

(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2006-514024

(P2006-514024A)

(43) 公表日 平成18年4月27日(2006.4.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T 4 B 0 6 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E 4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Q 4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-561407 (P2004-561407)	(71) 出願人	504022515 イネイト・ファーマ INNATE PHARMA フランス国、エフ-13009 マルセイユ、アンシヤン・シュマン・デ・カシ、イムブル・グラン・プレ 121
(86) (22) 出願日	平成15年12月22日 (2003.12.22)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月17日 (2005.6.17)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/014716	(72) 発明者	ロマネ, フランソワ フランス国、エフ-13600 ラ・シオタ、レ・オー・ドゥ・フォンサント、バ・アー3
(87) 国際公開番号	W02004/056392		
(87) 国際公開日	平成16年7月8日 (2004.7.8)		
(31) 優先権主張番号	60/435,344		
(32) 優先日	平成14年12月23日 (2002.12.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NK細胞の増殖に対する効果を有する医薬組成物及びそれを使用する方法

(57) 【要約】

本発明はNK細胞の増殖に対する効果を有する医薬組成物、NK細胞の増殖を特異的に刺激するための方法及び例えば黒色腫、肝癌又は肺腺癌の抗腫瘍予防、抗腫瘍寛解及び抗腫瘍治療用並びに抗微生物予防、抗微生物寛解及び抗微生物治療用の薬物の製造におけるその使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量の、抗 N C R 抗体、例えば、抗 N K p 3 0 抗体もしくは抗 N K p 4 6 抗体もしくはその両方を含む群から選ばれる少なくとも 1 種の抗体又はその免疫反応性断片、及びインターロイキン、例えば、I L 2、I L 1 2、I L 1 5、I L 2 1 又はその組み合わせを含む群から選ばれるサイトカインを、薬学的に許容されうる担体と共に含み、該抗体及びサイトカインは対象に対して一緒に投与されるか又は別々に投与される、N K 細胞の増殖に対する刺激効果を有する医薬組成物。

【請求項 2】

該抗 N K p 3 0 抗体及び / 又は抗 N K p 4 6 抗体を I L 2 と混合して使用する、請求項 1 に記載の医薬組成物。 10

【請求項 3】

該抗 N K p 3 0 抗体が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 又はその免疫原性断片及び配列番号 5 よりなる群から選ばれるポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

該抗体が配列番号 1 を有するポリペプチドに特異的に結合する、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

該抗 N K p 3 0 抗体及び / 又は抗 N K p 4 6 抗体が、モノクローナル抗体、アフイニティ抗体、キメラ化抗体又はヒト化抗体であり、そして、更に好ましくは、ヒト化マウスモノクローナル抗体であるか又はヒト起源のものである、請求項 1 に記載の医薬組成物。 20

【請求項 6】

該抗 N K p 3 0 モノクローナル抗体がハイブリドーマ株 I - 2 5 7 6 により産生される、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

実質的に F a b、F (a b ')₂、F v 断片及び C D R グラフトされたヒト化モノクローナル抗体である抗体断片を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内又は皮下注射、鼻腔内経路及び外科経路を含む種々の経路により投与される、請求項 1 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 9】

錠剤、粉末剤、ペースト剤、パッチ剤、顆粒剤、微小顆粒剤、ナノ粒子剤、コロイド溶液剤、水性溶液剤、注射可能溶液剤、噴霧剤及びリポソーム剤の形態下にある、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

例えば、黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、肝癌、肺腺癌、神経芽細胞腫の予防、寛解、治療のため並びに抗微生物予防、抗微生物寛解及び抗微生物治療のための、毎日の皮下注射用に使用されるとき、1 ng ~ 1 0 0 mg / kg (体重) の抗体及び百万単位 / 平方メートル / 日より少ないサイトカインを含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。 40

【請求項 11】

N K 細胞を有効量の請求項 1 に記載の医薬組成物と接触させることを含む、N K 細胞の増殖を刺激するための方法。

【請求項 12】

有効量の、抗 N C R 抗体、例えば、抗 N K p 3 0 抗体もしくは抗 N K p 4 6 抗体もしくはその両方を含む群から選ばれる少なくとも 1 種の抗体又はその免疫反応性断片の 1 回以上の注射、及びインターロイキン、例えば、I L 2、I L 1 2、I L 1 5、I L 2 1 又はそれらの組み合わせを含む群から選ばれるサイトカインの反復注射を 5 ~ 1 0 日間行い、該サイトカインを抗体の最初の注射と同じ日に最初に注射することを含む、請求項 11 に 50

記載の方法。

【請求項 13】

皮下経路によりサイトカインを 1 日に 1 回又は 2 回注射することを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

該インターロイキンが IL2 でありそして該インターロイキンを百万単位 / m² より低い一日量で 5 ~ 10 日間皮下注射する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

例えば、黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、肝癌、肺腺癌、神経芽細胞腫の予防、寛解及び治療用並びに抗微生物防止、抗微生物寛解及び抗微生物治療用の薬物の製造における請求項 1 に記載の医薬組成物の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、NK細胞の増殖に対する効果を有する医薬組成物、NK細胞の増殖を特異的に刺激するための方法及び例えば、黒色腫、肝癌、又は肺腺腫の抗腫瘍予防、抗腫瘍寛解及び抗腫瘍治療用並びに抗微生物予防、抗微生物寛解及び抗微生物治療用の薬物の製造における該医薬組成物の使用に関する。

【0002】

NK細胞の細胞傷害性の機構のいくつかは前々から知られている。NK細胞はCD16分子を発現し、このCD16分子はIgG分子のFc部分に対するアフィニティーの低い受容体である。かくして、NK細胞は、標的細胞上の構造を特異的に認識する抗体のFc部分の認識により抗体で被覆された標的を認識しそして殺す。

20

【0003】

NK細胞はいわゆるキラー抑制受容体(Killer Inhibitory Receptors)(KIR)も発現し、このキラー抑制受容体はMHCクラスI分子を特異的に認識しそしてNK細胞における細胞溶解経路の活性化を抑制する。かくしてMHCクラスIポジティブ標的はNK細胞溶解から或るレベルまで保護される。

【0004】

それにもかかわらず、MHCクラスIポジティブ標的を発現しないいくつかの標的は、NK細胞により殺されない。これは、CD16分子又はKIR分子とは別の活性化機構がNK細胞を活性化することができることを示唆した。

30

【0005】

いくつかのNK特異的受容体はNK細胞の活性化における重要な役割を果たすことが確かめられた。

【0006】

かくして、NKp46は、自然の細胞傷害性をトリガーすることに関与する活性化受容体として開示された。更に最近では、NK細胞媒介による標的細胞の認識及び死滅に関する他のトリガー受容体もまた開示された。かくして、Moretta等はSDS PAGEに基づく約30kDの受容体を開示しており、これはNKp30と命名された(US patent application s.n.09/440514の分割US patent application s.n.10/036444)。

40

【0007】

これらの受容体に特異的な抗体は、それらのFc部分によりFc受容体ポジティブ細胞に被覆されるとき、リディレクテッドキリングアッセイ(redirected killing assays)として知られた試験におけるNK細胞認識及び細胞傷害性をトリガーする。

【0008】

NKp46又はNKp30に対して特異的なFab'2又はIgMは感受性細胞に対するNK細胞の殺能力(killing capability)の大部分を阻止するので

50

、多数のNK感受性標的はこれらの受容体の1つを介して死滅することが証明された。これは、これらの受容体の分子構造はまだ開示されていないけれども、NKp46及び/又はNKp30に対する特異的リガンドが感受性細胞上に存在することを示唆する。

【0009】

NKp30及びNKp46と会合した形質導入エレメントはFcεRIg及びゼータホモ二量体である。

【0010】

NKp30及びNKp46を認識する抗体は、NK細胞によるリンホカインの産生を誘発することができ及び/又はリディレクテッドキリングアッセイにおけるNK細胞の細胞障害性を誘発することができることは以前に証明された。

10

【0011】

本発明者は、抗NCR(NK細胞受容体)抗体は、サイトカインと共に使用されるとき、新鮮なヒトPBMCからのNK細胞の特異的増殖を誘発することができることをここに証明する。興味深いことに、CD16は同じ形質導入エレメント(ゼータホモ二量体及びFcεRIガンマ)を共有するけれども、可溶性抗CD16抗体の添加はNK細胞集団のいかなる特異的増加も支援しなかった。

【0012】

更に、NKp30及びNKp46はNK細胞に厳密に制限されるので、この証明は特異的NK細胞増殖プロトコールの基礎を与える。

【0013】

かくして、本発明の目的は、特に、NK細胞増殖に対する刺激効果を有する医薬組成物を提供することである。本発明の他の目的は、このような医薬組成物を使用することによりNK細胞の増殖を特異的に刺激するための方法を提供することである。

20

【0014】

本発明は、例えば、黒色腫、肝癌、又は肺腺腫の予防、寛解及び治療用並びに抗微生物予防、抗微生物寛解及び抗微生物治療用の薬物の製造におけるこのような医薬組成物の使用にも関する。

【0015】

本発明の医薬組成物は、有効量の、抗NCR抗体、例えば、抗NKp30抗体もしくは抗NKp46抗体もしくはその両方を含む群から選ばれる少なくとも1種の抗体又はその免疫反応性断片並びにインターロイキン、例えば、IL2、IL12、IL15、IL21又はその組み合わせを含む群から選ばれるサイトカインを、薬学的に許容されうる担体と共に含み、該抗体及びサイトカインは対象に対して一緒に又は別々に投与される。特定の態様では、サイトカインはIL2、IL15又はその両方である。該医薬組成物は該サイトカインをコードする発現ベクターを含むことができる。該ベクターはウイルスベクター及びプラスミドベクターであることができる。あるいは、該サイトカインを投与する代わりに、該サイトカインの*in vivo*産生を誘発させることができる。

30

【0016】

好ましい態様では、抗NKp30抗体及び/又は抗NKp46抗体をIL2と混合して使用する。

40

【0017】

該組成物において、抗NKp30抗体は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4又はその免疫原性断片及び配列番号5よりなる群から選ばれるポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性断片である。

【0018】

配列番号1はNK細胞及び特に成熟NK細胞により選択的に発現されるヒトNKp30 190aaポリペプチド(SDS-PAGEに基づいて約30kD)に関し；配列番号2はヒトNKp30受容体の細胞外領域に関し；配列番号3はヒトNKp30受容体の膜貫通領域に関し；配列番号4はヒトNKp30受容体の細胞質尾部(cytoplasmic tail)に関し；配列番号5は配列番号1から誘導された15aa免疫原性ペプ

50

チドに関する。

【0019】

該組成物において、「抗NKp46抗体」はNKp46に対するそれぞれ単離された抗体を指す。

【0020】

好ましい抗体は、配列番号1を有するポリペプチドに特異的に結合する。

【0021】

該組成物の抗NKp30抗体及び/又は抗NKp46抗体は、有利には、モノクローナル抗体、アフイニティー抗体、キメラ化抗体又はヒト化抗体であり、そして、更に好ましくは、ヒト化マウスモノクローナル抗体であるか又はヒト起源の抗体である。

10

【0022】

更に特に好ましい抗NKp30モノクローナル抗体はハイブリドーマ株I-2576により産生される。

【0023】

免疫反応性抗体断片を含む医薬組成物において、該断片は本質的にFab、F(ab')₂、Fv断片及びCDRグラフトヒト化抗体断片(CDR grafted humanized antibody fragments)である。

【0024】

本発明のヒト化抗体は、特に、本発明に従う医薬組成物をヒトに投与することを意図する場合には、所望に応じてヒトから誘導することができることに当業者は留意するであろう。「抗体免疫反応性断片」とは、本明細書では注目すべきことに抗原結合部位を含むいかなる抗体断片も意味する。かくして、このような断片は、タンパク質分解酵素、例えば、ペプシン又はパインによる上記抗体の酵素消化により得られるF(ab')₂断片及び当業者により知られているとおりヒンジ領域に位置したメルカプト基の還元によりそれから誘導されたFab断片を含む。免疫反応性断片は、その配列が関心のある抗体のCDR領域を含む組換え単鎖又は二量体ポリペプチド(recombinant single chain or dimeric polypeptides)も含むことができる。単離されたCDR領域自体も単離された免疫反応性断片の定義の範囲内に包含される。

20

【0025】

前記医薬組成物は、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内又は皮下注射、鼻腔内経路及び外科経路(surgical route)を含む種々の経路により投与することができる。所望の投与経路に依存して、製剤形態(galenic forms)は、例えば、錠剤、粉末剤、ペースト剤、パッチ剤(patch)、顆粒剤、微小顆粒剤(microgranules)、ナノ粒子剤(nanoparticles)、コロイド溶液剤、水性溶液剤、注射溶液剤、噴霧剤及びリポソーム剤である。ガレナス剤形は遅延放出形態及び/又は制御された放出形態に相当することもできる。

30

【0026】

本発明の医薬組成物に含まれる「薬学的に許容されうる賦形剤」とは、本明細書では、その溶解性及び/又は化学的性質及び/又は製剤特性(galenic properties)が所望の投与経路及び患っている(ailed)効率レベルに適合している賦形剤を意味する。このような賦形剤は食塩水溶液又はデキストロス溶液を含むことができる。本発明に従う医薬組成物は、いかなる適当な緩衝剤及び/又は安定化化合物も更に含むことができる。

40

【0027】

一般的に言えば、本発明の医薬組成物はNK細胞により制御され易い病理に有用である。多数のがん、即ち、黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、肝癌、肺腺癌、神経芽細胞腫等が、NK細胞溶解に感受性であることが示された。ウイルス感染細胞、例えば、CMV、EBV、HIV、HCV等もNK細胞溶解に感受性である。

50

【0028】

本発明の医薬組成物は、例えば、黒色腫、肝癌又は肺腺癌の抗腫瘍予防、抗腫瘍寛解、抗腫瘍治療のため及び抗微生物予防、抗微生物寛解及び抗微生物治療のために特に有用である。

【0029】

投与量は処置されるべき患者の状態に依存して選ばれる。

【0030】

本発明の医薬組成物が毎日の皮下注射用に使用される場合には、有効用量は、典型的には、抗NCR抗体が1ng~100mg/kg(体重)の範囲内にありそして典型的にはサイトカインが百万単位/平方メートル/日より低い範囲内にある。実際に、NK細胞の特異的増殖を達成するのにこのような本発明の*in vivo*医薬組成物において使用されるべき抗NCR抗体の量は、使用される特定の抗体(アフィニティー抗体、キメラ化抗体又はヒト化抗体)に依存することは注目すべきである。抗体は、好ましくは、NK細胞の枯渇又は毒性を誘発することなく、刺激のための有効な濃度を得るように使用されるべきである。

10

【0031】

有利には、前記インターロイキンは、IL2でありそして百万単位/m²より少ない一日量で5~10日間皮下注射される。

【0032】

本発明は、NK細胞を有効量の上記した医薬組成物と接触させることを含むNK細胞の増殖を刺激するための方法にも関する。

20

【0033】

有利には、本発明の方法は、抗NCR抗体、例えば、抗NKp30抗体もしくは抗NKp46抗体もしくはその両方を含む群から選ばれる有効量の少なくとも1種の抗体又はその免疫反応性断片の1回以上の注射、及びインターロイキン、例えば、IL2(Research Diagnostics, NJ, RDI-202)、IL12(Research Diagnostics, NJ, DI-212)、IL15(Research Diagnostics, NJ, RDI-215)、IL21(Asano et al, F E B S L e t t . 2 0 0 2 ; 5 2 8 : 7 0 - 6)又はそれらの組み合わせを含む群から選ばれるサイトカインの反復注射を5~10日間行い、該サイトカインを抗体の最初の注射と同じ日に最初に注射することを含む。好ましくは、サイトカインは、IL2、IL15又はその両方である。

30

【0034】

上記方法は、好ましくは、皮下経路によりサイトカインを1日に1回又は2回注射することを含む。

【0035】

本発明は、例えば、黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、肝癌、肺腺癌、神経芽細胞腫の抗腫瘍予防、抗腫瘍寛解及び抗腫瘍治療用並びに微生物予防、微生物寛解及び微生物治療用の薬物の製造における上記医薬組成物の使用にも関する。

40

【実施例】

【0036】

本発明のこれら及び他の特徴及び利点は、下記の実施例から更に明らかになるであろう。これらの実施例は、説明の目的でのみ与えられており、本発明の範囲を決して制限することを意図するものではない。当業者により意図される替わりの態様は本発明により包含される。

【0037】

1. 材料及び方法

材料

. 血液 :

50

- 最初の実験のために、末梢血 (5 ~ 10 x 7 ml EDTAチューブ、Becton Dickinson # 367655) を健康なボランティアから採集し (Lab. Hematologie, La Conception) そして2時間以内に処理した。

- 更なる実験のために、末梢血サンプルをEtablissement Fracais du Sang (EFS) により提供され、そして24時間以内に処理した (450 ml ± 10%の血液を採集するための凝固防止剤CPD63 mlを含有するバッグに血液を採集する; Baxter # R8443)。

【0038】

. P BMC 及び初代細胞培養

- 50 mlのポリプロピレン円錐形チューブ (Falcon, # 352070) 10

- 96 ウエルプレート、U字形 (Falcon, # 357525)

- RPMI 1640 培地 (Invitrogen, # 31870074)

- ウシ胎児血清 (Invitrogen, # 10270-106, Lot # 40A0285K) 熱で不活性化された

- ペニシリン - ストレプトマイシン (5000 u/ml, Invitrogen, # 15070071)

- ビルビン酸ナトリウム (100 mM, Invitrogen, # 11360088)

- L - グルタミン 200 mM (100 X, Invitrogen, # 25030123)

- Ficoll - Paque (登録商標) PLUS (Amersham Pharmacia Biotech, # 17-1440-03) 20

- Trypan Blue 0.4% (Invitrogen, # 15250061)

- D - PBS (1X) (Invitrogen, # 14190169)

- 血球計算盤 (Neubauer)

- ヒト組換え IL - 15 (25 µg, R & D, # 219-IL-025)。PBS / BSA 0.1% 中の IL - 15 のストック溶液 (10 µg/ml) を調製し、部分標本化し (aliquoted) そして - 20 で貯蔵した。

- ヒト組換え IL - 2 (Proleukin, 18×10^6 IU, バッチ A199606/2, Chiron)。PBS / BSA 0.2% 中の IL - 2 のストック溶液 (2×10^6 及び 2×10^5 u/ml) を調製し、部分標本化しそして - 20 で貯蔵した。

- モノクローナル抗体:

- 3G8 (抗 CD 16)、5 mg/ml、Beckman Coulter Immunotech 30

- N901 (抗 CD 56)、5 mg/ml、Beckman Coulter Immunotech

- Bab281 (抗 NK p 46)、2.8 mg/ml (マウス腹水からのタンパク質 A Sepharose (登録商標) 上で精製された mAb)

- AZ20 (抗 NK p 30)、1 mg/ml 及び 1.2 mg/ml (マウス腹水からのタンパク質 A Sepharose 上で精製された mAb)。

【0039】

細胞分裂分析 (CFSE 標識化) 40

5 - (及び 6) - カルボキシテトラメチルローダミン、スクシンイミジルエステル (5 (6) - TAMRA、SE) 混合異性体 (CFSE、25 mg; Molecular Probes、C-1157)

- DMSO hybrid - Max (登録商標) (Sigma # D2650)

- DMSO 中の CFSE (10 mM) のストック溶液を、Molecular Probes により与えられた技術データシートに記載のとおりにして、調製し、部分標本化しそして - 20 で貯蔵した。

【0040】

. 染色

- 96 ウエルプレート、U字形 (Greiner # 650180) 50

- 1. 2 mlマイクロタイターチューブ (QSP、#845-F)
- 5 mlチューブ (12 x 75 PRO、CML、#TH5-12PRO)
- 染色緩衝液: PBS / 0.2% BSA / 0.02% アジ化ナトリウム (D-PBS (10X)、Invitrogen #14200083; ウシアルブミン (Albumin Bovin), 画分V (FractionV)、Invitrogen # ; アジ化ナトリウム、Prolabo #27967.150)
- マウス血清NMRI (Janvier)
- この研究で使用された商業的に入手可能なAb (表1)

【0041】

. フローサイトメトリー

サンプルをXL/MCLサイトメーター (Beckman Coulter) に流した。EXO (登録商標) 32v1.2ソフトウェア (Beckman Coulter) により取り込み (acquisition) 及び分析を行った。

方法:

. PBMCの調製

血液サンプルをRPMIで容積/容積希釈しそして古典的フィコール法を使用して処理した。

PBMCを50 mlの円錐形チューブに集め、RPMI、2% FCSで4回洗浄し、トリパンブルーで計数した。細胞を、細胞培養の開始のために完全培地 (RPMI 1640、FCS 10%、PS (50 u/ml)、Glu 2 mM、Na.Pyr 1 mM) 中に 2×10^6 細胞/mlで再懸濁させ又はフローサイトメトリー実験のために染色緩衝液 (PBS、0.2% BSA、0.02% アジ化ナトリウム) 中に 10^7 細胞/mlで再懸濁させた。

【0042】

C F S E 標識化:

- PBMC (10^7 細胞/ml) をCFSE (5 ~ 10 μ M) を含有するRPMI / FCS 2% 中で37 (水浴) で10 ~ 25分間インキュベーションした。

- 細胞を大容量の冷 (4) RPMI / FCS 2% で3回 (10分、1200 RPM) 洗浄した。

- PBMCを完全培地中に再懸濁させ (2×10^6 細胞/ml) そして細胞培養の準備を整えた。

【0043】

その後の技術の各々について、本発明者は下記の工程を推奨する。

. 初代細胞培養

0日目

- PBMC (2×10^6 個/ml) を完全培地 (RPMI 1640、FCS 10%、PS (50 u/ml)、Glu 2 mM、Na.Pyr. 1 mM) 中に再懸濁させる。

- 完全培地を使用して2Xインターロイキンストック (IL-2、IL-15及びIL-2 + IL-15) を調製する。

- 実験に依存して、IL-2を50又は400 u/ml最終で使用した。IL-15を常に10 ng/ml最終で使用した。

- 完全培地を使用して4X抗体ストックを調製する。

- 培養をセットアップする: 50 μ l 4X mAb + 100 μ l 2Xインターロイキン + 50 μ l PBMC (10^5 個細胞/ウエル)

- 完全培地により200 μ lとなるように満たす。

3日目:

- 培地を変える: 100 μ lを除去しそして1Xインターロイキンを含有する完全培地100 μ lを加える。

6日目:

培地を変える: 100 μ lを除去しそして50 u/ml IL-2 (\pm IL-15 10 ng/ml) 又は400 u/ml IL-2 (\pm IL-15 10 ng/ml) を含有する完全培地100

10

20

30

40

50

μlを加える。

9日目：

- 細胞を1/2に分けそして培地を加える(6日目)

13、16及び20日目：

細胞増殖に依存して6日目又は9日目と同じ

【0044】

・染色

この研究で使用された容積、希釈率及びAb濃度を表1に示す。

- 培養したPBMCの染色のために、1ポイントの染色のために1又は2ウェルを使用することができる。コントロールサンプルをインターロイキンで刺激された細胞で調製した。 10

- %NK細胞(CD56⁺CD3⁻細胞)を0日目、6日目、13日目、16日目及び20日目に検査しそしてある実験については3日目、9日目及び35日目に検査した。

- 表1に列挙された抗体による0日目及び17日目における(ある実験について)NK細胞及びTリンパ腫コンパートメントの特徴付け

【0045】

mAbを分注しそして染色緩衝液により容積を50μlに調節する。

細胞懸濁液50μlを加える。

氷上で30分インキュベーションする。

染色緩衝液で2回洗浄する。 20

細胞を染色緩衝液150μl中に再懸濁させそして染色緩衝液150μlを入れたRT15チューブに移す。

フローサイトメーターでの獲得まで冷凍して保つ。

【0046】

・サイトメトリー

獲得

- 「セットアップモード」においてアイソタイプコントロール混合物を流しそしてセットアップする：FSC、SSC、閾値、FL1、FL2、FL3及びFL4パラメーター

。そのFSC及びSSC特徴(FSC、線状、ゲイン：2、ボルト：400及びSSC 30、線状、ゲイン：20、ボルト：400；閾値：FSC、150)により同定されたリンパ腫に分析を集中させ；これらのパラメーターのボルトはこの研究の各実験間で僅かに異なっているもよい(培養された細胞のFSC及びSSCは通常単離されたばかりの細胞のこれらより高い)。

・リンパ腫ゲート=Lyを描き(draw)(Lyにおいて少なくとも10000のイベントを取り込むが、すべてのイベントが集められる)。

- 実験で使用した各蛍光プローブのためのボルトをセットアップし(ほぼ、FL1=800；FL2=800；FL3=950及びFL4=1000)；それらは各実験の間で僅かに異なっているもよい。

- 単一の染色サンプル(実験で使用したmAb又は抗CD8)を使用してコンペンセーションをセットアップする： 40

・最初に、FL1-mAbサンプルを流し、そして最初のディケード(FL2ヒストグラム及びFL1/FL2ドットプロットにおいて<0.5%)にFL1ネガティブ細胞及びFL1ポジティブ細胞及びすべてのFL2ネガティブ細胞について同じFL2-MFIを有するようにFL2-FL1(=15~20)をセットアップし、次いで丁度FL2-FL1で述べたとおりFL3-FL1及びFL4-FL1をセットアップする。値を書き込みそしてコンペンセーションをクリアーする。

- 各蛍光プローブについてこの工程を繰り返す。

- すべての値をコンペンセーションマトリックスにコピーする。

- アイソタイプコントロールサンプルを取り込み、次いで実験のために調製したすべて 50

のサンプルを取り込む（「96ウエルテーブル」上の取り込まれたサンプルに相当する1md数を書き込む）。

- 各サンプル（1md）を記録し、次いで呼び出されたホルダーに移す：年、月、日（例えば、20020126）。このホルダーはHC/PAホルダー内に位置している。

- CFSEサンプルの取り込み

・FL1コンペーションはCFSE標識された細胞のみを使用してなされなければならない。

・最初に、アイソタイプコントロールサンプルを使用してFL1、FL2...のためのボルトをセットアップし、次いでCFSEサンプルを流す。標識化は、すべての細胞がCFSEについてポジティブであり、染色が均一でありそしてピークチャンネル（pic channel）がFL1ヒストグラムの最後のディケードの中央に位置している（FL1ボルト低下させることなく）とき良好である。

・すべてのコンペーションをセットアップする（それらは通常FL1-mAB染色細胞で得られるコンペーションよりも高い）。

【0047】

分析

- そのFSC及びSSC特徴（ドットプロットFSC/SSC）により同定されたリンパ腫に分析を集中した。リンパ腫ゲート（Ly）を描く。

四分区間領域（quadrant regions）（ドットプロットについて）及びマーカー領域（ヒストグラムについて）を、アイソタイプコントロールサンプルを使用してセットした（すべての蛍光について：%FLX⁺細胞<0.5%）。

- T細胞又はNK細胞コンパートメントの分析：

T細胞 = CD3⁺リンパ腫は、Lyでゲーティングされた抗CD3染色ヒストグラムのポジティブ細胞として定義された。

NK細胞 = CD3⁻CD56⁺リンパ腫は、CD3/CD56ドットプロットにおけるCD3⁻CD56⁺ゲート（四分区間の上左部）に相当する。

CFSE染色、CD25発現（%）、NKR発現（%）及びCD56密度（MFI）を分析した。

- 細胞計数及び冷凍

いくつかの培養物を細胞数及び細胞生存率（トリパンプルー排除）について検査し、次いで実験の終わりに冷凍した（20日又は35日）。

【0048】

2、5及び6欄については供与者の注釈を参照されたい。

【0049】

10

20

30

【表 1】

表1. 細胞サイトメトリーのための抗体及び試薬

特異性	クローン	アイソタイプ	状態	起源	カタログ	容積／濃度／希釈
CD3	UCHT1	mIgG1	FITC	BC Iot	IM1281	5μl
CD3	UCHT1	mIgG1	PE	BC Iot	IM1282	5μl
CD3	UCHT1	mIgG1	PC5	BC Iot	IM2635	5μl
CD3	UCHT1	mIgG1	ECD	BC Iot	IM2705	5μl
CD8	B9.11	mIgG1	FITC	BC Iot	IM0451	5μl
CD8	B9.11	mIgG1	PE	BC Iot	IM0452	5μl
CD8	B9.11	mIgG1	PC5	BC Iot	IM2638	5μl
CD8	SFC121ThyD3	mIgG1	ECD	BC	6607011	5μl
CD16	3G8	mIgG1	精製した	BC Iot	813	
CD16	3G8	mIgG1	PE	BC Iot	IM1238	5μl
CD16	3G8	mIgG1	FITC	BC Iot	IM0814	5μl
CD25	B1.49.9	mIgG2a	FITC	BC Iot	IM0478	10μl
CD25	B1.49.9	mIgG2a	PC5	BC Iot	IM2646	5μl
CD25	M-A251	mIgG1,k	PE	BD	555432	5μl
CD27	1A4-CD27	mIgG1,k	PE	BC Iot	2578	5μl
CD45	IMMU 19.2	mIgG1	PC5	BC Iot	IM2652	5μl
CD54	84H10	mIgG1	PE	BC Iot	IM1239	5μl
CD56	N901(NKH-1)	mIgG1	精製した	BC Iot	6602705	
CD56	N901 (NKH-1)	mIgG1	PE	BC Iot	IM2073	5μl
CD56	N901 (NKH-1)	mIgG1	PC5	BC Iot	IM2654	3μl
CD57	NC1	mIgM	PE	BC Iot	IM2377	5μl
CD62L	DREG56	mIgG1	PE	BC Iot	IM2214	5μl
CD69	TP1.55.3	mIgG2b	PE	BC Iot	IM1943	4μl
CD94	HP-3B1	mIgG2a	PE	BC Iot	IM2276	5μl
CD122	CF1	mIgG1	PE	BC Iot	IM1978	5μl

10

20

30

CD158a	EB6	mIgG1	PE	BC Iot	IM2277	10 μ l
CD158b	GL183	mIgG1	PE	BC Iot	IM2278	5 μ l
CD158e1/e2	Z27	mIgG1	PE	BC Iot	IM3292	5 μ l
CD158i	FES172	mIgG2a	PE	BC Iot	IM3337	5 μ l
CD158k	Q66	mIgM	腹水	BC Iot		1: 2000
CD159a	Z199	mIgG2b	PE	BC Iot	IM3291	5 μ l
CD161	191B8	mIgG2a	PE	BC Iot	IM3450	5 μ l
CD162R	5H10	mIgM	ビオチン	IP (AT,HC)		1 μ g/ml
CD244	C1.7.1	mIgG1	PE	BC Iot	IM1608	5 μ l

10

アイソタイプコントロール	679.1Mc7	mIgG1	精製した	BC Iot	IM0571	10 μ l
アイソタイプコントロール	679.1Mc7	mIgG1	ECD	BC Iot	IM2714	5 μ l
アイソタイプコントロール	679.1Mc7	mIgG1	FITC	BC Iot	IM0639	5 μ l
アイソタイプコントロール	679.1Mc7	mIgG1	PE	BC Iot	IM0670	5 μ l
アイソタイプコントロール	679.1Mc7	mIgG1	PC5	BC Iot	IM2663	3 μ l
アイソタイプコントロール	U7.27	mIgG2a	PE	BC Iot	IM0671	5 μ l
アイソタイプコントロール	MOPC-195	mIgG2b	RD1	BC Iot	6603038	5 μ l
アイソタイプコントロール	GC323	mIgM	精製した	BC Iot	IM1268	10 μ l
アイソタイプコントロール	GC323	mIgM	RD1	BC Iot	6602940	5 μ l

20

【 0 0 5 0 】

実施例 1 抗 N C R 抗体 + I L 2 は N K 細胞の特異的細胞増殖を促進することができる

30

- 抗 N C R 抗体及び I L 2 による刺激後の N K 細胞の相対的増幅

1 人の供与者からの P B M C を単離しそして I L 2 と C D 1 6 、 N K p 3 0 、 N K p 4 6 又は C D 5 6 m A b s との組み合わせに対するそれらの *i n v i t r o* 応答について試験した。細胞を、飽和量の抗体の存在下に、材料及び方法において説明した如くして処理した。

【 0 0 5 1 】

細胞をフローサイトメトリーにより監視しそして C D 5 6 + / C D 3 - (N K 細胞) の相対的百分率を決定した。

結果を図 1 に示す。

【 0 0 5 2 】

この供与者では、抗 N C R 抗体の存在下に 1 0 日目に培養物中の N K 細胞の増加 (*e n r i c h m e n t*) があったが、これに対して、C D 1 6 又は C D 5 6 は I L 2 単独に比べて有意な増加を誘発しなかった。

40

【 0 0 5 3 】

この増加が供与者に関連しているかいないかを評価するために、P B M C を 4 人の健康なボランティアから単離しそして I L 2 + N C R に対するモノクローナル抗体の組み合わせに対するそれらの *i n v i t r o* 応答について試験した。

【 0 0 5 4 】

細胞を材料及び方法に記載の如くして処理し、そして抗体なしで、又は、飽和量 (1 0 μ g / m l) の抗 N K p 3 0 モノクローナル抗体、抗 N K p 4 6 モノクローナル抗体、抗 N

50

K p 3 0 及び N K p 4 6 のモノクローナル抗体の組み合わせ、抗 C D 5 6 モノクローナル抗体の存在下に置いた。細胞をフローサイトメトリーにより監視しそして C D 5 6 + / C D 3 - (N K 細胞) の相対的百分率を決定した。

【 0 0 5 5 】

結果を図 2 に示す。

【 0 0 5 6 】

試験した 4 人の健康な供与者については、N K 細胞の選択的増加があった。増加は抗 N K p 3 0 が使用されるとき、N K p 4 6 に比較して僅かにより良好である。2 つの抗体の組み合わせが最善の増加を与える。

【 0 0 5 7 】

これらの 2 つの研究の結論は、低用量の I L 2 (5 0 単位 / ml) と抗 N C R 抗体の組み合わせが N K 細胞の選択的増加を誘発するということである。

【 0 0 5 8 】

この増殖が N K 細胞の有効な増殖によるか又は培養物中に存在する他の細胞の選択的死滅によるかどうかを評価するために、P B M C を C F S E で染色し、次いで培養の開始時に洗浄して過剰の染料を取り除いた (材料及び方法参照) 。 C F S E は細胞に共有結合する安定な蛍光標識である。細胞が分裂すると、最初の染料含有率の約半分が 2 つの娘細胞に存在する。細胞が再び分裂すると、最初の染料含有率の 1 / 4 が 4 つの娘細胞に存在する等。標識された細胞を培養しそして上記の如き抗 N C R 抗体及び I L 2 により刺激した。細胞の染料含有率をフローサイトメトリーにより監視した。

【 0 0 5 9 】

1 人の代表的供与者で得られた結果を図 3 に示す。

【 0 0 6 0 】

N K p 3 0 又は N K p 4 6 + I L 2 共処理は、休止細胞 (分裂しない) と同等な蛍光強度を持ったままである細胞の数により示される I L 2 単独又は I L 2 + 関係のない m A b (C D 5 6) よりも良好な N K 細胞の増殖を誘発する : それぞれ I L 2 及び I L 2 + C D 5 6 について 5 0 % 及び 4 0 % 、並びにそれぞれ N K p 3 0 + I L 2 及び N K p 4 6 + I L 2 について 5 % 及び 1 1 % 。

【 0 0 6 1 】

N K p 3 0 で最善の増殖が得られ、その場合に 6 日目の培養物中の細胞の 8 0 % より多くが 5 回より多くの分裂を受けた。

【 0 0 6 2 】

結論すると、抗 N C R (N K p 3 0 、 N K p 4 6 又は両方) + I L 2 共処理は、i n v i t r o で P B M C から N K 細胞の選択的増殖を誘発する。

【 0 0 6 3 】

実施例 2 . 抗 N C R + I L 1 5 も N K 細胞の特異的増殖を誘発する

抗体による刺激の後、細胞の増殖を持続させるのにサイトカインの存在が極めて重要である。I L 1 5 も 1 人の供与者に関して細胞の増殖を持続させることができるかどうかを試験するための実験を行った。

【 0 0 6 4 】

細胞を N K p 3 0 で刺激しそして I L 2 、 I L 1 5 又は両方の存在下に培養した。

【 0 0 6 5 】

結果を図 4 に示す。

【 0 0 6 6 】

この供与者に関しては、I L 1 5 は N K 細胞の増殖を持続させることができた。

我々は、I L 2 及び I L 1 5 の組み合わせも N K 細胞の増殖を持続させることを確かめた。他の供与者に関する他の実験では、I L 2 及び I L 1 5 の組み合わせは 2 つのサイトカイン単独よりも僅かに良好でありうるということが観察された。

【 0 0 6 7 】

実施例 3 . 増殖の誘発のための抗 N C R 抗体の滴定曲線

10

20

30

40

50

増殖を得るのに必要な抗体の量を評価するために、抗NKp30抗体を使用して3人の独立した供与者に関して滴定曲線を確認した。結果を図5に示す。この実験は、抗体の効果が約1 µg/mlで高原効果により飽和可能であることを示す。最大効果の50%を得るための用量はこの実験では0.1 µg/mlより少ない。

【0068】

曲線の特徴は使用した特定の抗体及び特にそのアフィニティーに依存することができることに留意されるべきである。ヒト化抗NCR抗体の使用も種々の滴定曲線を表示することができる。

【0069】

実施例4. 抗NCR抗体 + IL2 in vivoの使用の条件

抗NCR抗体(1種又は複数種)を最初にin vitroで試験し、次いで適切な動物モデルにおいて試験した。

【0070】

抗NCR + IL2はin vitroでCD25を誘発し(図6)、かくして大部分のNK細胞においてIL2に対する高いアフィニティーの受容体を誘発することに留意されるべきである。in vitroでは、低用量、例えば50単位/mlはNK細胞の増殖を持続させるのに十分である。かくして、低用量IL2(典型的には、毎日の皮下注射で百万単位/平方メートル/日より低い)は増殖を持続させるのに十分であることを予測することができる。in vitroでは、CD25は9~10日後ダウンレギュレーションされ、その結果低用量IL2処理の長さは10日までであることが予想される。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】1人の健康な供与者からの末梢血単核細胞(PBMC)を、10又は30 µg/mlで、指示された抗体(AZ20 = 抗NKp30、Bab281 = 抗NKp46)と共に、6日目までは50単位/ml IL2の存在下にそして6~10日目では50単位/ml(黒色バー)又は400単位/ml(緑色バー)の存在下に培養した。NK細胞の%は10日目にフローサイトメトリーにより決定した。

【図2】開始時に10 µg/mlの指示された抗体及び培養の間に50単位/ml IL2を使用する、4人の健康な供与者からの全未分別PBMCからのNKの相対的倍比増加(relative fold increase)(0日目における%NK細胞で割った指示された日における%NK細胞)。相対的倍比増加の平均+/-標準偏差を表す。

【図3】NK細胞のカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)標識化(FL1、対数スケール、X軸)(指示された処理による培養の6日後のCD56+/CD3-細胞に対してゲートをかけた)

【図4】IL-2又はIL-15と組み合わせたAZ20はNK細胞増殖を誘発する。単離されたばかりのPBMCをインターロイキンの種々の条件下に(0~6日目は、濃度は下の濃度であり; 6~13日はインターロイキンの濃度は上の濃度である)そして抗CD56mAb(N901、IgG1、10 µg/ml)又は抗NKp30mAb(AZ20、IgG1、10 µg/ml)を使用して培養した。13日目に細胞を集めそしてCD56+ CD3-リンパ腫として定義されたNK細胞の%についてフローサイトメトリーにより分析した。

【図5】3人の供与者(A、B、C)から単離されたばかりのPBMCを、IL-2(0~6日目は50 u/ml及び6日目からは400 u/ml)及びIL-15(10 ng/ml)を含有するRPMI 1640 10% FCS中の指示された量のAZ20と共に培養した。13日目に細胞を集め、生存率及び計数をトリパンブルーにより評価しそして%CD56+ CD-リンパ腫をフローサイトメトリーにより評価した。

【図6】指示された刺激(IL2(50 U/ml)、mAbs 10 µg/ml)による2人の健康な供与者(材料及び方法参照)のPBMCの刺激の6日後に得られたNK細胞のCD25誘発。

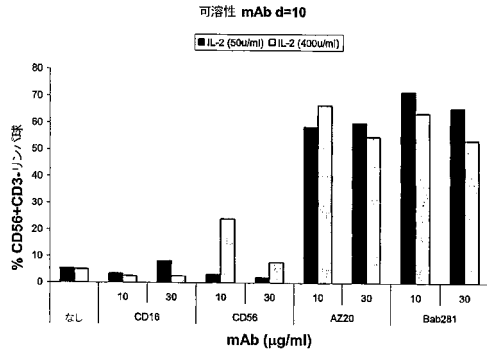
10

20

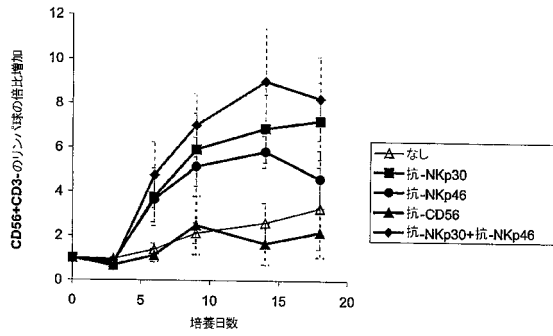
30

40

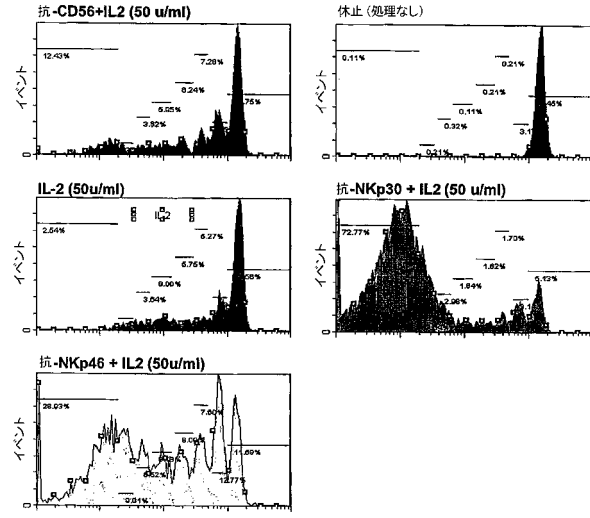
【 図 1 】



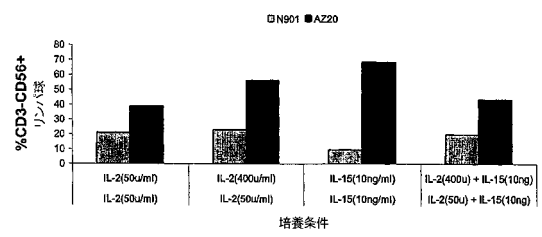
【 図 2 】



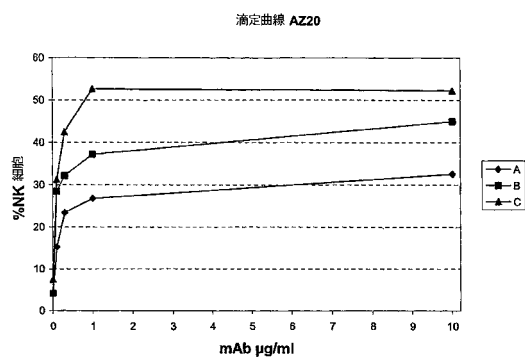
【 図 3 】



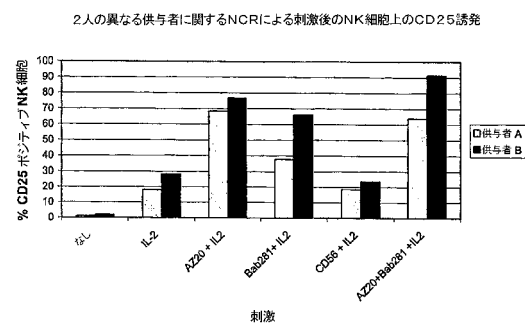
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

2006514024000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/14716

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/395 A61K38/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PAJ, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 36630 A (INNATE PHARMA S A S ;UNI DI GENOVA (IT); BIASSONI ROBERTO (IT); BO) 25 May 2001 (2001-05-25) see in particular page 16, line 4 - page 17, line 17 the whole document	1-15
Y	SPAGGIARI GRAZIA MARIA ET AL: "NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors Nkp30 and Nkp46" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 31, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 1656-1665, XP002276285 ISSN: 0014-2980 the whole document	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 April 2004		23/04/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentleer 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Morawetz, R

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14716

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MORETTA A ET AL: "ACTIVATING RECEPTORS AND CORECEPTORS INVOLVED IN HUMAN NATURAL KILLER CELL-MEDIATED CYTOLYSIS" ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC, US, vol. 19, 2001, pages 197-223, XP008016880 ISSN: 0732-0582 the whole document	1-15
Y	MORETTA A ET AL: "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 228-234, XP004198152 ISSN: 0167-5699 the whole document	1-15
Y	CARSON W E ET AL: "INTERLEUKIN-2 ENHANCES THE NATURAL KILLER CELL RESPONSE TO HERCEPTIN-COATED HER2/NEU-POSITIVE BREAST CANCER CELLS" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 31, 2001, pages 3016-3025, XP001022185 ISSN: 0014-2980 the whole document	1-15
Y	CARLENS STEFAN ET AL: "A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 62, no. 10, October 2001 (2001-10), pages 1092-1098, XP002276286 ISSN: 0198-8859 the whole document	1-15
Y	PARRISH-NOVAK JULIA ET AL: "Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function" NATURE, MACMILLAN MAGAZINES, US, vol. 408, no. 6808, 2 November 2000 (2000-11-02), pages 57-63, XP002194001 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-15

5

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/14716**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 11-14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims 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. Claims 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:

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.:

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
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/14716

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0136630	A	25-05-2001	CA 2288307 A1	15-05-2001
			AU 2667701 A	30-05-2001
			WO 0136630 A2	25-05-2001
			EP 1240326 A2	18-09-2002
			JP 2003523735 T	12-08-2003
			US 2002142445 A1	03-10-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 0 7 K	14/54 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 1 2 P	21/08 Z N A
		C 0 7 K	14/54
		C 0 7 K	16/28

(81) 指定国 AP(BW, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アンドレ, パスカル

フランス国、1 3 0 0 6 マルセイユ、リュ・ドゥ・ラ・ルピエール 3 8

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
 4C084 AA02 BA44 DA12 DA14 MA02 NA14 ZB022 ZB222 ZB262 ZB272
 4C085 AA13 AA14 AA16 AA18 BB41 BB43 BB44 CC03 CC32 DD88
 EE03 GG01
 4H045 CA40 DA02 DA76 EA20 FA72 FA74