

(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2016-503302

(P2016-503302A)

(43) 公表日 平成28年2月4日(2016.2.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	4 B 0 6 3
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 7
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	M
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)		

(21) 出願番号	特願2015-543434 (P2015-543434)	(71) 出願人	507002516
(86) (22) 出願日	平成25年11月21日 (2013.11.21)		アンセルム (アンスティチュート・ナシオナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・メディカル)
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月8日 (2015.7.8)		フランス・F-75654・パリ・リュ・ドゥ・トルビアク・101
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/074407	(71) 出願人	506128396
(87) 国際公開番号	W02014/079946		サントル ナシオナル ド ラ ルシエルシュ スィアンティフィク (セ.エン.エル.エス.)
(87) 国際公開日	平成26年5月30日 (2014.5.30)		フランス国 エフ75016 パリ、リュミシエル アンジュ、3
(31) 優先権主張番号	12306445.3		
(32) 優先日	平成24年11月21日 (2012.11.21)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性移植片対宿主病のリスクを決定する方法

(57) 【要約】

本発明は、候補ヒト移植ドナーが、ヒト移植レシピエントにおいて急性移植片対宿主病(aGVHD)を誘発するリスクがあるかどうかを決定する方法に関し、これは続いて、レシピエントに関してリスクを示さないドナーの選択を可能にし得る。本発明はまた、本発明のリスクを決定する方法を実施した後に、ヒト移植レシピエントに移植片移植した後に該レシピエントに施される免疫抑制治療を調節する方法に関する。本方法は、候補ドナーのiNKT細胞(インバリアントNKT細胞)を拡大させる工程、およびCD4(-)iNKT細胞亜集団の拡大の存在または非存在を決定する工程を含む。特に、CD3+CD4-TCRV[アルファ]24V[ベータ]11細胞が決定される。キットが開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

候補ヒト移植ドナーが、ヒト移植レシピエントにおいて急性移植片対宿主病(aGVHD)を誘発するリスクがあるかどうかを決定する方法であって、i)前記候補ヒト移植ドナーから得た生物学的試料由来のインバリエントNKT(iNKT)細胞の集団を拡大させる工程、ii)工程i)で得られた集団中のCD4-iNKT細胞亜集団の拡大の存在または非存在を検出する工程、およびiii)iNKT細胞の集団からCD4-iNKT細胞亜集団が拡大されていない場合、その候補ヒト移植ドナーは、ヒト移植レシピエントにおいてaGVHDを誘発するリスクが高いと結論付ける工程を含む方法。

【請求項 2】

ヒト移植レシピエントにおいてaGVHDを誘発するリスクが低減されるようにヒト移植ドナーを選択する方法であって、i)請求項1に記載のリスクを決定する方法を実施する工程、およびii)前記リスク決定に従って前記ドナーを選択する工程を含む方法。

【請求項 3】

ヒト移植レシピエントに移植片移植した後に該レシピエントに施される免疫抑制治療を調節する方法であって、i)請求項1に記載のリスクを決定する方法を実施する工程、およびii)免疫抑制治療を調節する工程を含む方法。

【請求項 4】

iNKT細胞の集団を拡大させる工程i)が、(a)前記候補ヒト移植ドナーまたは前記ヒト移植レシピエントから得た生物学的試料由来の末梢血単核細胞(PBMC)を単離する工程、および(b)iNKT細胞の増殖を刺激する物質およびiNKT細胞を活性化する物質の両方を含む培地中で前記PBMCを培養する工程により実施される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

CD4-iNKT細胞亜集団が、CD3+CD4-TCR V α 24V β 11細胞の集団である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

iNKT細胞の増殖を刺激する物質が、インターロイキン2(IL-2)である、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

iNKT細胞を活性化する物質が、アルファ-ガラクトシルセラミド(アルファ-GalCer)、アルファ-グルクロノシルセラミド、ホスファチジルイノシトールテトラマンノシド、イソグロボトリヘキソシルセラミド、ガングリオシドGD3、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スルファチド、ベータ-ガラクトシルセラミド、リポホスホグリカン、グリコイノシトールリン脂質、ベータ-アノマーガラクトセラミドおよびアルファ-アノマーガラクトシルセラミド、および細菌脂質抗原からなる群から選択される糖脂質抗原である、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

糖脂質抗原が、アルファ-GalCerである、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

少なくともa)iNKT細胞の増殖を刺激する物質、b)iNKT細胞を活性化する物質およびc)CD4と特異的に結合する標識された物質を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキット。

【請求項 10】

iNKT細胞の増殖を刺激する物質がIL-2であり、前記iNKT細胞を活性化する物質がアルファ-GalCerである、請求項9に記載のキット。

【請求項 11】

d)CD3と特異的に結合する標識された物質、およびe)iNKT細胞のCD1d拘束性TCR V α 24V β 11と特異的に結合する標識された物質をさらに含む、請求項9または10に記載のキット

10

20

30

40

50

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、急性移植片対宿主病のリスクの予測に関する方法および対応する製品(例えば、キット)に関し、加えて、移植ドナーを選択するための、およびかかるリスク予測に関連する治療を調節するための対応する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液学的悪性腫瘍に関する治療法の最前線は、一般的に化学療法および/またはモノクローナル抗体を用いた化学免疫療法を含む。しかしながら、一部の患者は疾患の再発または進行を経て、標準的な治療が効かなくなってくることがある。

【0003】

同種幹細胞移植(SCT)を含む免疫療法は、標準的な化学療法では治癒が困難であるか、または治癒される可能性が低いこれらの患者における治療法に代わる代替的方法を代表する。造血幹細胞移植(HSCT)は、ドナー由来、または臍帯血由来の造血幹細胞を採取することと、移植材料を受けるように調整したレシピエントにそれらを静脈内に注入することとを包含する治療法である。しかしながら、移植後の全体的な生存率は、移植片対宿主病(GVHD)を含む重篤な移植後合併症のためにまだほんの40%~60%にすぎない。GVHDとは、宿主組織に対する移入または移植された免疫担当細胞(例えば、成熟T細胞)の免疫反応により引き起こされ、また場合によっては死に至る重篤な臓器毒性を誘発し得る疾患に関する一般名称である。

【0004】

したがって、ヒト白血球抗原(HLA)適合性は、移植片拒絶およびGVHDのリスクを低減させるのに必須である。しかしながら、非HLA遺伝子もまた、移植結果に影響を与え、GVHDは、HLA一致適合同胞ドナー(MSD)から移植材料を受けた患者でさえ致命的である場合がある。さらに、MSDは、患者の約3分の1にのみ利用可能であり、したがって代替ドナーが必要とされる。HLA適合非血縁ドナー(MUD)は、臍帯血または不適合血縁ドナーよりも広く使用されているが、MUDから移植材料を受ける患者に関して、GVHDのリスクも考慮されなくてはならない。

【0005】

したがって、移植材料を受ける患者においてGVHDを発症するリスクを予測するのに有用な方法(または逆に言えば、候補ドナーが、レシピエントにおいてGVHDを誘発するリスクがあるかどうかを決定する方法)が依然として必要である。

【0006】

近年、2つの回顧的研究において、同種HSCT(Rubio他、Blood 2012)またはドナー移植片(Chaidos他、2012)のレシピエントの末梢血幹細胞(PBSC)におけるエフェクターおよび制御性リンパ球の度数分布を解析することにより、急性移植片対宿主病(aGVHD)の予測におけるインバリアントNKT(iNKT)細胞の臨床的関連性が実証されている。レシピエント中のiNKT細胞の再構成障害または移植片における低CD4-iNKT細胞用量が、HSCT後のaGVHDの発生を有意に予測し得る独立パラメーターを表すと示された。

【0007】

しかしながら、iNKT細胞の血液または移植片試料中の直接的な決定に基づいてaGVHDを発症するリスクを予測する方法は、低iNKT細胞と高iNKT細胞との間の閾値を決定するのが困難であり、例えば中間の結果に関して誤差のリスクを招くため、医師にとって満足いくものではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第5,936,076号

10

20

30

40

50

【特許文献2】国際特許出願W093/05055号

【特許文献3】国際特許出願W094/09020号

【特許文献4】国際特許出願W094/24142号

【特許文献5】国際特許出願W094/02168号

【特許文献6】国際特許出願W098/44928号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Rubio他、Blood 2012

【非特許文献2】Roitt, I. (1991) Essential Immunology、第7版(Blackwell Scientific Publications社、Oxford)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

第1の態様では、本発明は、候補ヒト移植ドナーが、ヒト移植レシピエントにおいて急性移植片対宿主病(aGVHD)を誘発するリスクがあるかどうかを決定する方法であって、i) 候補ヒト移植ドナーから得た生物学的試料由来のインバリアントNKT(iNKT)細胞の集団を拡大させる工程、ii) 工程i)で得られた集団中のCD4-iNKT細胞亜集団の拡大の存在または非存在を検出する工程、およびiii) iNKT細胞の集団からCD4-iNKT細胞亜集団が拡大されていない場合、その候補ヒト移植ドナーは、ヒト移植レシピエントにおいてaGVHDを誘発するリスクが高いと結論付ける工程を含む方法に関する。

【0011】

第2の態様では、本発明は、ヒト移植レシピエントにおいてaGVHDを誘発するリスクが低減されるようにヒト移植ドナーを選択する方法であって、i) 本発明によるリスクを決定する方法を実施する工程、およびii) 前記リスク決定に従って前記ドナーを選択する工程を含む方法に関する。

【0012】

第3の態様では、本発明は、ヒト移植レシピエントに移植片移植した後に該レシピエントに施される免疫抑制治療を調節する方法であって、i) 本発明によるリスクを決定する方法を実施する工程、およびii) 免疫抑制治療を調節する工程を含む方法に関する。

【0013】

別の態様では、本発明はさらに、上述の本発明による方法を実施するためのキットに関する。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明者らは、CD4-iNKT細胞亜集団の拡大能力を解析する前に、候補ドナーから得たPBSC移植片または血液試料由来のiNKT細胞の集団を12日～15日の間に拡大させる事前工程により、候補ドナーがレシピエントにおいて急性GVHDを誘発するリスクがあるかどうかを安全に決定することが可能となることを示した。実際には、拡大後、2つの異なる可能性、すなわち:iNKT細胞の集団からCD4-iNKT細胞亜集団が拡大されていないため(拡大因子 ≤ 1)、ドナーがレシピエントにおいて急性GVHDを誘発するリスクが高いこと、またはiNKT細胞の集団からCD4-iNKT細胞亜集団が有意に拡大されているため(拡大因子 > 1)、ドナーがレシピエントにおいて急性GVHDを誘発するリスクがほとんどないことのいずれかのみが示される。

【0015】

急性移植片対宿主病(aGVHD)のリスクを決定する方法:

したがって、第1の態様では、本発明は、候補ヒト移植ドナーが、ヒト移植レシピエントにおいて急性移植片対宿主病(aGVHD)を誘発するリスクがあるかどうかを決定する方法であって、i) 候補ヒト移植ドナーから得た生物学的試料由来のインバリアントNKT(iNKT)細胞の集団を拡大させる工程、ii) 工程i)で得られた集団中のCD4-iNKT細胞亜集団の拡大の存在または非存在を検出する工程、およびiii) iNKT細胞の集団からCD4-iNKT細胞亜集団

10

20

30

40

50

が拡大されていない場合、その候補ヒト移植ドナーは、ヒト移植レシピエントにおいてaGVHDを誘発するリスクが高いと結論付ける工程を含む方法に関する。

【0016】

本明細書中で使用する場合、「リスク」という用語は、急性GVHD(aGVHD)の発病のような特定期間にわたって事象が発生する蓋然性を指し、対象の「絶対」リスクまたは「相対」リスクを意味する場合がある。絶対リスクは、関連時間コホートに関する測定後の実際の観察を参照して、または関連時間コホートに関して続いて行われた統計学的に妥当な歴史的コホートから得られる指標値を参照して測定が可能である。相対リスクは、低リスクコホートの絶対リスクまたは平均集団リスクのいずれかと比較した対象の絶対リスクの比を指し、これは、臨床的リスク因子がどのように評価されるかにより様々であり得る。所定の試験結果に関して肯定的な事象対否定的な事象の比率であるオッズ比もまた、無変換に関して一般的に用いられる(オッズは、式 $p/(1-p)$ に従うものであり、ここで p は、事象の蓋然性であり、 $(1-p)$ は、事象なしの蓋然性である)。

10

【0017】

「リスク決定」は、本発明の状況では、事象が発生し得る蓋然性、オッズまたは可能性の予測を行うことを包含する。リスク決定はまた、予め測定された集団を参照して、絶対的または相対的な、年齢、性別不一致、HLA実験等のような将来の臨床的パラメーター、伝統的な研究室リスク因子値、またはaGVHDの他の指標の予測も包含し得る。本発明の方法は、移植レシピエントにおいてaGVHDを誘発するリスクのカテゴリー測定を行うのに使用されてもよく、したがってaGVHDを誘発するリスクがあるか、またはリスクがないと規定される移植ドナーのカテゴリーのリスク範囲を規定して、そのようにして安全なドナーを選択するのに有用である。

20

【0018】

本明細書中で使用する場合、「移植ドナー」という用語は、移植されるべき臓器、組織または細胞が収集される対象を指す。本明細書中で使用する場合、「移植レシピエント」という用語は、移植される臓器、組織または細胞を受ける対象を指す。本明細書中で使用する場合、「移植材料」(または「移植片」)という用語は、対象への移植後に組織に取り込まれる遊離(非結合)細胞、組織または臓器を指す。造血幹細胞移植(HSCT)の状況内では、移植材料は、通常G-CSFによる流動後の末梢血、骨髓または臍帯血に由来する多能性造血幹細胞である。

30

【0019】

本明細書中で使用する場合、「生物学的試料」という用語は、対象(例えば、移植ドナー)から単離される任意の試料、好ましくは末梢血単核細胞(PBMC)を含有する試料を指す。かかる試料の例としては、流体、組織、細胞試料、臓器、生検等が挙げられる。最も好ましい試料は、血液試料、臍帯血試料または移植片試料(例えば、末梢血幹細胞(PBSC)移植片試料または骨髓(BM)移植片試料)である。

【0020】

本明細書中で使用する場合、「血液試料」という用語は、全血、血漿および血清を含む試料を指す。

【0021】

40

本明細書中で使用する場合、「NKT細胞」(ナチュラルキラーT細胞)という用語は、リンパ球の亜集団を指し、より詳細には、自然免疫応答と適応免疫応答との間に関連性を提供するCD1d拘束性T細胞の特有のサブセットを指す。実際に、T細胞受容体およびNK細胞マーカーを同時発現するNKT細胞は、自己免疫疾患、感染性疾患および癌を含む各種免疫疾患における免疫性の幾つかの態様に必須である。主要組織適合性複合体(MHC)MHCクラス1またはMHCクラス2により提示される小ペプチド抗原を認識する従来のT細胞と異なり、NKT細胞は、MHCクラス1様分子であるCD1dにより提示される糖脂質抗原を認識する。

【0022】

本明細書中で使用する場合、「iNKT」(インバリアントNKT細胞)という用語は、マウスではV[アルファ]14-J[アルファ]18鎖(ヒトではV[アルファ]24-J[アルファ]18)で構成され

50

るインバリアントナチュラルT細胞受容体(TCR)を発現する1型NKT細胞とも呼ばれるNKT細胞の主要サブセットを指す。アルファ-ガラクトシルセラミドのようなリガンドによるTCR刺激時に、iNKT細胞は、IL-4、IFN-[ガンマ]、IL-12およびGM-CSFを含む広範囲のサイトカインを迅速に産生する。iNKT細胞は、ヒトでは明確なサイトカイン分泌プロファイルを有する2つの主なサブセット(または亜集団)、即ちCD4+およびCD4-細胞を含むことにさらに留意すべきである。リガンドに対するこの迅速かつ強力な応答は、iNKT細胞が、自然免疫性および獲得免疫性において各種免疫細胞の活性を増強または調節するのを可能にする。

【0023】

1つの実施形態では、aGVHDは、グレードII～IVのaGVHDである。

10

【0024】

1つの実施形態では、候補ヒト移植ドナーは、HLA同一適合同胞ドナー(MSD)である。別の実施形態では、候補ヒト移植ドナーは、HLA適合非血縁ドナー(MUD)である。さらに別の実施形態では、候補ヒト移植ドナーは、不適合非血縁ドナーである。移植材料はまた、ハプロタイプ一致(haploidentical)ドナー由来、または4/6～6/6 HLA(A、B、DR)適合臍帯血由来であり得る。

【0025】

1つの実施形態では、CD4-iNKT細胞亜集団は、CD3+CD4-TCRV α 24V β 11細胞の集団である。

【0026】

iNKT細胞の集団を拡大させる工程(i)は、当業者に公知の非特異的刺激または抗原特異的刺激のいずれかを使用して、種々の方法により実施され得る。通常、拡大は、iNKT細胞の集団を、糖脂質抗原(例えば、アルファ-ガラクトシルセラミド(アルファ-GalCer))とともに培養することにより得られ得る。

20

【0027】

本明細書中で使用する場合、「拡大させる」という用語は、細胞(例えば、T細胞のような免疫細胞)の所定の集団を活性化および増幅するプロセスを指す。T細胞の拡大は、好ましくは、T細胞および/もしくは抗原特異的刺激剤、または例えば抗原、細胞、抗体、レクチン等の存在下でT細胞を含む細胞集団を培養することにより実施される。拡大はまた、サイトカインの存在下でのT細胞の培養を必要とする場合もある。

30

【0028】

CD4-iNKT細胞亜集団の拡大の存在または非存在を検出する工程(ii)は、フローサイトメトリー方法、磁気ビーズ、生分解性ビーズ、非生分解性ビーズに対して標識された抗体による親和性方法、およびかかる方法の組合せを使用したハイスループット細胞選別のような免疫選択技法を含む当業者に利用可能な特定の免疫細胞集団を検出する各種方法により実施され得る。

【0029】

本明細書中で使用する場合、「フローサイトメトリー方法」は、対象の細胞を流体流中に懸濁させて、それらを電子検出装置に通すことにより、対象の細胞を計数する技法を指す。フローサイトメトリー方法は、蛍光パラメーターのような毎秒最大数千個もの粒子の物理的および/または化学的パラメーターの同時多重パラメトリック解析を可能にする。最新のフローサイトメトリー機器は通常、多重レーザーおよび蛍光検出器を有する。フローサイトメトリー技法の一般的な変形は、「蛍光標示式細胞選別」を使用して、対象の集団を精製または検出するように、粒子の特性に基づいて粒子を物理的に選別することである。本明細書中で使用する場合、「蛍光標示式細胞選別」(FACS)は、各細胞の特定光散乱および蛍光特性に基づいて、生物学的試料由来の細胞の異種混合物を、細胞1つずつ、2つ以上の容器へ選別するフローサイトメトリー方法を指し、個々の細胞からの蛍光シグナルの迅速で客観的かつ定量的な読み取り、ならびに特定の対象の細胞の物理的分離を提供する。したがって、FACSは本明細書中に記載する方法とともに使用して、CD4-iNKT細胞亜集団を単離および検出することができる。

40

50

【0030】

あるいは、免疫細胞集団(例えば、iNKT細胞)に関する単離および検出は、磁気ビーズのようなビーズをベースとする選別方法を使用して実施され得る。

【0031】

かかる方法を使用して、細胞は、特定の細胞表面マーカーに関して陽性または陰性で分離および検出され得る。

【0032】

本明細書中で規定する場合、「陽性選択」は、特異的細胞表面マーカーを発現する細胞の単離および検出をもたらす技法を指し、「陰性選択」は、特異的細胞表面マーカーを発現しない細胞の単離および検出をもたらす技法を指す。幾つかの実施形態では、ビーズは、市販のビーズ結合キットのような当業界公知の標準的な技法を使用して当業者により抗体でコーティングされ得る。幾つかの実施形態では、陰性選択工程は、1つまたは複数の系譜マーカーを発現する細胞を除去するように実施され、続いてiNKT細胞のサブセット(即ち、CD4-iNKT細胞)を陽性に選択および検出するように蛍光標示細胞選別を行う。

【0033】

かかる方法では、免疫細胞集団は、細胞表面マーカーまたは抗原と特異的に結合する抗体またはテトラマーのような他の物質で単離および検出され得る。

【0034】

本明細書中で使用する場合、「細胞表面マーカーと特異的に結合する物質」は、その細胞表面マーカーと特異的に反応し得るか、またはそれに結合し得るが、別の細胞表面もしくは細胞内マーカーまたは抗原に対して検出可能な反応性がほとんどないか、または全くない物質を指す。例えば、CD4と特異的に結合する物質は、CD8と結合しない。したがって、細胞表面マーカーと特異的に結合する物質は、上記マーカーの特有の構造的性質を認識する。幾つかの実施形態では、細胞表面マーカーと特異的に結合する物質は、細胞表面マーカーに結合するが、その細胞表面マーカーにより媒介される下流シグナル伝達事象の開始を引き起こさない(例えば非活性化抗体)。細胞表面マーカーと特異的に結合する物質としては、抗体またはそれらの抗原結合フラグメント、天然または組換えリガンド、小分子、核酸配列および核酸類似体、アダプターおよび他のタンパク質またはペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0035】

幾つかの実施形態では、好ましい物質は、細胞表面マーカーと特異的に結合する抗体であり、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびにそれらの抗原結合誘導体またはフラグメントを包含し得る。周知の抗原結合フラグメントとしては、例えば、単一ドメイン抗体(dAb; 単一VLまたはVH抗体ドメインで本質的に構成される)、単鎖Fvフラグメント(scFv)を含むFvフラグメント、FabフラグメントおよびF(ab')₂フラグメントが挙げられる。かかる抗体分子の構築に関する方法は、当業界周知である。したがって、本明細書中で使用する場合、「抗体」という用語は、無傷の免疫グロブリン、またはFc(結晶性フラグメント)領域を有するモノクローナルもしくはポリクローナル抗原結合フラグメント、またはFc領域のFcRn結合フラグメントを指す。抗原結合フラグメントは、組換えDNA技法により、または無傷抗体の酵素的もしくは化学的切断により産生され得る。「抗原結合フラグメント」は、とりわけ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb、および相補性決定領域(CDR)フラグメント、単鎖抗体(scFv)、単一ドメイン抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体(dibodies)およびポリペプチドに特異的な抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチドを包含する。Fab、Fc、pFc'、F(ab')₂およびFvという用語は、標準的な免疫学的意味で用いられる(Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 第7版(Blackwell Scientific Publications社、Oxford))。かかる抗体または抗原結合フラグメントは、R&D Systems社、BD Biosciences社、e-Biosciences社、Proimmune社およびMiltenyi社のような販社から市販されているか、または当業者に公知の方法によりこれらの細胞表面マーカーに対して産生させることができる。

【0036】

幾つかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントのような細胞表面マーカーに特異的に結合する物質は、免疫細胞またはiNKT細胞集団の単離および検出を容易にするためのタグで標識される。

【0037】

本明細書中で使用する場合、「標識」または「タグ」という用語は、生物学的試料において特異的細胞表面マーカーの存在のような標的の存在を示す検出可能なシグナルを產生することが可能な組成物を指す。適切な標識としては、蛍光分子、放射性同位体、ヌクレオチドクロモフォア、酵素、基質、化学発光部分、磁気粒子、生物発光部分等が挙げられる。したがって、標識は、免疫細胞またはiNKT細胞集団を単離および検出する方法に必要とされる分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能な任意の組成物である。本発明の方法における使用のための抗体のような物質を標識するための蛍光標識またはタグの非限定的な例として、ヒドロキシクマリン、スクシンイミジルエステル、アミノクマリン、スクシンイミジルエステル、メトキシクマリン、スクシンイミジルエステル、カスケードブルー(Cascade Blue)、ヒドラジド、パシフィックブルー(Pacific Blue)、マレイミド、パシフィックオレンジ(Pacific Orange)、ルシファーイエロー(Lucifer yellow)、NBD、NBD-X、R-フィコエリトリン(PE)、PE-Cy5複合体(サイクローム(Cychrome)、R670、トリ-カラー(Tri-Color)、クワンタムレッド(Quantum Red))、PE-Cy7複合体、レッド613、PE-テキサスレッド、PerCP、ペリジニクロロフィルタンパク質、TruRed(PerCP-Cy5.5複合体)、FluorX、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、BODIPY-FL、TRITC、X-ローダミン(XRITC)、リサミンローダミンB、テキサスレッド、アロフィコシアニン(APC)、APC-Cy7複合体、アレキサフルオア(Alexa Fluor)350、アレキサフルオア405、アレキサフルオア430、アレキサフルオア488、アレキサフルオア500、アレキサフルオア514、アレキサフルオア532、アレキサフルオア546、アレキサフルオア555、アレキサフルオア568、アレキサフルオア594、アレキサフルオア610、アレキサフルオア633、アレキサフルオア647、アレキサフルオア660、アレキサフルオア680、アレキサフルオア700、アレキサフルオア750、アレキサフルオア790、Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5またはCy7が挙げられる。

【0038】

1つの特定の実施形態では、CD3+CD4-TCR $V\alpha 24V\beta 11$ 細胞の集団は、CD4と特異的に結合する標識された物質(例えば、CD4と特異的に結合する標識された抗体)、CD3と特異的に結合する標識された物質(例えば、CD3と特異的に結合する標識された抗体)、およびiNKT細胞のCD1d拘束性TCR $V\alpha 24V\beta 11$ と特異的に結合する標識された物質(例えば、CD1d/PBS-57テトラマーまたはProImmune社から購入されるもののような糖脂質組み込み済みヒトCD1dテトラマー)を使用することにより検出され得る。

【0039】

1つの実施形態では、iNKT細胞の集団を拡大させる工程i)は、(a)前記候補ヒト移植ドナーから得た生物学的試料由来の末梢血単核細胞(PBMC)を単離する工程、および(b)iNKT細胞の増殖を刺激する物質およびiNKT細胞を活性化する物質の両方を含む培地中で前記PBMCを培養する工程により実施される。

【0040】

候補ヒト移植ドナーから得た生物学的試料由来の末梢血単核細胞(PBMC)を単離する工程(a)は、当業者により周知の方法により実施され得る(例えば、Ficoll-Paque(登録商標)密度勾配遠心分離のような密度遠心分離による)。

【0041】

iNKT細胞の増殖を刺激する物質およびiNKT細胞を活性化する物質の両方を含む培地中でPBMCを培養する工程(b)は、iNKT細胞の拡大に必要とされる所要時間、実施されると予想される。

【0042】

通常、対象の培地を用いたPBMCの培養は、少なくとも10日間、好ましくは少なくとも12日間、さらに好ましくは少なくとも15日間実施されると予想される。

【0043】

本明細書中で使用する場合、「培地」という用語は、細胞の生存を維持し、増殖を支持する栄養分を含有する、細胞集団の維持または細胞集団の培養のための培地(例えば、「培養培地」)を指す。培地は、適切な組合せで下記:塩、緩衝液、アミノ酸、グルコースまたは他の糖、抗生物質、血清または血清代替物、および成長因子、サイトカイン等のような他の成分のいずれかを含有してもよい。特定の細胞型に通常使用される培地は、当業者に公知である。本発明の培地は、Invitrogen社からのRPMI1640のような市販の培地をベースとしていてもよい。

【0044】

本明細書中で使用する場合、「iNKT細胞の増殖を刺激する物質」は、iNKT細胞の成長を増加させることができる天然または合成の任意の化合物を指す。

10

【0045】

好適には、iNKT細胞の増殖を刺激する物質は、IL-2、IL-7およびIL-15からなる群から選択される。

【0046】

1つの特定の実施形態では、iNKT細胞の増殖を刺激する物質は、IL-2である。好ましくは、IL-2は、組換えヒトインターロイキン-2(rhIL-2)である。さらに、rhIL-2は医薬品用途で市販されていることが予想される。適切な市販形態としては、例えば、組換えヒトIL-2組成物であるプロロイキン(Proleukin)(登録商標)が挙げられる。

【0047】

本明細書中で使用する場合、「iNKT細胞を活性化する物質」は、CD1dと結合して、順に樹状細胞(DC)の成熟を誘導することにより、およびNK細胞、マクロファージおよび従来のTリンパ球のような他の免疫細胞の機能に影響を及ぼすことにより自然/適応免疫応答を増幅または調節するTh1サイトカイン(例えば、IFN- γ)および/またはTh2サイトカイン(例えば、IL-4)の強力な産生を引き起こすインバリアントナチュラルT細胞受容体(TCR)を活性化することができる天然または合成の任意の化合物を指す。

20

【0048】

好適には、iNKT細胞を活性化する物質は、糖脂質抗原、特にアルファ-ガラクトシルセラミド(アルファ-GalCer)および類似体のようなスフィンゴ糖脂質抗原である。

【0049】

本明細書中で使用する場合、「アルファ-ガラクトシルセラミド」(アルファ-GalCerまたは(2S,3S,4R)-1-O-(アルファ-D-ガラクトシル)-N-ヘキサコサノイル-2-アミノ-1,3,4-オクタデカントリオール、KRN7000とも称される)という用語は、海綿由来のスフィンゴ糖脂質を指し、これはiNKT細胞に関するスーパーアゴニスト抗原である(米国特許第5,936,076号に記載)。

30

【0050】

本明細書中で使用する場合、「アルファ-GalCer類似体」という用語は、アルファ-GalCerのような方法で同じサイトカイン産生を引き起こす天然または合成の任意の化合物を指す。したがって、かかる化合物としては、アルファ-GalCer誘導体ならびに構造がアルファ-GalCerに類似している化合物が挙げられ、当業者周知である。他の類似体は、例えば国際特許出願W093/05055号、W094/09020号、W094/24142号、W094/02168号およびW098/44928号に記載されている。

40

【0051】

1つの実施形態では、iNKT細胞を活性化する物質は、アルファ-ガラクトシルセラミド(アルファ-GalCer)、アルファ-グルクロノシルセラミド、ホスファチジルイノシトールトラマンノシド、イソグロボトリヘキソシルセラミド、ガングリオシドGD3、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スルファチド、ベータ-ガラクトシルセラミド、リボホスホグリカン、グリコイノシトールリン脂質、ベータ-アノマーガラクトセラミドおよびアルファ-アノマーガラクトシルセラミドを含むアルファ-ガラクトシルセラミド類似体、および細菌脂質抗原からなる群から選択さ

50

れる糖脂質抗原である。

【0052】

1つの特定の実施形態では、iNKT細胞を活性化する物質は、アルファ-GalCerである。

【0053】

アルファ-GalCerは、通常、1~500ng/mlの範囲の濃度で、好ましくは100ng/mlで、本発明の培養培地に添加される。

【0054】

IL-2は、通常、1~100ng/mlの範囲の濃度で、好ましくは50ng/mlで、本発明の培養培地に添加される。

【0055】

好ましい実施形態では、アルファ-GalCerは、0日目に本発明の培養培地に添加され、続いてIL-2は、1日目に培養培地に添加される。

【0056】

ヒト移植ドナーを選択する方法:

本発明はさらに、ヒト移植ドナーを選択する方法を提供する。上述の方法によって獲得された情報を使用して、急性GVHDの発症を回避するか、または最低限に抑えるために、数人の予め同定されている適合ドナーの中で移植ドナーを選択することができる。

【0057】

したがって、第2の態様では、本発明は、ヒト移植レシピエントにおいて急性GVHDを誘発するリスクを低減するようにヒト移植ドナーを選択する方法であって、i)請求項1に記載のリスクを決定する方法を実施する工程、およびii)前記リスク決定に従って前記ドナーを選択する工程を含む方法に関する。

【0058】

本方法は、例えば、上述のリスクを決定する方法のいずれかを使用すること、および得られた結果を考慮して、急性GVHDのリスクを低減するように移植レシピエントに関して最良の移植ドナーを選択することにより実施され得る。CD4-iNKT細胞亜集団の拡大のレベルが、ドナーがGVHDを誘発するリスクがあることを示す場合、別の適合ドナーを同定することが必要な場合がある。

【0059】

実際に、同種HSCTにおける移植幹細胞拒絶または急性GVHDのリスクを制限するために、ドナーは好ましくは、レシピエントと同じヒト白血球抗原(HLA)を有すると予想される。適合ドナーは、可能性のあるドナーの血液からさらなるHLA試験を行うことにより見出される。HLA遺伝子は、2つのカテゴリー(タイプIおよびタイプII)に収まる。概して、タイプI遺伝子(即ち、HLA-A、HLA-BまたはHLA-C)の不適合は、移植片拒絶のリスクを増大させる。HLAタイプII遺伝子(即ち、HLA-DRまたはHLA-DQB1)の不適合は、移植片対宿主病のリスクを増大させる。適合は、HLA遺伝子の3つ以上の遺伝子座での変動に基づいて実施され、これらの遺伝子座で完全に適合していることが好ましい。これらの重要な対立遺伝子で良好な適合が存在する場合でも、レシピエントは、移植片対宿主病を緩和するための免疫抑制投薬を要する。同種移植ドナーは、血縁関係にあってもよく(通常、密接にHLA適合した同胞またはMSD)、または血縁関係でなくてもよい(血縁関係ではなく、非常に密接な度合いのHLA適合を有することがわかっているドナーまたはMUD)。非血縁ドナーは、国際骨髓ドナープログラム(International Marrow Donor Program)のような骨髓ドナーの登録から見出すことが可能である。

【0060】

免疫抑制治療を調節する方法:

本発明はさらに、個別治療計画を開発する方法を提供する。上述の方法によって獲得された情報を使用して、移植レシピエントごとに個別治療計画を開発することができる。

【0061】

したがって、さらなる態様では、本発明は、ヒト移植レシピエントに移植片移植した後に該レシピエントに施される免疫抑制治療を調節する方法であって、i)本発明によるリス

10

20

30

40

50

クを決定する方法を実施する工程、およびii)免疫抑制治療を調節する工程を含む方法に関する。

【0062】

本方法は、例えば、上述のリスクを決定する方法のいずれかを使用して、および得られた結果を考慮して、移植レシピエントに関する治療計画を設計することにより実施され得る。CD4-iNKT細胞亜集団の拡大のレベルが、レシピエントが望ましくない臨床結果(例えば、aGVHDの発症)のリスクがあることを示す場合、レシピエントは、有効量の免疫抑制治療(例えば、抗拒絶剤)による治療に関する候補である。CD4-iNKT細胞亜集団の拡大のレベル(即ち、解析される生物学的試料中の亜集団の拡大の存在または非存在)に応じて、レシピエントは、標準的なレジメンよりも程度の差はあるが積極的な治療レジメンを必要とする可能性があるか、またはレシピエントが標準的なレジメンに最もよく適合すると決定される可能性がある。そのように治療されると、aGVHDのような移植に関連する合併症を治療または防止することができる。逆に、CD4-iNKT細胞亜集団の拡大のレベルは、患者が望ましくない臨床結果を経る可能性が低いことの指標となる場合もある。そのような事象では、患者は、免疫抑制治療を回避し(または、あまり積極的ではないレジメンを必要とし)、それらの関連副作用も回避し得る。

10

【0063】

プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、T細胞に対するモノクローナル抗体(例えば、OKT3)およびヒトリンパ球に対する抗血清(抗リンパ球グロブリン-ALS)または胸腺細胞に対する抗血清(抗胸腺細胞グロブリン-ATG)のような、拒絶を制御するための移植に使用される任意の免疫抑制剤、またはかかる物質の組合せが、本発明により使用することができる。本発明により使用することができる骨髓破壊剤の例は、ブスルファン、ジメチルミレランおよびチオテパである。

20

【0064】

本発明によるキット:

本発明はさらに、本発明による方法を実施するのに適したキットに関する。かかるキットは、上述したような、少なくともa)iNKT細胞の増殖を刺激する物質、b)iNKT細胞を活性化する物質およびc)CD4と特異的に結合する標識された物質を含み得る。

【0065】

1つの実施形態では、キットは、少なくともIL-2、アルファ-GalCerおよびCD4と特異的に結合する標識された抗体を含む。

30

【0066】

特定の実施形態では、本キットはさらに、d)CD3と特異的に結合する標識された物質(例えば、CD3と特異的に結合する標識された抗体)、およびe)iNKT細胞のCD1d拘束性TCR $V\alpha 24V\beta 11$ と特異的に結合する標識された物質(例えば、CD1d/PBS-57テトラマーまたはProImmune社から購入されるもののような組み込み済みヒトCD1dテトラマー)をさらに含む。

【0067】

本キットは、本発明による方法を実施するのに有用な1つまたは複数の生化学的試薬(例えば、PBSおよび洗浄緩衝液のような緩衝液溶液)をさらに含んでもよい。

【0068】

下記図面および実施例により、本発明をさらに説明する。しかしながら、これらの実施例および図面は、いかなる場合においても本発明の範囲を限定すると解釈されないものとする。

40

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】(A)抗CD3およびPBS57組み込み済みCD1d-テトラマー(左)または陰性対照として使用される空のCD1d-テトラマー(右)で染色された総iNKT細胞、および(B)ゲーティングされたiNKT細胞のCD4発現プロファイルの代表的なFACSプロファイルである。

【図2】ドナー移植片由来のCD4-iNKT細胞集団の拡大の結果の描写である。(A)CD4-iNKT亜集団が存在し、iNKTの集団から培養で拡大されたもの、または(B)CD4-iNKT亜集団が存

50

在せず、および/またはiNKTの集団から培養で拡大されなかったもの。

【図3】グレードII～IVのaGVHDのリスクを予測するROC解析である。(A):移植片CD4-iNKT/T比の予測値、(B)および(C):移植片CD4-iNKT細胞の拡大因子の予測値。

【図4】グレード0～I対グレードII～IVのaGVHDを発症する患者のPBSC移植片由来の培養物における0日目(A)および15日目(B)のCD4-iNKT細胞/ウェルの比較である。

【実施例】

【0070】

移植後のレシピエントにおける急性GVHDの発生時のHSCTドナーの移植片または末梢血のいずれか由来のCD4-iNKT細胞の移植片含有量および拡大能力の解析

材料および方法

iNKT細胞拡大:血液または骨髓試料由来のドナーのPBMCを、100U/mLの抗生物質(ペニシリン+ストレプトマイシン)、10%FBS、2mMグルタミンおよび10mM HEPESを含有するRPMI 1640培地中でウェル1つ当たり 10^6 個の細胞の密度で24ウェルプレートにおいて培養する。100ng/mLのアルファ-ガラクトシルセラミド(KRN7000)を培養の開始時、続いて24時間後に、50ng/mL(または845UI/mL)のrhIL-2を添加する。2週後、細胞を収集して、広範囲にわたって洗浄して、トリパンブルー排除により、それらの生存度に関してアッセイする。

【0071】

表面染色:新鮮な、または培養したドナーのPBMCをフローサイトメトリーにより解析する。PBMCの染色は、下記の直接蛍光的に結合されたモノクローナル抗体:アルファ-GalCer組み込み済みヒトCD1dテトラマー(ProImmune社から)、抗ヒトCD3および抗ヒトCD4(eBioscience社から)の存在下で、4°Cで30分間実施する。細胞を、PBS 1X+2%FBS中に再懸濁させて、アルファ-GalCer組み込み済みヒトCD1dテトラマーでまず染色して、PSB 1×FBS 2%で洗浄して、続いて抗CD3抗体および抗CD4抗体で染色する。細胞をFACSCanto II(BD Biosciences社)で獲得して、FlowJoソフトウェア(Tree Star社)を使用して解析する。

【0072】

患者および方法:本発明者らは、54名の同種ドナー由来のiNKT細胞を含むT細胞亜型におけるHSC移植片の含有量を解析し(適合血縁52%および適合非血縁48%)、それらのうちの34種においてiNKT細胞の拡大能力を研究することができた(14種の骨髓幹細胞および21種のPBSC)。移植片含有量の比率と、CD4⁻およびCD4⁺iNKT、CD4⁺、CD8⁺、 $\gamma\delta$ ⁺ならびにナイーブおよびメモリー活性化調節T細胞の合計絶対数をフローサイトメトリーにより解析した。iNKT CD4⁺およびCD4⁻亜集団の拡大能力は、IL-2およびアルファ-GalCerとのPBMC培養の15日後に解析した。

【0073】

結果は、同種HSCT後のレシピエントにおいてグレードII～IVのaGVHDの発症と相関しており、すなわち54名の患者のうち15名(28%)で、およびiNKT亜型の拡大能力に関して研究できた21種のPBSC移植片のうち6種(28.5%)で発症がみられた。

【0074】

結果

図1に示されるように、総iNKT細胞集団は、CD3+およびCD1d-テトラマー+細胞においてフローサイトメトリーにより検出することができる(図1A)。CD4⁻およびCD4⁺iNKT亜集団は、抗CD4標識抗体の使用により検出される(図1B)。

【0075】

図2に示されるように、IL-2およびアルファ-GalCerの存在下でのiNKT細胞のin vitroでの拡大の12～15日後に、CD4-iNKT亜集団の拡大(2A)またはなし(2B)に応じて、2つの明確な状況を観察する。

【0076】

種々の研究されたリンパ球サブセット間での単変量解析(Table 1(表1))および関数解析では、総iNKT/T、CD4⁻iNKT/T比およびCD4⁻iNKT細胞の拡大能力のみが、グレードII～IVのaGVHD発生と有意な関連を示した(それぞれ、 $p=0.039$ 、 $p=0.038$ および $p=0.008$)。したがって、これまでに報告されたように、グレードII～IVのaGVHDを発症する患者と比較して

10

20

30

40

50

、グレード0～IのaGVHDを発症する患者は、より高比率のCD4⁺iNKT細胞を含有する移植片を受け入れた。

【0077】

【表1】

Table 1: T 細胞サブセット中の移植片含有量とグレードII～IVのaGVHD発生との相関の単変量解析

変数	グレードII～IVのaGVHD 平均(SD)		p 値
	yes	No	
CD34+ x 10 ⁶ /kg	4.2 (2.7)	4 (2.1)	0.9
T CD3+ x 10 ⁷ /kg	29.9 (16.6)	26.3 (14.6)	0.44
総 iNKT x 10 ⁶ /kg	0.16 (0.32)	0.18 (0.23)	0.29
CD4+ iNKT x 10 ⁶ /kg	0.04 (0.08)	0.07 (0.15)	0.26
CD4- iNKT x 10 ⁶ /kg	0.12 (0.27)	0.14 (0.19)	0.26
LTCD4+ x 10 ⁶ /kg	86.1 (83.6)	76.3 (88)	0.5
LTCD8+ x 10 ⁶ /kg	54.9 (55.1)	56.3 (71.3)	0.96
LTCD3 γδ+ x 10 ⁶ /kg	12.8 (14.4)	13.7 (19.3)	0.5
総制御性 T 細胞 x 10 ⁶ /kg	1.2 (1.7)	1.5 (2.1)	0.59
総 iNKT/10 ³ T	1.1 (1.3)	1.9 (1.8)	0.039
CD4+ iNKT/10 ³ T	0.3 (0.4)	0.5 (0.7)	0.13
CD4- iNKT/10³T	0.7 (0.9)	1.3 (1.5)	0.038
LTCD4+/10 ³ T	580.6 (112.9)	567 (109.6)	0.68
LTCD8+/10 ³ T	375.5 (90.2)	390.7 (88.2)	0.57
総制御性 T 細胞/10 ³ T	6.7 (4.5)	9.9 (9.1)	0.54
LTCD3 γδ+/10 ³ T	123.9 (82.3)	129.4 (104.1)	0.91
拡大因子.iNKT.CD4+	260.5 (317.9)	287.8 (633.4)	0.77
拡大因子.iNKT.CD4-	15.7 (30.6)	35.3 (43.0)	0.008

【0078】

多変量解析(Table 2(表2))では、移植片中に含有されるCD4⁺iNKT細胞の拡大能力は、グレードII～IVのaGVHD発生の独立した予測因子であり(オッズ比=0.19、95% CI:0.029～0.55、p=0.017)、非血縁ドナーの使用も同様であった(p=0.028)。

【0079】

【表2】

Table 2: グレードII～IVのaGVHD発生における移植材料特徴の影響の多変量解析

	OR	[95%CI]	p 値
CD4 ⁺ iNKT 細胞の拡大因子	0.19	[0.029-0.55]	0.017
レシピエント年齢	0.88	[0.67-1.01]	0.18
ドナー年齢	1.13	[0.99-1.4]	0.14
MRD 対 MUD	6.6.10 ⁻⁴	[1.1.10 ⁻⁸ -7.6.10 ⁻²]	0.028

【0080】

ROC解析(図3)を使用して、本発明者らは、移植片に含有されるCD4⁺iNKT細胞の拡大因子が、グレードII～IVのaGVHD発生の最良の予測因子であることを見出した(曲線下面積(AUC)=0.76)。全ての移植片を含めて、試験の感度は96%であり(1.8未満の拡大因子を伴うaGVHDを発症する蓋然性)、特異度は70%であった(カットオフを上回るaGVHDを発症しない蓋然性)。PBSC移植片(6つのグレードII～IVのaGVHDを有するn=21)では、試験の予測性は、AUC

=1でさらに良好であり、感度および特異度は100%であった(図3および図4)。

【0081】

本発明者らは、15名のドナーにおいて、G-CSFによる流動前の末梢血または移植片のいずれか由来のCD4⁺iNKT細胞の拡大能力の類似のパターンを観察した(Table 3(表3))。

【0082】

【表3】

Table 3: 12種のPBSCおよび3種のBMCを解析したドナーにおける移植片または末梢血試料由来のCD4⁺iNKT細胞の拡大能力の比較

ドナー番号	移植片のタイプ	下記由来CD4 ⁺ iNKT細胞の拡大能力	
		HSC 移植片	末梢血
1	PBSC	+	+
2	PBSC	+	+
3	PBSC	+	+
4	PBSC	-	-
5	PBSC	+	+
6	PBSC	+	+
7	PBSC	+	+
8	PBSC	+	+
9	PBSC	+	+
10	PBSC	+	+
11	PBSC	+	+
12	PBSC	+	+
13	BMC	+	+
14	BMC	+	+
15	BMC	+	+

10

20

【0083】

参考文献:

本出願全体にわたり、様々な参考文献が本発明が関連する技術分野の最新技術を説明している。これらの参考文献の開示は、参照により本開示に組み込まれる。

30

【図 1】

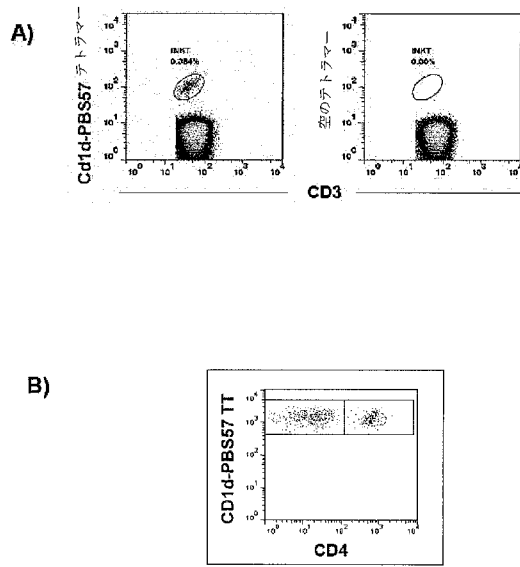


Figure 1

【図 2】

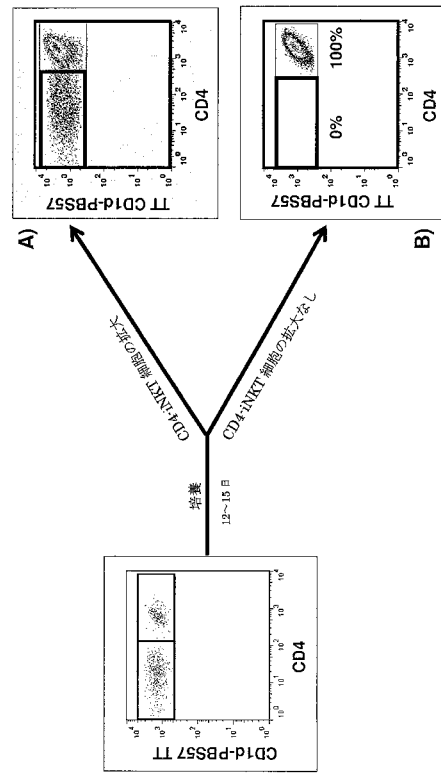


Figure 2

【図 3】

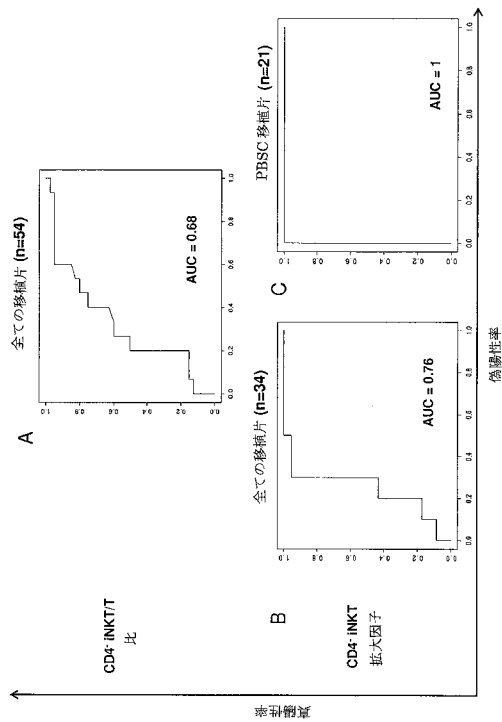


Figure 3

【図 4】

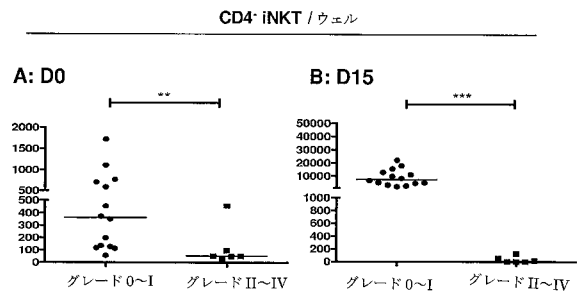


Figure 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/074407

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/68 G01N33/50 G01N33/569
ADD.

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)
G01N

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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/062160 A2 (CHILDRENS MEDICAL CENTER [US]; DANA FARBER CANCER INST INC [US]; LEVY) 14 May 2009 (2009-05-14) abstract; claims ----- -/--	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

"E" earlier application or patent 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 2013

Date of mailing of the international search report

13/12/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stricker, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/074407

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	A. CHAIDOS ET AL: "Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation", BLOOD, vol. 119, no. 21, 24 May 2012 (2012-05-24) , pages 5030-5036, XP055053616, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2011-11-389304 cited in the application the whole document page 5031, paragraph "iNKT-cell expansion" table 2 page 5035, column 2, paragraph 2 -----	1-11
Y	ALBERT BENDELAC ET AL: "The Biology of NKT Cells", ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 1, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 297-336, XP055053778, ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711 abstract page 298 -----	5,11

Information on patent family members

PCT/EP2013/074407

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009062160 A2	14-05-2009	US 2012238460 A1	20-09-2012
		WO 2009062160 A2	14-05-2009

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 507139834

アシスタンス ピュブリック・オピト ドゥ パリ
フランス国、75004 パリ、アベニュー・ビクトリア 3

(71)出願人 506413856

ユニヴェルシテ・パリ・デカルト
フランス・F-75270・パリ・セデックス・06・リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥシン
ヌ・12

(71)出願人 515135664

イマジニ・アンスティテュ・デ・マラディ・ジェネティーク・ネカー・アンファン・マラディ
フランス・F-75015・パリ・ブルヴァール・デュ・モンパルナス・24

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 オリヴィエ・エルミーヌ

フランス・75743・パリ・セデックス・15・リュ・ドゥ・セヴール・161・オピタル・ネ
カー・セエンエルエス・ユエムエル・8147

(72)発明者 マリー・テレーズ・ルビオ

フランス・75743・パリ・セデックス・15・リュ・ドゥ・セヴール・161・オピタル・ネ
カー・セエンエルエス・ユエムエル・8147

(72)発明者 マリー・ブイリ

フランス・75743・パリ・セデックス・15・リュ・ドゥ・セヴール・161・オピタル・ネ
カー・セエンエルエス・ユエムエル・8147

(72)発明者 マリア・レチェ・ドゥ・モランイス

フランス・75743・パリ・セデックス・15・リュ・ドゥ・セヴール・161・オピタル・ネ
カー・セエンエルエス・ユエムエル・8147

Fターム(参考) 2G045 AA25

4B063 QA01 QA19 QQ08 QR66 QS32 QS33 QX01
4C087 AA01 AA02 BB63 MA67 NA06 NA10 ZB08

专利名称(译)	确定急性移植抗宿主病风险的方法		
公开(公告)号	JP2016503302A	公开(公告)日	2016-02-04
申请号	JP2015543434	申请日	2013-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	安塞尔·芒研究所国立Rasante埃杜拉尔壳邦医疗 法国国家科学研究中心 援助狮砖鸦片到巴黎 单威赛引用巴黎笛卡尔 异魔神昂斯红茶主题ユデマラディジェネティークネカーアンファンマラディ		
申请(专利权)人(译)	安塞姆 (安妮国立研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗) 中心Nasuionaru德拉RECHERCHE扫描速率赌注网络点击 (硒.恩 , 萨尔瓦多 , 居) . 援助Pyuburikku - OPITO巴黎 巴黎大学笛卡尔 试想德研究所马拉迪吉尼柚木内卡河安妮面包车马拉迪		
[标]发明人	オリヴィエエルミーヌ マリーテレーズルビオ マリーブイリ マリアレチェドゥモランイス		
发明人	オリヴィエ・エルミーヌ マリー・テレーズ・ルビオ マリー・ブイリ マリア・レチェ・ドゥ・モランイス		
IPC分类号	C12Q1/02 A61K35/12 A61P37/06 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/505 G01N33/56972 G01N33/6893 G01N2333/55 G01N2333/7051 G01N2333/70514 G01N2800/245 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/02 A61K35/12 A61P37/06 G01N33/48.M G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA25 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR66 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063 /QX01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/MA67 4C087/NA06 4C087/NA10 4C087/ZB08		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	2012306445 2012-11-21 EP		
其他公开文献	JP6599233B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种确定候选人类移植供体是否有在人类移植接受者中诱发急性移植抗宿主病 (aGVHD) 的风险的方法 , 其随后对接受者没有风险。 它可能允许选择捐助者。 本发明还涉及在执行本发明的风险确定方法之后 , 在移植到受体后调节对人移植受体的免疫抑制治疗的方法。 该方法包括扩增候选供体的iNKT细胞 (不变的NKT细胞) 并确定CD4 (-) iNKT细胞亚群扩增的存在与否。 特别地 , 确定了CD3 + CD4-TCRVα24Vβ11细胞。 公开了一种试剂盒。

(21) 出願番号	特願2015-543434 (P2015-543434)	(71) 出願人	507002516
(86) (22) 出願日	平成25年11月21日 (2013.11.21)		アンセルム (アンステイチュート・ナシオナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・メディカル)
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月8日 (2015.7.8)		フランス・F-75654・パリ・リュ・ドゥ・トルビアク・101
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/074407		
(87) 国際公開番号	WO2014/079946		
(87) 国際公開日	平成26年5月30日 (2014.5.30)		
(31) 優先権主張番号	12306445.3	(71) 出願人	506128396
(32) 優先日	平成24年11月21日 (2012.11.21)		サントル ナスイオナル ド ラ ルシエルシュ スイアンティフィク (セ.エン.エル.エス.)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		フランス国 エフ75016 パリ、リュミシエル アンジュ、3
最終頁に続く			