能性分子または多機能性分子は、少なくとも1つのULBPタンパク質、またはULBPタンパク質のNKGD2受容体結合断片、および例えば一本鎖抗体などの、腫瘍細胞抗原に結合するポリペプチドまたは他の部分を含む分子であることが可能である。こうした療法剤が、NK細胞、マクロファージ、T細胞、および/またはCD8⁺T細胞に結合し、そしてこれらの細胞を活性化することが可能であり、そしてこれらのエフェクター細胞による溶解のため、腫瘍細胞をターゲティングすることが可能であることが認識可能されうる。

10

【0123】

(6) 免疫抑制

さらに、ULBPが免疫系を活性化する能力に干渉する剤は、免疫反応の下方制御が望ましい状況、例えば移植(Manilyら, 1998, Curr. Opin. Immunol. 10:532-538)、移植片対宿主疾患、移植片拒絶、自己免疫疾患、遺伝子治療(Hackettら, 2000, Curr. Opin. Mol. Therap. 2:376-382)、炎症性腸疾患およびクローン病などの不適切な炎症によって特徴付けられる疾患などの状況において有用である。例えば、哺乳動物への遺伝子治療ベクターの投与、移植の前に、それとほぼ同時に(少し前または少し後いずれか)、またはそれと同時に、あるいは別の方式で、所望の免疫抑制に適したように、限定されるわけではないが、ULBP1、ULBP2、ULBP3およびULBP4を含むULBPに、特異的に結合するアンタゴニスト性抗体またはペプチボディを投与することが可能である。こうした治療にやはり適しているのは、NKGD2を介した活性化を遮断または阻害可能な、ULBPポリペプチドのアンタゴニスト型(変異体、断片、および融合タンパク質を含む)または抗イディオタイプ抗体である。

20

【0124】

検出可能な自己抗体の数を減少させ、免疫エフェクター細胞の活性化を減少させ、そして/または自己免疫疾患の症状を減少させるかまたは除去するため、アンタゴニスト性抗ULBP抗体、あるいはULBPポリペプチドまたは抗イディオタイプ抗体のアンタゴニスト型を、自己免疫疾患を患う患者に投与することが可能である。自己免疫疾患には、患者自身の組織が、患者の免疫系に引き起こされる有害な影響に供される、すべての状態が含まれる。こうした影響は、他の可能性の中でも、自己抗体によって、そして/または免疫エフェクター細胞の活性化によって、仲介されうる。免疫エフェクター細胞の活性化が、疾患病理に役割を果たしている場合、ULBPタンパク質などのNKGD2リガンドとの拮抗が特に有益である可能性がある。自己免疫疾患の原因は、通常、不明であるが、いくつかの症例で、多様な種類の感染の存在および多様な自己免疫疾患の間の相関が確立されており、そしてこれは科学的文献の考察にたびたび登場する主題である。例えばCorapciogluら(2002), Thyroid 12:613-17; Sewellら(2002), Immunol. Lett. 82:101-10; Rose(1998), Semin. Immunol. 10(1):5-13; Matsiota-Bernard(1996), Clin. Exp. Immunol. 104:228-35; 並びにMcMurrayおよびElbourne(1997), Semin. Arthritis Rheum. 26:690-701を参照されたい。

30

40

【0125】

当業者は、自己免疫疾患の症状が非常に多様であり、そして患者の免疫系によってどの組織がターゲティングされるのかに応じる可能性があることを認識するであろう。自己免疫疾患は、臓器特異的、または全身性であることが可能であり、例えば、とりわけ、アジ

50

ソン病、インスリン依存性糖尿病（I型糖尿病）、多腺性内分泌病症候群、全身性エリテマトーデス、慢性活性肝炎、多様な型の甲状腺炎（橋本甲状腺炎、一過性甲状腺炎症候群、およびグレーブス病を含む）、リンパ球性腺下垂体炎、未成熟卵巣不全、特発性下垂体前葉甲状腺炎（idiopathic hypoparathyroidism）、悪性貧血、糸球体腎炎、自己免疫好中球減少症、グッドパスチャー症候群、多発性硬化症、白斑、重症筋無力症、関節リウマチ、強皮症、原発性シェーグレン症候群、多発性筋炎、自己免疫溶血性貧血、自己免疫血小板減少性紫斑病、尋常性天疱瘡、急性リウマチ熱、混合本態性寒性グロブリン血症、および温式自己免疫溶血性貧血が含まれる。

【0126】

さらに、アンタゴニスト性抗ULBP抗体またはペプチボディ、あるいはアンタゴニスト性ULBPポリペプチドまたは抗イディオタイプ抗体を、炎症性腸疾患およびクローン病などの炎症性疾患を患う患者に投与して、これらの疾患の症状を減少させるか、または除去することが可能である。

10

【0127】

さらに、ULBPの上述の療法適用すべてにおいて、既知のまたはまだ発見されていないNKGDの他のリガンドをULBPの代わりに使用することが可能である。これらのリガンドには、限定されるわけではないが、MICA、MICB、並びにNKGDに結合する抗体およびペプチボディが含まれる。

【0128】

本出願内で、別に言及しない限り、利用する技術は：Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら(1989); "Gene Expression Technology," Methods in Enzymology, Vol. 185, D. Goeddel監修, (1991) Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴ; "Guide to Protein Purification" Methods in Enzymology中, M.P. Deutscher, 3d., (1990) Academic Press, Inc.; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Innisら(1990) Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴ; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 第2版, R.I. Freshney(1987) Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク; および Gene Transfer and Expression Protocols, pp 109-128, E.J. Murray監修, The Humana Press Inc., ニュージャージー州クリフトンなどのいくつかの周知の参考文献のいずれかに見出すことが可能である。

20

30

【実施例】

【0129】

本発明を一般的に記載してきたが、例示のために提供され、そして限定することを意図しない、以下の実施例を参照することによって、本発明は、より容易に理解されるであろう。

40

【0130】

(実施例1)

ヒトULPB4 cDNAの分子クローニング

2つの関連特許、WO 99/06554('554)およびWO 99/31236('236)に開示される、公表されたcDNA配列は、本明細書において、ULBPタンパク質ファミリーと、あり得る相同性を有すると同定された。WO '554は、分泌タンパク質をコードするようであると報告される、370bp EST配列を開示するが、該ESTはいかなる特定のタンパク質もコードするとともに、また、いかなる既知のタンパク質ファミリーに関連するいかなるタンパク質もコードするとともに認識されなかった。WO '236は、ヒト分泌タンパク質の一部をコードすると考えられる、989塩基対配列

50

の伸長した cDNA (配列番号 320) を挙げた。該配列は、いかなる特定のタンパク質もコードするとも、また、いかなる既知のタンパク質ファミリーに関連するいかなるタンパク質もコードするとも認識されなかった。

【0131】

WO '236 出願の 989 bp cDNA 配列に相同性を有する配列に関して、公的なゲノムデータベース (NCBI/NIH) を検索した。検索によって、DNA のゲノム伸長上の相同であるが同一でない配列が明らかになった (GenBank 寄託番号第 AL355312 号)。ULBP1、2、および 3 遺伝子のイントロン-エクソン構造の知識に基づいて、ULBP4 遺伝子の構造を予測し、そして予測される ULBP4 cDNA に特異的であろう PCR プライマーを設計するのに用いた。2つのプライマー、順方向プライマー: 5' TAT GTC GAC CTC CAC AGT ATG CGA A GA ATA TCC CTG 3' (配列番号 7) および逆方向プライマー: 5' ATA GGC GGC CGC AGA CTA AGA CGT CCT CAA 3' (配列番号 8) を用いて、NamaIwa (ヒト B 細胞リンパ腫) cDNA ライブラリー (ATCC、バージニア州 マナサス から入手可能な細胞株 CRL-1432) から、PCR によって、全長 ULBP4 cDNA を増幅した。cDNA をクローニングし、配列決定し、そして該 cDNA が 789 塩基対のオープンリーディングフレームを有することを見出した。cDNA クローンの核酸配列 (配列番号 1) および推定されるアミノ酸配列 (配列番号 2) を表 1 に示す。

10

【0132】

表 1

ULBP4

【0133】

20

【表 1】

Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	14
ATG	CGA	AGA	ATA	TCC	CTG	ACT	TCT	AGC	CCT	GTG	CGC	CTT	CTT	
Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Glu	Ile	Met	Val	28
TTG	TTT	CTG	CTG	TTG	CTA	CTA	ATA	GCC	TTG	GAG	ATC	ATG	GTT	
Gly	Gly	His	Ser	Leu	Cys	Phe	Asn	Phe	Thr	Ile	Lys	Ser	Leu	42
GGT	GGT	CAC	TCT	CTT	TGC	TTC	AAC	TTC	ACT	ATA	AAA	TCA	TTG	
Ser	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro	Trp	Cys	Glu	Ala	Gln	Val	Phe	Leu	56
TCC	AGA	CCT	GGA	CAG	CCC	TGG	TGT	GAA	GCG	CAG	GTC	TTC	TTG	
Asn	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Asp	Asn	Asn	Met	70
AAT	AAA	AAT	CTT	TTC	CTT	CAG	TAC	AAC	AGT	GAC	AAC	AAC	ATG	
Val	Lys	Pro	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Lys	Lys	Val	Tyr	Ala	Thr	84
GTC	AAA	CCT	CTG	GGC	CTC	CTG	GGG	AAG	AAG	GTA	TAT	GCC	ACC	
Ser	Thr	Trp	Gly	Glu	Leu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Glu	Val	Gly	98
AGC	ACT	TGG	GGA	GAA	TTG	ACC	CAA	ACG	CTG	GGA	GAA	GTG	GGG	
Arg	Asp	Leu	Arg	Met	Leu	Leu	Cys	Asp	Ile	Lys	Pro	Gln	Ile	112
CGA	GAC	CTC	AGG	ATG	CTC	CTT	TGT	GAC	ATC	AAA	CCC	CAG	ATA	
Lys	Thr	Ser	Asp	Pro	Ser	Thr	Leu	Gln	Val	Glu	Met	Phe	Cys	126
AAG	ACC	AGT	GAT	CCT	TCC	ACT	CTG	CAA	GTC	GAG	ATG	TTT	TGT	
Gln	Arg	Glu	Ala	Glu	Arg	Cys	Thr	Gly	Ala	Ser	Trp	Gln	Phe	140
CAA	CGC	GAA	GCA	GAA	CGG	TGC	ACT	GGT	GCA	TCC	TGG	CAG	TTC	
Ala	Thr	Asn	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	Phe	Asp	Ala	Met	Asn	154
GCC	ACC	AAT	GGA	GAG	AAA	TCC	CTC	CTC	TTT	GAC	GCA	ATG	AAC	
Met	Thr	Trp	Thr	Val	Ile	Asn	His	Glu	Ala	Ser	Lys	Ile	Lys	168
ATG	ACC	TGG	ACA	GTA	ATT	AAT	CAT	GAA	GCC	AGT	AAG	ATC	AAG	
Glu	Thr	Trp	Lys	Lys	Asp	Arg	Gly	Leu	Glu	Lys	Tyr	Phe	Arg	182
GAG	ACA	TGG	AAG	AAA	GAC	AGA	GGG	CTG	GAA	AAG	TAT	TTC	AGG	
Lys	Leu	Ser	Lys	Gly	Asp	Cys	Asp	His	Trp	Leu	Arg	Glu	Phe	196
AAG	CTC	TCA	AAG	GGA	GAC	TGC	GAT	CAC	TGG	CTC	AGG	GAA	TTC	
Leu	Gly	His	Trp	Glu	Ala	Met	Pro	Glu	Pro	Thr	Val	Ser	Pro	210
TTA	GGG	CAC	TGG	GAG	GCA	ATG	CCA	GAA	CCG	ACA	GTG	TCA	CCA	
Val	Asn	Ala	Ser	Asp	Ile	His	Trp	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	224
GTA	AAT	GCT	TCA	GAT	ATC	CAC	TGG	TCT	TCT	TCT	AGT	CTA	CCA	
Asp	Arg	Trp	Ile	Ile	Leu	Gly	Ala	Phe	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	238
GAT	AGA	TGG	ATC	ATC	CTG	GGG	GCA	TTC	ATC	CTG	TTA	GTT	TTA	
Met	Gly	Ile	Val	Leu	Ile	Cys	Val	Trp	Trp	Gln	Asn	Gly	Glu	252
ATG	GGA	ATT	GTT	CTC	ATC	TGT	GTC	TGG	TGG	CAA	AAT	GGT	GAG	
Trp	Gln	Ala	Gly	Leu	Trp	Pro	Leu	Arg	Thr	Ser				(配列番号2)
TGG	CAG	GCT	GGT	CTC	TGG	CCC	TTG	AGG	ACG	TCT	TAG			(配列番号1)

10

20

30

40

50

【0134】

cDNAによって予測されるアミノ酸配列は、以下の実施例2、表3に示すように、ULBPポリペプチドに相同性を有すると決定された。新規ULBPポリペプチド、ULBP4は、WO 99/31236に開示されるcDNA配列(配列番号320)から予測されるものと別個の、予測されるアミノ酸配列を有し、表2に示すように、263のうち、26が非同アミノ酸であった。異なるアミノ酸残基のうち8は、アルファ-1およびアルファ-2ドメインのほぼ183アミノ酸内に属する。これらのうち、ミスマッチしたアミノ酸のうち、123位および166位の2つは、WO 99/31236に開示されるcDNA配列(配列番号320)の対応する位の、潜在的な停止コドンに相当する。

【0135】

新規ポリヌクレオチド分子および対応する推定上のポリペプチド、ULBP4は、本明細書において、ULBPタンパク質ファミリーの新規メンバーと同定される。ULBP4のアミノ酸配列には、いくつかの興味深い特徴が存在し、この特徴には、シグナル配列、アルファ-1およびアルファ-2ドメイン、および短い細胞質テールを持つ、ユニークな膜貫通ドメインが含まれる。上に論じたように、この構造は、既知のULBPポリペプチド、ULBP1、ULBP2、およびULBP3に特徴的である。新規のULBP4は、ULBP1、ULBP2、およびULBP3同様、アルファ-3ドメインを欠き、そしてしたがってベータ-2ミクログロブリンと会合不能である点で、伝統的なMHCKラスI分子と異なる。

【0140】

10

表3

【0141】

【表3】

シグナル配列				
ULBP1	~~~~~MAAAA	SPAFLLCLPL	L.HLLSGWSR	AGWV DTHCLC YDFIITPKSR
ULBP2	~~~~~MAAAA	ATKILLCLPL	L.LLLSGWSR	AGRA DPHSLC YDITVIPKFR
ULBP3	~~~~~MAAAA	SPAILPRLAI	LPYLLFDWSG	TGRA DAHSLW YNFTIHLPR
ULBP4	MRRISLTSSP	VRLLLFLLL	LIAL.....	EIMV GGHSLC FNFITKSLSR
	1		*	**** ** 44

α 1ドメイン				
ULBP1	PEPQWCEVQG	LVDERPFLHY	DCVNHKAKAF	ASLGKKVNVK KTWEEQTETL
ULBP2	PGPRWCAVQG	QVDEKTFLLHY	DCGNKTVTPV	SPLGKKLVNT TAWKAQNPVL
ULBP3	HGQQWCEVQS	QVDQKNFLSY	DCGSDKVLSM	GHLEEQLYAT DAWGKQLEML
ULBP4	PGQPWCEAVQ	FLNKNLFLQY	NSDNNMVKPL	GLLGKKVYAT STWGFELQTL
	45			94

ULBP1	RDVVDLFGQ	LLDIQVENLIPIE	PLTLQAR	MSCEHEAHGH	GRGSWQFLFN
ULBP2	REVVDILTEQ	LRDIQLENYTPKE	PLTLQAR	MSCEQKAEKH	SSGSWQFSFD
ULBP3	REVGQRLRLE	LADTELEDFTPSG	PLTLQVR	MSCECEADGY	IRGSWQFSFD
ULBP4	GEVGRDLRML	LCDIK.PQIKTSD	PSTLQVE	MFCQREAEER	TGASWQFATN
	95	113	117		143

α 2ドメイン					
ULBP1	GQKFLFLFDSN	NRKWTALHPG	AKKMTKEKWEK	NRDVTMFFQK	ISLGDCMWWL
ULBP2	GQIFLLFDSE	KRMWTVVHPG	ARKMKEKWEK	DKVVAMSFHY	FMSGDCIGWL
ULBP3	GRKFLFLFDSN	NRKWTVVHAG	ARRMKEKWEK	DSGLTFFFKM	VSMRCKSWL
ULBP4	GEKSLLFDAM	NMTWTVINHE	ASKIKETWKK	DRGLEKYFRK	LSKGDCDHWL
	144				193

GPIアンカーシグナル					
ULBP1	EEFLMYWEQM	LDPT..	KPPS LAPGTTQPKA	MATTLSPWSL	LIIFLCFILA
ULBP2	EDFLMGMDST	LEPSAG	APLA MSSGTTQLRA	TATTLILCCL	LIILPCFILP
ULBP3	RDFLMHRKKR	LEPT..	APPT MAPGLAQPKA	IATTLSPWSF	LIIL.CFILP
ULBP4	REFLGHWEAM	PEPT..	..VS PVNASDIHWS	SSSLPDRWII	LGAFILLVLM
	194		211		239

--TMドメイン--

ULBP1	GR*~~~~~	~~~~~	~~~~~	(配列番号3)
ULBP2	GI*~~~~~	~~~~~	~~~~~	(配列番号4)
ULBP3	GI*~~~~~	~~~~~	~~~~~	(配列番号5)
ULBP4	GIVLICVWQ	NGEWQAGLWP	LRTS*	(配列番号2)
	240		263	

【0142】

50

注：番号付けは、ULBP4のアミノ酸配列にしたがっている。

* ULB4シグナル配列の潜在的な末端

(実施例3)

NK受容体へのULBP4の結合

NKG2D細胞表面受容体は、NKキラー細胞のULBPによる活性化を仲介する(Cosmanら(2001), *Immunity* 14:123-133)。Cosmanら、上記に記載される一般的な方法にしたがって、組換えNKG2D受容体を発現しているCV-1細胞に結合する能力に関して、実施例1および2のULBP4ポリペプチドを解析した。

【0143】

ヒトおよびネズミNKG2D-Fcを発現しているFc融合タンパク質構築物を調製し、CV-1細胞で発現させ、そしてクロマトグラフィー(プロテインA-Porosカラム、PerSeptive Biosystems)によって、培養上清から融合タンパク質を精製した。Fc融合タンパク質は、修飾ヒトIgG1 Fc領域のヒンジ領域のアミノ末端に融合させた、目的のタンパク質の細胞外ドメインを含有し(Baumら(1994), *EMBO J.* 13:3992-4001)、そしてこのFc融合タンパク質を哺乳動物発現ベクターpDC409(Giriら(1994), *EMBO J.* 13:2822-2830)内にサブクローニングした。

【0144】

UL16-Fc融合タンパク質は、Fc領域にアミノ酸183の後で融合させたUL16の細胞外ドメインを含有した。NKG2D-Fc融合タンパク質は、Fc領域にアミノ酸74で融合させたNKG2Dの細胞外領域を含有した。これらの可溶性融合タンパク質を、記載されるように調製した(Cosmanら(2001), *Immunity* 14:123-133)。

【0145】

全長ULBP1、ULBP2、ULBP3、およびULBP4を発現しているcDNAを含有するpDC409ベクター、並びに、空ベクター対照を、CV-1細胞にトランスフェクションした。次いで、トランスフェクトされた細胞を、3%ウシ胎児血清を含有するリン酸緩衝生理食塩水中のヒトまたはネズミNKG2D-FcまたはUL16-Fcとインキュベーションした。示した融合タンパク質と、氷上で1時間インキュベーションした後、細胞を2回洗浄し、そしてフィコエリトリン(PE)にコンジュゲート化したヤギ抗ヒトIgG(Fc特異的)抗体(Sigma、ウイスコンシン州ミルウォーキー)とインキュベーションした。細胞を2回洗浄し、そしてBecton Dickinson FACSscan中、フローサイトメトリーによって結合に関して解析した。バックグラウンドを越えて1対数~2対数の間の蛍光を生じる細胞(バックグラウンドは、第二の工程の試薬のみで染色した細胞から生じる蛍光の量として得た)を++と特徴付けた。より強く蛍光を生じる細胞を+++とスコア付けした。バックグラウンドより高い蛍光を生じるが、バックグラウンドを越えて1対数未満である細胞を+と特徴付けた。

【0146】

以下の表4に示すように、ULBP4は、ULBP3の結合活性と類似のパターンで、ヒトNKG2D-Fcに強く、そして特異的に結合した。ULBP1、ULBP2、およびULBP3各々と同様、新規タンパク質ULBP4は、ヒトNKキラー細胞受容体、NKG2Dに結合した。この結合活性を、ULBP1、ULBP2、およびULBP3との構造的同一性が高い度合いであることと合わせて考慮すると、ULBP4が、NKG2D受容体の結合を介して免疫エフェクター細胞を刺激するULBPタンパク質ファミリーに属することが確かめられる。

【0147】

表4

結合結果

【0148】

10

20

30

40

50

【表 4】

	ヒト NKG2D-Fc	ネズミ NKG2D-Fc	UL16-Fc
ULBP1	+++	+++	+++
ULBP2	+++	+++	++
ULBP3	+++	陰性	陰性
ULBP4	+++	+	陰性
空の409ベクター	陰性	陰性	陰性

【0149】

(実施例4)

NK細胞が仲介する細胞毒性の、ULBPタンパク質による増進

この実験は、 ^{51}Cr 標識標的細胞の表面上のULBPタンパク質の発現が、NKエフェクター細胞による標的細胞の殺傷を増進可能であるかどうかを決定するために設計された、 ^{51}Cr 放出アッセイである。

【0150】

ヒトNK細胞は、Robertsonら(1996), Exp. Hematol. 24:406-15)に記載されるヒトNK細胞株NKL由来である。ネズミNK細胞は、以下のように、C57/B6 SCIDマウスから得た。マウスを屠殺し、そして脾臓を取り除き、そして押しつぶして細胞を放出させた。この細胞は、主に赤血球、B細胞、T細胞、およびNK細胞からなった。155mM NH_4Cl 、16.5mM Tris-HCl 、pH7.4中、放出させた細胞を室温で2分間インキュベーションし、そして赤血球を選択的に溶解して、他の細胞の大部分を損なわれない(intact)ままにするため、培地中で迅速に洗浄した。NK細胞の拡大を刺激するため、1ミリリットルあたり200ナノグラムの組換えヒトIL-15(米国特許第5,574,138号、該特許では、IL-15は「上皮由来T細胞因子」と称される、およびEP 0772624に記載)を含有する培地1ミリリットルあたり200万細胞で、残った細胞を3日間培養した。第3日、ネズミNK細胞上で発現されるネズミNKG2Dに特異的に結合する抗体で細胞を染色して、細胞の何パーセントがNK細胞であるかを決定した。少なくとも約80%の細胞が、ネズミNKG2Dに対する抗体で染色される培養が、第4日の細胞毒性アッセイで使用するのに適している。

【0151】

標的細胞は、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手可能なリンパ腫細胞株であるEL4細胞であり、該細胞は、全長ヒトULBP1、ULBP2、ULBP3、またはULBP4タンパク質をコードする核酸でトランスフェクションされていないかまたはトランスフェクションされている。トランスフェクションされていないEL4細胞は、ヒトULBP1、ULBP2、ULBP3、またはULBP4タンパク質を発現しない。標的細胞には、培地中、 ^{51}Cr を約1時間与え、そして続いて洗浄した。

【0152】

総体積200 μl 中、96ウェルマイクロタイタープレート中でアッセイを行った。ヒトNKエフェクター細胞に関しては、以下のエフェクター：標的細胞比で、多様な数のNK(すなわちエフェクター)細胞と 10^4 標的細胞を、5% CO_2 中、37 $^\circ\text{C}$ で2~3時間インキュベーションした：5:1、2.5:1、1.25:1、または0.6:1。ネズミヒトNKエフェクター細胞に関しては、以下のエフェクター：標的細胞比で、多様な数のNK(すなわちエフェクター)細胞と 5×10^3 標的細胞を、5% CO_2 中、37 $^\circ\text{C}$ で2~3時間インキュベーションした：20:1、10:1、5:1、または2.5:1。陰性対照として、エフェクター細胞なしで標的細胞をインキュベーションした。陽性対照として、標的細胞を界面活性剤で溶解した。培地中に放出された放射能を、ガンマカウンター中で計測した。実験試料の放出放射能から陰性対照の放出放射能を減じて、陽性対照の

10

20

30

40

50

放出放射能から陰性対照の放出放射能を減じたもので割り、100を掛けて、細胞毒性パーセントを計算した。結果を図1および2に示す。

【0153】

図1は、標的細胞表面上にヒトULBP1、ULBP2、またはULBP4タンパク質が発現すると、ネズミNK細胞の細胞毒性が増進可能であることを示す。図2は、標的細胞表面上にヒトULBP1、ULBP2、またはULBP4タンパク質が発現すると、ヒトNK細胞の細胞毒性が増進可能であることを示す。

【0154】

(実施例5)

NK細胞へのULBP4の可溶性型の結合

以下の実験を行って、ヒトULBP4タンパク質の可溶性型がヒトNK細胞に結合可能であるかどうかを決定した。

【0155】

ULBP4:Fc融合タンパク質をコードする2つの異なる構築物を生成した。一方は、配列番号2の1位から開始して、そして217位で終わるULBP4:Fcタンパク質をコードした(ULBP4:Fc-B)。もう一方は、配列番号2の1位から開始して、そして224位で終わるULBP4タンパク質をコードした(ULBP4:Fc-A)。これらのULBP4タンパク質をどちらも、そのカルボキシ末端で、ヒトIgG1抗体のFc領域に融合させた。タンパク質をコードする構築物をトランスフェクションした哺乳動物細胞の培地から、これらのULBP4:Fc融合タンパク質、加えて対照として用いるULBP1:Fc融合タンパク質を、プロテインAクロマトグラフィーによって精製した。これらのULBP4タンパク質のアミノ末端配列の解析によって、配列番号2のHis31が、これらのタンパク質の成熟型のアミノ末端であることが示された。

【0156】

2つの異なるドナーから、ヒトNK細胞を単離し、そしてKubinら((2001), Eur. J. Immunol. 31:1428-37)に記載されるように、組換えヒトIL-15で一晩刺激した。約100万のNK細胞を1μgのタンパク質(ULBP4:Fc-A、ULBP4:Fc-B、またはULBP1:Fcいずれか)と、0で30分間プレインキュベーションした。NK細胞を続いて洗浄し、ヒトIgG抗体のFc領域に特異的な蛍光標識抗体で染色し、そしてフローサイトメトリーによって解析した。陰性対照として、いかなるタンパク質ともプレインキュベーションしていないNK細胞を、実験試料同様に洗浄し、染色し、そして解析した。一方のドナー由来のNK細胞を用いた試料の平均蛍光強度を表5に示す。他方のドナー由来のNK細胞を用いた値も同様である。

【0157】

表5

【0158】

【表5】

プレ・インキュベーションタンパク質	平均蛍光強度
なし	6
ULBP4:Fc-A	10
ULBP4:Fc-B	20
ULBP1:Fc	35

【0159】

これらのデータによって、ULBP4:Fc-BがNK細胞に結合可能であり、一方、ULBP4:Fc-Aは、結合するとしてもより低い度合いで結合することが示される。

(実施例6)

10

20

30

40

50

in vivoでの野生型マウスにおける、ULBPが仲介する腫瘍拒絶

以下の実験は、ネズミ腫瘍細胞表面上のULBPタンパク質の発現が、in vivoで腫瘍拒絶に役割を果たす可能性があるかどうかを試験する。

【0160】

マウスに注射した際、EL4細胞は腫瘍を引き起こす可能性がある。EL4細胞は、NKG2Dリガンドを発現しない。Dieffenbachら(2000), Nature Immunology 1(2):119-26. EL4細胞に、ULBP1、ULBP2、ULBP3、RAE-1 (ネズミNKG2Dリガンド; Dieffenbachら、上記)、またはネズミIL-4受容体の一部切除型(IL-4R)いずれかを、培養中にトランスフェクションした。IL-4Rは、in vivoで腫瘍拒絶を仲介するとは期待されず、そして陰性対照として意図された。第0日、ULBP1、ULBP2、ULBP3、RAE-1、またはIL-4Rいずれかを発現している 3×10^5 EL4腫瘍細胞を、C57/B6マウスに皮下注射した。15日の期間に渡って、腫瘍サイズを測定した。第15日の腫瘍発生率を表6に示す。図3において、平均腫瘍サイズを時間に対してグラフにしている。

【0161】

表6

【0162】

【表6】

EL4細胞にトランスフェクションした遺伝子	腫瘍発生率 (腫瘍を有するマウス数/ 注射したマウスの総数)
IL-4R	6/6
ULBP1	1/7
ULBP2	0/6
ULBP3	0/7
RAE-1 β	1/7

【0163】

これらのデータによって、ULBP類またはRAE-1を発現している細胞を含んでなるマウス中の腫瘍は、これらのNKG2Dリガンドを発現しない腫瘍に比較して、in vivoで優先的に拒絶されることが示される。

【0164】

(実施例7)

in vivoでのscidマウスにおける、ULBPが仲介する腫瘍拒絶

以下の実験を設計して、上記の実施例6で観察される腫瘍拒絶が、B細胞および/またはT細胞の作用に依存するかどうかを決定した。

【0165】

ULBP1、ULBP2、ULBP3、またはRAE-1いずれかをトランスフェクションしないか、またはトランスフェクションした、約 3×10^5 EL4細胞を、重症複合型免疫不全症を与える突然変異を所持するC57/B6マウス(scidマウス)に注射した。10匹のマウスに各種類の細胞を注射した。scidマウスは、発生中のリンパ球においてDNA再編成の欠失を示し、そして成熟B細胞およびT細胞を非常に少ししか持たない。Janewayら, Immunobiology, 第5版, パートV, Garland Publishing, ニューヨークおよびロンドン(2001)。第1日~第24日に腫瘍サイズを測定し、そして図4において、腫瘍サイズを時間に対してグラフにしている。これらのデータによって、RAE-1またはULBPのトラン

スフェクションに依存する腫瘍拒絶が、野生型マウスとともに、s c i dマウスで起こることが示される。したがって、こうした腫瘍拒絶は、B細胞および/またはT細胞の作用に依存しないようである。

【0166】

本発明は、特定の実施例に言及して記載されてきている。これらの実施例は、いかなる点でも、本発明を限定することを意味しない。この開示の目的のため、十分に本発明の範囲内である、多様な変化および修飾を本発明に行うことが可能であると理解される。当業者に容易に思い浮かぶであろう、そして本明細書に開示する本発明の精神に含まれ、そして付随する請求項に定義されるような、多くの他の変化も行うことが可能である。

【0167】

本明細書は、特許、特許出願、および刊行物に対する数多くの引用を含有する。各々は、すべての目的のため、本明細書に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0168】

【図1】図1は、エフェクター細胞：標的細胞比の関数として、 ^{51}Cr 標識非トランスフェクションEL4細胞、または示したULBPタンパク質をコードする核酸をトランスフェクションした ^{51}Cr 標識EL4細胞いずれかの標的細胞と組み合わせた際の、ネズミNK細胞（エフェクター細胞）の細胞毒性パーセントを示す。

【図2】図2は、エフェクター細胞：標的細胞比の関数として、 ^{51}Cr 標識非トランスフェクションEL4細胞、または示したULBPタンパク質をコードする核酸をトランスフェクションした ^{51}Cr 標識EL4細胞いずれかの標的細胞と組み合わせた際の、ヒトNK細胞（エフェクター細胞）の細胞毒性パーセントを示す。

【図3】図3は、野生型マウスに、示したタンパク質をコードする核酸をトランスフェクションしたEL4細胞を注射した後の日数の関数としての平均腫瘍サイズを示す。

【図4】図4は、s c i dマウスに、非トランスフェクションEL4細胞、または示したタンパク質をコードする核酸をトランスフェクションしたEL4細胞を注射した後の日数の関数としての腫瘍サイズを示す。

【配列表】

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> IMMUNEX CORPORATION
Cosman, David J.

<120> UL16 BINDING PROTEIN 4

<130> 3205-WO

<140> --to be assigned-- ;

<141> 2002-10-04

<150> US 60/327,252

<151> 2001-10-04

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 792

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
atgccaagaa taccctgac ttctagcctt gtggccttc ttttgtttct gctgttgcta 60
ctaatagcct tggagatcat ggttgggtgt cactctcttt gcttcaactt cactataaaa 120
tcattgtcca gacctggaca gccctgggtg gaagcgcagg tcttcttgaa taaaaatctt 180
ttccttcagt acaacagtga caacaacatg gtcaaacctc tgggcctcct ggggaagaag 240
gtatatgcca ccagcacttg gggagaattg acccaaaccg tgggagaagt ggggcgagac 300
ctcaggatgc tctttgtga catcaaacc cagataaaga ccagtgatcc ttccactctg 360
caagtcgaga tgtttgtca acgcgaagca gaacggtgca ctggtgcatc ctggcagttc 420
gccaccaatg gagagaaatc cctcctcttt gacgcaatga acatgacctg gacagtaatt 480
aatcatgaag ccagtaagat caaggagaca tggaagaaag acagagggct ggaaaagtat 540
ttcaggaagc tctcaaaggg agactgcgat cactggctca ggaattctt agggcactgg 600
gaggcaatgc cagaaccgac agtgcaacca gtaaagtctt cagatatcca ctggtcttct 660
tctagtctac cagatagatg gatcatcctg gggcattca tctgttagt tttaatggga 720
attgttctca tctgtgtctg gtggcaaat ggtgagtggc aggctggtct ctggcccttg 780
aggacgtctt ag 792

<210> 2

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

20

30

40

<400> 2

Met Arg Arg Ile Ser Leu Thr Ser Ser Pro Val Arg Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Ala Leu Glu Ile Met Val Gly Gly His Ser
20 25 30

Leu Cys Phe Asn Phe Thr Ile Lys Ser Leu Ser Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Trp Cys Glu Ala Gln Val Phe Leu Asn Lys Asn Leu Phe Leu Gln Tyr
50 55 60

Asn Ser Asp Asn Asn Met Val Lys Pro Leu Gly Leu Leu Gly Lys Lys
65 70 75 80

Val Tyr Ala Thr Ser Thr Trp Gly Glu Leu Thr Gln Thr Leu Gly Glu
85 90 95

Val Gly Arg Asp Leu Arg Met Leu Leu Cys Asp Ile Lys Pro Gln Ile
100 105 110

Lys Thr Ser Asp Pro Ser Thr Leu Gln Val Glu Met Phe Cys Gln Arg
115 120 125

Glu Ala Glu Arg Cys Thr Gly Ala Ser Trp Gln Phe Ala Thr Asn Gly
130 135 140

Glu Lys Ser Leu Leu Phe Asp Ala Met Asn Met Thr Trp Thr Val Ile
145 150 155 160

Asn His Glu Ala Ser Lys Ile Lys Glu Thr Trp Lys Lys Asp Arg Gly
165 170 175

Leu Glu Lys Tyr Phe Arg Lys Leu Ser Lys Gly Asp Cys Asp His Trp
180 185 190

Leu Arg Glu Phe Leu Gly His Trp Glu Ala Met Pro Glu Pro Thr Val
195 200 205

Ser Pro Val Asn Ala Ser Asp Ile His Trp Ser Ser Ser Ser Leu Pro
210 215 220

Asp Arg Trp Ile Ile Leu Gly Ala Phe Ile Leu Leu Val Leu Met Gly
225 230 235 240

10

20

30

40

Ile Val Leu Ile Cys Val Trp Trp Gln Asn Gly Glu Trp Gln Ala Gly
 245 250 255

Leu Trp Pro Leu Arg Thr Ser
 260

<210> 3
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

10

Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Ala Phe Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

His Leu Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Trp Val Asp Thr His Cys
 20 25 30

Leu Cys Tyr Asp Phe Ile Ile Thr Pro Lys Ser Arg Pro Glu Pro Gln
 35 40 45

Trp Cys Glu Val Gln Gly Leu Val Asp Glu Arg Pro Phe Leu His Tyr
 50 55 60

20

Asp Cys Val Asn His Lys Ala Lys Ala Phe Ala Ser Leu Gly Lys Lys
 65 70 75 80

Val Asn Val Thr Lys Thr Trp Glu Glu Gln Thr Glu Thr Leu Arg Asp
 85 90 95

Val Val Asp Phe Leu Lys Gly Gln Leu Leu Asp Ile Gln Val Glu Asn
 100 105 110

Leu Ile Pro Ile Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu
 115 120 125

30

His Glu Ala His Gly His Gly Arg Gly Ser Trp Gln Phe Leu Phe Asn
 130 135 140

Gly Gln Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr Ala
 145 150 155 160

Leu His Pro Gly Ala Lys Lys Met Thr Glu Lys Trp Glu Lys Asn Arg
 165 170 175

40

Asp Val Thr Met Phe Phe Gln Lys Ile Ser Leu Gly Asp Cys Lys Met
180 185 190

Trp Leu Glu Glu Phe Leu Met Tyr Trp Glu Gln Met Leu Asp Pro Thr
195 200 205

Lys Pro Pro Ser Leu Ala Pro Gly Thr Thr Gln Pro Lys Ala Met Ala
210 215 220

Thr Thr Leu Ser Pro Trp Ser Leu Leu Ile Ile Phe Leu Cys Phe Ile
225 230 235 240

10

Leu Ala Gly Arg

<210> 4
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Ala Ala Ala Thr Lys Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

20

Leu Leu Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Arg Ala Asp Pro His Ser
20 25 30

Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg
35 40 45

Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr
50 55 60

Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys
65 70 75 80

30

Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu
85 90 95

Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile Gln Leu Glu Asn
100 105 110

Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu
115 120 125

Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp
130 135 140

40

Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr
 145 150 155 160

Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys
 165 170 175

Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly
 180 185 190

Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser
 195 200 205

10

Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser Gly Thr Thr Gln Leu Arg Ala
 210 215 220

Thr Ala Thr Thr Leu Ile Leu Cys Cys Leu Leu Ile Ile Leu Pro Cys
 225 230 235 240

Phe Ile Leu Pro Gly Ile
 245

<210> 5
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 5

Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Ala Ile Leu Pro Arg Leu Ala Ile Leu
 1 5 10 15

Pro Tyr Leu Leu Phe Asp Trp Ser Gly Thr Gly Arg Ala Asp Ala His
 20 25 30

Ser Leu Trp Tyr Asn Phe Thr Ile Ile His Leu Pro Arg His Gly Gln
 35 40 45

30

Gln Trp Cys Glu Val Gln Ser Gln Val Asp Gln Lys Asn Phe Leu Ser
 50 55 60

Tyr Asp Cys Gly Ser Asp Lys Val Leu Ser Met Gly His Leu Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Leu Tyr Ala Thr Asp Ala Trp Gly Lys Gln Leu Glu Met Leu Arg
 85 90 95

Glu Val Gly Gln Arg Leu Arg Leu Glu Leu Ala Asp Thr Glu Leu Glu
 100 105 110

Asp Phe Thr Pro Ser Gly Pro Leu Thr Leu Gln Val Arg Met Ser Cys
 115 120 125

Glu Cys Glu Ala Asp Gly Tyr Ile Arg Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe
 130 135 140

Asp Gly Arg Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr
 145 150 155 160

10

Val Val His Ala Gly Ala Arg Arg Met Lys Glu Lys Trp Glu Lys Asp
 165 170 175

Ser Gly Leu Thr Thr Phe Phe Lys Met Val Ser Met Arg Asp Cys Lys
 180 185 190

Ser Trp Leu Arg Asp Phe Leu Met His Arg Lys Lys Arg Leu Glu Pro
 195 200 205

Thr Ala Pro Pro Thr Met Ala Pro Gly Leu Ala Gln Pro Lys Ala Ile
 210 215 220

20

Ala Thr Thr Leu Ser Pro Trp Ser Phe Leu Ile Ile Leu Cys Phe Ile
 225 230 235 240

Leu Pro Gly Ile

<210> 6
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> "Xaa is unknown"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (123)..(124)
 <223> "Xaa is unknown"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (166)..(166)
 <223> "Xaa is unknown"

40

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> {176}..(176)
<223> "Xaa is unknown"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (179)..(179)
<223> "Xaa is unknown"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (205)..(205)
<223> "Xaa is unknown"

10

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (207)..(207)
<223> "Xaa is unknown"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (211)..(211)
<223> "Xaa is unknown"

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (215)..(215)
<223> "Xaa is unknown"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (222)..(222)
<223> "Xaa is unknown"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (225)..(226)
<223> "Xaa is unknown"

30

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (237)..(237)
<223> "Xaa is unknown"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (252)..(253)
<223> "Xaa is unknown"

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (256)..(257)
 <223> "Xaa is unknown"

<400> 6

Met Arg Arg Ile Ser Leu Thr Ser Ser Pro Val Arg Leu Leu Leu Xaa
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Ala Leu Glu Ile Met Val Gly Gly His Ser
 20 25 30

10

Leu Cys Phe Asn Phe Thr Ile Lys Ser Leu Ser Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Trp Cys Glu Ala His Val Phe Leu Asn Lys Asn Leu Phe Leu Gln Tyr
 50 55 60

Asn Ser Asp Asn Asn Met Val Lys Pro Leu Gly Leu Leu Gly Lys Lys
 65 70 75 80

Val Tyr Ala Thr Ser Thr Trp Gly Glu Leu Thr Gln Thr Leu Gly Glu
 85 90 95

20

Val Gly Arg Asp Leu Arg Met Leu Leu Cys Asp Ile Lys Pro Gln Ile
 100 105 110

Lys Thr Ser Asp Pro Ser Thr Leu Gln Val Xaa Xaa Phe Cys Gln Arg
 115 120 125

Glu Ala Glu Arg Cys Thr Gly Ala Ser Trp Gln Phe Ala Thr Asn Gly
 130 135 140

Glu Lys Ser Leu Leu Phe Asp Ala Met Asn Met Thr Trp Thr Val Ile
 145 150 155 160

30

Asn His Glu Ala Ser Xaa Ile Lys Glu Thr Trp Lys Lys Asp Arg Xaa
 165 170 175

Leu Glu Xaa Tyr Phe Arg Lys Leu Ser Lys Gly Asp Cys Asp His Trp
 180 185 190

Leu Arg Glu Phe Leu Gly His Trp Glu Ala Met Pro Xaa Pro Xaa Val
 195 200 205

40

Ser Pro Xaa Asn Ala Ser Xaa Ile His Trp Ser Ser Ser Xaa Leu Pro
 210 215 220

Xaa Xaa Trp Ile Ile Leu Gly Ala Phe Ile Leu Leu Xaa Leu Met Gly
 225 230 235 240

Ile Val Leu Ile Cys Val Trp Trp Gln Asn Gly Xaa Xaa Ser Thr Xaa
 245 250 255

Xaa

10

<210> 7
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 7
 tatgtcgcacc tccacagtat gogaagaata tccttg

36

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> primer

<400> 8
 ataggcggcc gcagactaag acgtcctcaa

30

<210> 9
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

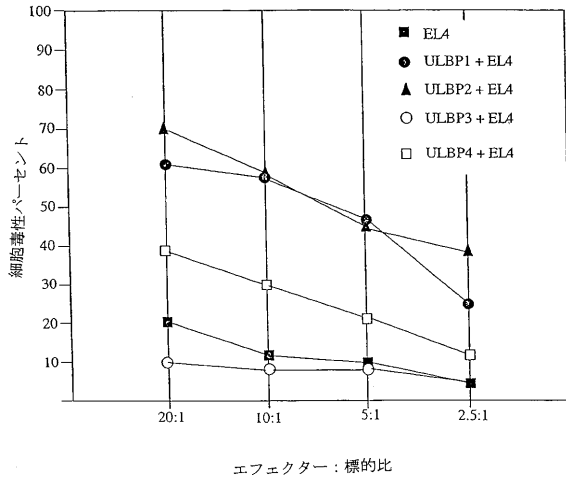
30

<220>
 <223> probe

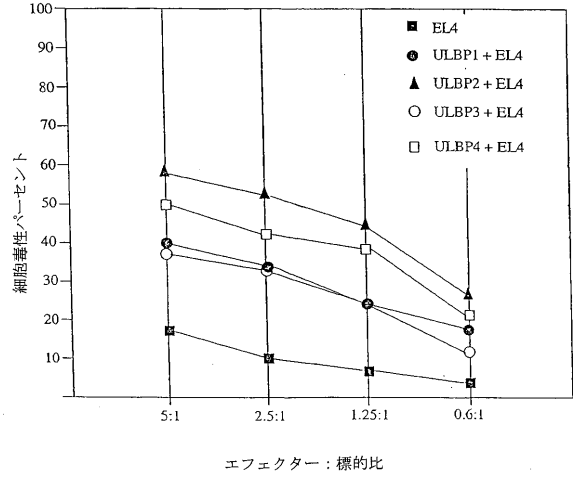
<400> 9
 gagtggcagg ctggtctctg gcccttgagg acgtcttag

39

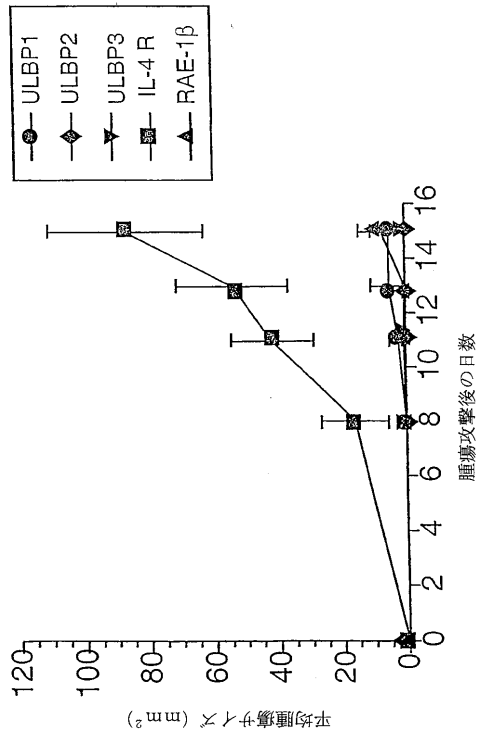
【 図 1 】



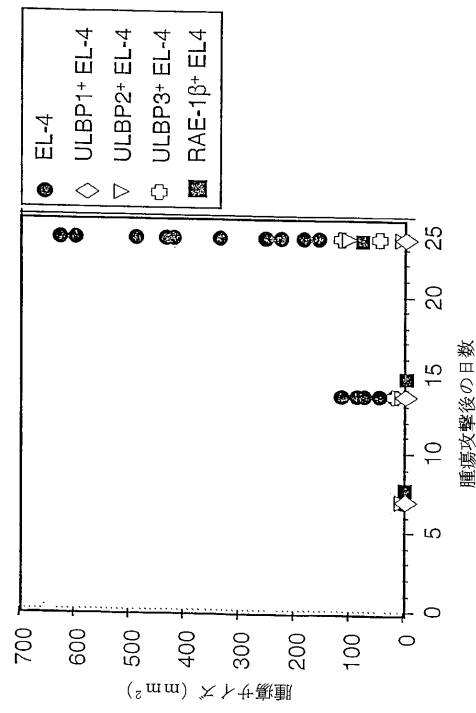
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/31994
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12P 1/00, 21/06; C12N 1/20, 5/00, 15/00; G01N 33/00, C07K 1/00, 14/00, 17/00; C07H 21/04 US CL : 435/41, 69.1, 252.3, 320, 325+; 436/86; 530/350; 536/23.4, 23.5 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) U.S. : 435/41, 69.1, 252.3, 320, 325+; 436/86; 530/350; 536/23.4, 23.5		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, SCISEARCH, MEDLINE, USPTO WEST, GENBANK		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	Database GenBank, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. AAY36021, BOUGUELERET et al., September 1999. 'New isolated human secreted proteins'. WO9931236-A2, 17 December 1999.	1-3, 5, 9, 10-11
X --- Y	Database GenBank, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. AX191626, KATO et al., August 2001 'Human proteins having hydrophobic domains and dnas encoding these proteins'.	16, 18-20, 26
X --- Y	Database GenBank, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. AAX97755, BOUGUELERET et al., September 1999 'New isolated human secreted proteins'. WO9931236-A2, 13 September 1999.	16, 18-20, 26
X --- Y	Database GenBank, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. AAD12613, KATO et al., September 2001. 'Human proteins with hydrophobic domains and the nucleic acids encoding them, useful for preventing diagnosing and treating e.g. cancer, Alzheimer's and inflammation-'. WO200149728-A2, 28 Decemer 2000.	16, 18-20, 26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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 application or patent 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	"&" 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 12 May 2003 (12.05.2003)		Date of mailing of the international search report 23 MAY 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Manjunath N. Rao Telephone No. 703-306-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31994

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	Database GenBank, US National Library of Medicine, (Bethesda, MD, USA) No. B1258059, NIH-MCG, July 2001. 'National Institutes of Health, Mammalian Gene Collection (MGC)'.	16, 18-20, 26
X,E	US 2003/0004311 A1 (BAKER et al.) 02 January 2003 (02.01.2003), Total pages 643 (Jumbo Document) see SEQ ID NO:104.	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/31994

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-28

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31994

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-28, drawn to polynucleotides and polypeptides, vectors, host cells and a method of making the polypeptide.

Group II, claim(s) 29-33, drawn to an antibody.

Group III, claim(s) 34-38, drawn to a method for activating cells that express NKG2D.

Group IV, claim(s) 39-40, drawn to a method of down-modulating an immune response using the antibody.

Group V, claim(s) 41, drawn to a method of detecting or quantitating a protein.

Group VI, claim(s) 42, drawn to a method of inhibiting tumor growth using the polypeptide.

Group VII, claim(s) 43-45, drawn to a method of inhibiting growth of tumor cells.

Group VIII, claim(s) 46-47, drawn to a method of treating an infection using the polypeptide.

The inventions listed as Groups I-VIII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group I) comprises the first-recited product, a polypeptide a polynucleotide encoding the polypeptide, a vector, a host cell, a method for producing the polypeptide. Further pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/06	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/566	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	E
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(74) 代理人 100107386
弁理士 泉谷 玲子

(72) 発明者 コスマン, デービッド・ジェイ
アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 1 0 , ベインブリッジ・アイランド, ノースイースト, マンダ
ス・オルソン・ロード 9 8 0 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA04 CA07 DA01 DA02 DA05 DA11 GA11
HA08
4B064 AG26 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20 CC24 DA05 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA07 BA22 CA53 CA56 CA59 MA52 MA55 MA66 NA14 ZB261
ZB331 ZC781
4C085 AA13 AA16 AA21 BB11 DD22 DD23 EE01 GG01 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA75 EA20 EA51
FA74

专利名称(译)	UL 16结合蛋白4		
公开(公告)号	JP2005523681A	公开(公告)日	2005-08-11
申请号	JP2003532654	申请日	2002-10-04
[标]申请(专利权)人(译)	CORP Immunex公司 株式会社Immunex公司		
申请(专利权)人(译)	NEX了Immunex公司		
[标]发明人	コスマンデービッドジェイ		
发明人	コスマン,デービッド・ジェイ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/12 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 C07H21/04 C07K1/00 C07K14/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/74 C07K16/18 C07K16/28 C07K17/00 C12N C12N1/15 C12N1/19 C12N1/20 C12N1/21 C12N5/00 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P1/00 C12P21/02 C12P21/06 G01N33/00 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.A A61K39/395.D A61P31/12 A61P35/00 C07K14/47.ZNA C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/GA11 4B024/HA08 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA07 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZC781 4C085/AA13 4C085/AA16 4C085/AA21 4C085/BB11 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/327252 2001-10-04 US		
其他公开文献	JP2005523681A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

ULBP 4是ULBP系列的新成员，已被隔离和表征。 ULBP4是免疫效应细胞，尤其是NK细胞的有用激活剂。

