

(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2004-501165  
(P2004-501165A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28</b>	C07K 16/28	4B065
<b>A61K 39/395</b>	A61K 39/395	C 4C076
<b>A61K 47/48</b>	A61K 39/395	G 4C085
<b>A61P 11/06</b>	A61K 39/395	U 4H045
<b>A61P 15/04</b>	A61K 47/48	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 222 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-504312 (P2002-504312)  
 (86) (22) 出願日 平成13年6月19日 (2001.6.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年12月19日 (2002.12.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/019670  
 (87) 国際公開番号 W02001/098357  
 (87) 国際公開日 平成13年12月27日 (2001.12.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/212,466  
 (32) 優先日 平成12年6月19日 (2000.6.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

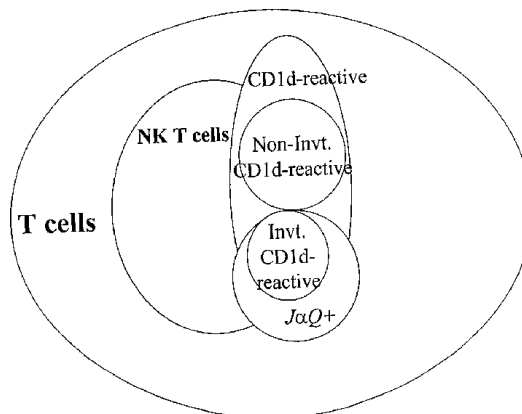
(71) 出願人 599036059  
 ベス イスラエル ディーコネス メディカル センター  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ ボストン ブルックリン アヴェニュー 330  
 (71) 出願人 399052796  
 ダナーファーバー キャンサー インステイテュート インク.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ビニー ストリート 44  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100108774  
 弁理士 橋本 一憲

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞亜集団に特異的なモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の組成物および使用方法

(57) 【要約】

本発明は、エキソピボまたはインピボにおけるNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJαQ+細胞の増殖、ならびにこれらの活性の調節のための、組成物および方法を提供する。これらの組成物および方法は診断および治療に利用することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

T細胞抗原受容体(TCR)に優先的に結合する精製抗体であって、TCRのCDR3ループ、もしくは - 接合(junction)に優先的に結合するか；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体。

## 【請求項 2】

インバリエントT細胞に優先的に結合して優先的に増殖させる、請求項1記載の精製抗体。

10

## 【請求項 3】

T細胞亜集団のTCRの抗原結合部位に優先的に結合する、請求項1記載の精製抗体。

## 【請求項 4】

TCRに優先的に結合する精製抗体の組み合わせであって、TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節し、かつ以下からなる群より選択される、抗体の組み合わせ：

(i) 抗V<sub>24</sub>抗体および抗CD161抗体；

(ii) 抗V<sub>24</sub>抗体および抗CD94抗体；

(iii) 抗V<sub>11</sub>抗体および抗CD161抗体；ならびに

(iv) 抗V<sub>11</sub>抗体および抗CD94抗体。

20

## 【請求項 5】

TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか、；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体の、断片または誘導体。

## 【請求項 6】

以下を含む二機能性抗体：

(a) TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節し；第1のエピトープに結合する、第1の抗体またはその断片；ならびに  
(b) TCRを発現するT細胞上に発現されるか、または第1の抗体もしくはその断片が結合しているNK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ Q<sup>+</sup> T細胞上に発現される、第2のエピトープに結合する第2の抗体またはその断片。

30

## 【請求項 7】

TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を産生する、安定なハイブリドーマ。

40

## 【請求項 8】

T細胞が抗体もしくは抗体の組み合わせに特異的に結合しており、該抗体もしくは抗体の組み合わせが、TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか；あるいは該抗体が、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する、精製されたT細胞亜集団。

## 【請求項 9】

TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なく

50

とも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を作製する、以下の段階を含む方法：

(a) 環状ペプチドを担体に結合させる段階；

(b) 結合させたペプチドで哺乳類を免疫化する段階；および

(c) TCRのCDR3ループまたは - 接合に優先的に結合するか；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を、単離する段階。

【請求項10】

TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか、あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団を優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を作製する、以下の段階を含む方法：

(a) インバリアントT細胞で、CD1またはインバリアントT細胞欠損哺乳類を免疫化する段階；および

(b) TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を、単離する段階。

【請求項11】

哺乳類がCD1dノックアウトマウス、NK T細胞に寛容な哺乳類、CD1d反応性T細胞に寛容な哺乳類、J Q<sup>+</sup> T細胞に寛容な哺乳類、インバリアントT細胞に寛容な哺乳類、インバリアントT細胞が除去されている哺乳類、TCR鎖の一部を欠く哺乳類、またはTCRの鎖の一部を欠く哺乳類である、請求項9または10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

試料中のNK TCRの量またはNK T細胞の量を測定する方法であって、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する抗体を試料に接触させる段階を含む方法。

【請求項13】

試料中のCD1d反応性TCRの量またはCD1d反応性T細胞の量を測定する方法であって、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する抗体を、試料に接触させる段階を含む方法。

【請求項14】

試料中のJ Q<sup>+</sup> TCRの量またはJ Q<sup>+</sup> T細胞の量を測定する方法であって、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせを、試料に接触させる段階を含む方法。

【請求項15】

試料中のNK TCRまたはNK T細胞を視覚化する方法であって、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する抗体を試料に接触させる段階を含む方法。

【請求項16】

試料中のCD1d反応性TCRまたはCD1d反応性T細胞を視覚化する方法であって、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する抗体を、試料に接触させる段階を含む方法。

【請求項17】

試料中J Q<sup>+</sup> TCRまたはJ Q<sup>+</sup> T細胞を視覚化する方法であって、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせを、試料に接触させる段階を含む方法。

【請求項18】

10

20

30

40

50

自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、および癌からなる群より選択される症状の被験者、または症状に対する危険性の高い被験者を診断する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合する、抗体もしくは抗体の組み合わせ；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を、被験者に由来する試料に接触させる段階；

(b) TCRまたはT細胞に結合している、抗体または抗体の組み合わせの量を定量し、試料中の関心対象のT細胞量を決定する段階；および 10

(c) 試料中の関心対象のT細胞量を、症状を有すると診断された被験者、または症状がないと診断された被験者にみられる、関心対象のT細胞量と比較する段階。

【請求項19】

試料中の別のT細胞種の量を、症状を有すると診断された被験者、または症状がないと診断された被験者にみられる別のT細胞種の量と比較する段階をさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項20】

哺乳類の自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、もしくは癌を治療または予防する方法であって、TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合するか、あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体もしくは抗体の組み合わせを、該哺乳類に投与する段階を含む方法。 20

【請求項21】

TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、もしくは - 接合に優先的に結合するか；またはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団の増殖を抑制する抗体もしくは抗体の組み合わせを哺乳類に投与する段階を含み、該投与はTCR、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞を発現するT細胞を抑制するのに十分である、哺乳類のT細胞の病因を抑制する方法。 30

【請求項22】

抗体が毒素または放射標識に共有結合で連結されている、請求項21記載の方法。

【請求項23】

T細胞亜集団のサイズを増大させる方法であって、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、J Q<sup>+</sup> T細胞、および抗体に優先的に結合しているTCRのCDR3ループもしくは - 接合を発現するT細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を、T細胞を含む試料に接触させる段階を含み、該接触はT細胞数の増加をもたらす条件下で起こる方法。 40

【請求項24】

接触によりT細胞数を増加させる条件下で、抗原および抗原提示細胞に試料を接触させる段階をさらに含む、請求項23記載の方法であって；ここで該抗原が - ガラクトシルセラミドでない方法。

【請求項25】

抗原が、感染性病原体に由来する脂質またはグリコシル - ホスファチジルイノシトール抗原、癌性細胞に由来する抗原、または自己脂質 ( s e l f - l i p i d ) である、請求項24記載の方法。

【請求項26】

接触によりT細胞数を増加させる条件下で、抗原および抗原提示細胞に試料を接触させる段階をさらに含む、請求項23記載の方法であって；ここで該抗原が - ガラクトシルセラミドである方法。

【請求項27】

以下の段階を含む、T細胞亜集団のサイズを増大させる方法：

(a) T細胞と抗体もしくは抗体の組み合わせとの複合体の形成が可能な条件下で、TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせ、あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体に、T細胞を含む試料を接触させる段階；

10

(b) 複合体を単離する段階；ならびに

(c) T細胞数を増加させる条件下で、複合体に含まれるT細胞または複合体から回収されたT細胞を、抗原および抗原提示細胞に接触させる段階であって、ここで該抗原が - ガラクトシルセラミドでない段階。

【請求項28】

抗原が、感染性病原体に由来する脂質またはグリコシル - ホスファチジルイノシトール抗原、癌性細胞に由来する抗原、または自己脂質である、請求項27記載の方法。

【請求項29】

以下の段階を含む、T細胞の亜集団のサイズを増大させる方法：

(a) T細胞と抗体もしくは抗体の組み合わせとの複合体の形成が可能な条件下で、TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせ、あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体に、T細胞を含む試料を接触させる段階；

20

(b) 複合体を単離する段階；ならびに

(c) 接触によりT細胞の数を増加させる条件下で、複合体に含まれるT細胞または複合体から回収されたT細胞を、抗原および抗原提示細胞に接触させる段階であって、ここで該抗原が - ガラクトシルセラミドである段階。

【請求項30】

1つまたは複数のサイトカインに、試料または複合体を接触させる段階をさらに含む、請求項27または29のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項31】

以下の段階を含む、哺乳類のT細胞亜集団のサイズを増大させる方法：

(a) 哺乳類に由来するT細胞を含む試料を得る段階；

(b) 接触によりT細胞数を増加させる条件下で、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、J Q<sup>+</sup> T細胞、および抗体もしくは抗体の組み合わせに優先的に結合している、TCRのCDR3ループもしくは - 接合を発現するT細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体もしくは抗体の組み合わせに、T細胞を接触させる段階；ならびに

40

(c) 接触させたT細胞を哺乳類に投与する段階。

【請求項32】

接触段階の前または接触段階の後に、T細胞を精製する段階をさらに含む、請求項31記載の方法。

【請求項33】

以下の段階を含む、哺乳類のT細胞亜集団のサイズを増大させる方法：

(a) 哺乳類に由来するT細胞を含む試料を得る段階；

(b) T細胞と抗体もしくは抗体の組み合わせとの複合体の形成が可能な条件下で、TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせ、あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群よ

50

り選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体に、T細胞を接触させる段階；

(c) 複合体を単離する段階；および

(d) 接触によりT細胞の数を増加させる条件下で、複合体中のT細胞または複合体から回収されたT細胞を、抗原および抗原提示細胞に接触させる段階であって、ここで該抗原が - ガラクトシルセラミドでない段階；ならびに

(e) 接触させたT細胞を哺乳類に投与する段階。

【請求項34】

抗原が、感染性病原体に由来する脂質またはグリコシル - ホスファチジルイノシトール抗原、癌性細胞に由来する抗原、または自己脂質である、請求項33記載の方法。

10

【請求項35】

以下の段階を含む、哺乳類のT細胞亜集団のサイズを増大させる方法：

(a) 哺乳類に由来するT細胞を含む試料を得る段階；

(b) T細胞と抗体もしくは抗体の組み合わせとの複合体の形成が可能な条件下で、TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせ、あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、および $J^+ Q^+$  T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体に、T細胞を接触させる段階；

(c) 複合体を単離する段階；および

(d) 接触によりT細胞数を増加させる条件下で、複合体中のT細胞または複合体から回収されたT細胞を、抗原および抗原提示細胞に接触させる段階であって、ここで該抗原が - ガラクトシルセラミドである段階；ならびに

20

(e) 接触させたT細胞を哺乳類に投与する段階。

【請求項36】

1つまたは複数のサイトカインを哺乳類に投与する段階をさらに含む、請求項33または35のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

1つまたは複数のサイトカインに試料またはT細胞を接触させる段階であって、接触させたT細胞によりTh1/Th2/免疫偏向反応の比を変化させる段階をさらに含む、請求項33または35のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項38】

哺乳類の自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、または癌の治療または予防に用いられる、請求項33または35のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

試料に由来するT細胞亜集団を精製する方法であって、TCRのCDR3ループもしくは - 接合に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせ、あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、および $J^+ Q^+$  T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、または該T細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体に、試料を接触させる段階を含む方法。

40

【請求項40】

抗V<sub>24</sub>抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD56抗体、抗CD161抗体、または抗V<sub>11</sub>抗体に試料を接触させる段階をさらに含む、請求項39記載の方法。

【請求項41】

抗体に蛍光標識が共有結合で連結されていて、複合体が該複合体の蛍光シグナルを基に単離される、請求項39記載の方法。

【請求項42】

抗体に磁気標識が共有結合で連結されていて、複合体が該複合体の磁性を基に単離される、請求項39記載の方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

連邦政府資金による研究に関する記述

本発明は、国立衛生研究所の助成金番号A I 4 2 9 5 5による資金提供を受けた。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

## 【0002】

発明の背景

免疫系を調節することは、自己免疫疾患、感染症、アレルギー、喘息、炎症性症状、自然流産、妊娠、移植片対宿主病、および癌を含むがこれらに限定されないさまざまな疾患および障害の治療に望ましい。

10

## 【0003】

T細胞は、感染細胞または癌性細胞の認識および破壊といった複数の細胞性免疫反応に関与するリンパ球である。サブレッサーT細胞、細胞傷害性T細胞、およびヘルパーT細胞などのT細胞サブセットは、異なる免疫機能に関与する。サブレッサーT細胞は、感染解消後に免疫応答をオフとする際にはたらく。細胞傷害性T細胞、または「ナチュラルキラー」T細胞は、感染細胞または癌性細胞を破壊する。ヘルパーT細胞は、細胞傷害性T細胞、および/または抗体産生B細胞の活性を調節するサイトカインを産生する。

## 【0004】

ヘルパーT細胞の一つのサブセットであるTh1細胞は、細胞傷害性T細胞活性などの細胞性反応を促進し、また可溶性抗体が関与するTh2ヘルパーT細胞活性および液性免疫の両方を抑制するインターロイキン-1(IL-1)、IL-2、ガンマインターフェロン(IFN- $\gamma$ )、およびIL-2を分泌する。抗原提示細胞を死滅させる能力、およびサイトカインが関与するエフェクター活性をもつTh1細胞は激しい遅延型過敏反応に関連している。ヘルパーT細胞の別のサブセットであるTh2細胞は、細胞性反応を抑制して液性反応を促進すると考えられている。Th2細胞は、B細胞の発生および抗体産生を活性化するIL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、およびIL-13を分泌する。T細胞は、TGF- $\beta$ またはIL-10サイトカインの分泌がかかわる可能性がある持続的な免疫応答の抑制などの免疫偏向反応に関与する場合もある(Sonodaら、J. Ex. Med. 190:1215~1255、1999; Streileinら、Hum. Immunol. 52:138~143、1997; Hongら、J. Ex. Med. 190、1197~1200、1999; Streileinら、J. Immunol. 158:3557~3560、1997)。

20

30

## 【0005】

抗原提示細胞に結合した特定の抗原を認識するために、大半のT細胞は、高度に特異的なT細胞受容体(TCR)を細胞表面に発現している。大半の一般的なT細胞受容体の鎖は $\alpha$ および $\beta$ と呼ばれる。少数のT細胞亜集団に見出される第2のT細胞受容体は $\gamma$ 鎖および $\delta$ 鎖からなる。T細胞受容体の $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖、および $\delta$ 鎖の遺伝子群の構成は抗体遺伝子の構成に似ている。つまりV領域、D領域、およびJ領域のライブラリーが存在し、各ライブラリーの個々の領域が連結されて遺伝子全体を形成する。

## 【0006】

TCR- $\alpha$ 鎖のさまざまな配列をもつ大半のT細胞亜集団とは対照的に、インバリアントT細胞は、ヒトのV $\alpha$ 11またはマウスのV $\alpha$ 8と優先的に対をなす、高度に保存されたインバリアントなTCR- $\alpha$ 鎖、V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Qをヒトで、またV $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281をマウスで有する。この細胞はCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>またはCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>である。インバリアントTCRの存在によって、インバリアントT細胞は、CD1ファミリーに属すると呼ばれる非多型性MHCクラスI様タンパク質によって提示された、内因性または病原体に由来する脂質抗原を認識できると考えられている。ヒトには4つのCD1タンパク質(CD1a、CD1b、CD1c、およびCD1d)があるが、マウスにはヒトCD1dに対する相同性が高い一つの重複したCD1d遺伝子しかない。ヒトのCD1dは胸腺細胞で高レベルで発現しており、B細胞および単球で低レベルで発現しており、またリンパ系

40

50

および骨髄系外の一部の細胞でも発現している。

【0007】

多くのインバリアントT細胞は、通常は大半がヒトのCD161 (NKRP1A)、およびマウスの細胞表面C型レクチン、NKRP1C (NK1)を含むナチュラルキラー(NK)細胞にみられる数種の細胞表面タンパク質の発現によって区別される。本明細書では「インバリアントNK T細胞」と呼ぶ上記T細胞亜集団は、胸腺における成熟T細胞の大部分、マウスの肝臓における主要T細胞亜集団を、また一部のマウス系列の脾臓T細胞の最大5%を占める。

【0008】

マウスおよびヒトのインバリアントT細胞は、大量の免疫調節性サイトカインIL-4 (Th2エフェクター)およびIFN- (Th1エフェクター)を、抗CD3抗体またはCD1dに反応してインビボで産生する。これらのサイトカインにより、細胞はTh2応答およびTh1応答の両方に関与することができる。インバリアントT細胞が、一部の自己免疫疾患で防御的にはたらくと考えられるTh2応答の増強に果たす役割は、1型糖尿病を含むヒトおよびマウスの自己免疫疾患モデルにおける数にみられるインバリアントT細胞の存在の欠損によってさらに支持されている。したがって、インバリアントT細胞の誘導によってTh1応答とTh2応答のバランスが変わることは、自己免疫疾患の発症に影響する可能性がある。

【0009】

インバリアントT細胞は、速やかなTh1免疫応答および抗腫瘍反応も促進することができる。マウスの肝臓におけるT細胞の大部分を占めるインバリアントT細胞はIL-12によって刺激されて、活性のある細胞傷害性T細胞となって、腫瘍モデルにおける肝転移に防御的に作用する場合がある。このような結論は、「インバリアントV14-J281TCRを発現しない」J281ノックアウトマウスの作製によって遺伝的に確認されている。このノックアウトマウスでは、インバリアントT細胞の数が著しく減少しており、IL-12による腫瘍拒絶に関与不能であった。また他の研究では、IL-12の投与が、インバリアントT細胞を欠くCD1dノックアウトマウスの脾臓および肝臓における初期IFN- 応答を誘導しなかったことが報告されている。またヒト患者で得られたデータから、進行癌患者ではインバリアントNK T細胞がほとんど存在せず、Th1様の応答が低下することが判明している。活性化されたインバリアントT細胞の抗腫瘍反応には、CD1dに特異的な細胞傷害性およびNK/LAK細胞様毒性が部分的に関与すると考えられる。サイトカイン産生、または抗原提示細胞(APC)との相互作用を介すると考えられるインバリアントT細胞の他の調節性機能も、抗腫瘍性の免疫応答に重要な役割を担っている可能性がある。

【0010】

インバリアントT細胞は自然流産の原因にも影響する可能性がある。インバリアントT細胞に対するリガンドを投与してマウスの脱落膜のインバリアントT細胞を刺激すると妊娠マウスの流産が誘導された。このような流産の誘導には、インバリアントT細胞によるパーフォリン依存性の死滅およびIFN- および腫瘍壊死因子- の産生が必要であった。

【0011】

インバリアントT細胞が主要なCD1d反応性亜集団であるヒト末梢血とは対照的に、ヒトおよびマウスの骨髄、ならびにヒトの肝臓には大量のIL-4およびIFN- も産生する、さまざまなTCRを用いるCD1d反応性の非インバリアントT細胞が大部分を占めるT細胞集団が存在する。このようなCD1d反応性の非インバリアントT細胞はNK T細胞または非NK T細胞であり、これらはCD1d反応性のインバリアントT細胞と同様に機能する。骨髄におけるCD1d反応性の非インバリアントT細胞は移植片対宿主病の抑制に影響すると考えられており、また両集団は移植片対白血病反応を促進すると考えられている。肝臓で上記T細胞はC型肝炎感染などの感染症に対して防御的にはたらく可能性があるが、そのTh1応答による損傷を引き起す可能性もある。また本発明者らは

10

20

30

40

50

、CD1d反応性NK T細胞が、免疫的に隔絶された部位の一つである前眼房における抗原に対する免疫寛容に極めて重要なことを見出した(Sonodaら、前掲)。このような機構は、末梢性免疫寛容の維持にも重要であると考えられる。

#### 【0012】

プラスモジウム(Plasmodium)、トリパノソーマ(Trypanosoma)、またはリーシュマニア(Leishmania)などの寄生虫に由来するグリコシル-ホスファチジルイノシトールは、マウスのCD1d反応性インバリアントV14 NK T細胞を刺激することが最近報告された。また抗腫瘍活性のスクリーニングの過程で海綿から単離された $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GalCer)脂質はCD1d提示抗原の1つである。 $\alpha$ -GalCerは、抗V24抗体を用いた精製によってT細胞用が最初に濃縮される臍帯試料または末梢血試料に由来するヒトのCD1d反応性インバリアントT細胞の増殖させるために使用可能な薬剤の一例である。濃縮後のV24<sup>+</sup>細胞を、 $\alpha$ -GalCerおよび精製抗原提示細胞(APC)の存在下で共に培養する。しかし臨床状況によっては、2段階の複雑なプロトコル、または条件によっては適切に作用しない可能性のある抗原提示細胞の使用を必要としないインバリアントT細胞を増殖させる改善された方法を用いることが望ましいと考えられる。

10

#### 【0013】

自己免疫疾患、感染症、アレルギー、喘息、炎症性症状、自然流産、妊娠、移植片対宿主病、および癌などの疾患および障害を予防および治療するために、哺乳類を対象にT細胞の集団、より具体的にはT細胞の特定の亜集団を優先的にモニタリングして変化させることが求められている。

20

#### 【0014】

##### 発明の概要

本発明者らは、特定のT細胞サブグループの選択的な同定および増殖、または活性化を可能とする抗体を作製する方法を発見して実用化した。特に本発明は、特定のTCR配列を有するT細胞を認識して増殖させる抗体を特徴とする。このような抗体は、癌および自己免疫疾患を含むさまざまな疾患の診断、予防、安定化、および治療に使用することができる。

#### 【0015】

したがって一つの局面では、本発明は、T細胞抗原受容体(TCR)に優先的に結合する精製抗体を特徴とする。このような抗体は、TCRのCDR3ループまたは $\alpha$ -接合に優先的に結合するか、またはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ<sup>+</sup>Q<sup>+</sup>T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、またはその増殖もしくは活性化を調節する(例えば上昇もしくは低下させる)。関連する局面では、本発明は、ともに優先的にT細胞抗原受容体(TCR)に結合する精製抗体の組み合わせ(例えば2つ、3つ、4つ、または5つの抗体の混合物)を特徴とする。組み合わせることで、これらの抗体はTCRのCDR3ループまたは $\alpha$ -接合に優先的に結合するか、またはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ<sup>+</sup>Q<sup>+</sup>T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団の増殖または活性化を優先的に調節する。抗体の望ましい組み合わせでは以下の1組の抗体を混合する：(i)抗V24抗体と抗CD161抗体；(ii)抗V24抗体と抗CD94抗体；(iii)抗V11抗体と抗CD161抗体；または(iv)抗V11抗体と抗CD94抗体。望ましくは、これらの抗体の組み合わせは、CD1d反応性T細胞に優先的に結合するか、または優先的にその増殖もしくは活性化を調節する。

30

40

#### 【0016】

望ましい態様では、抗体または抗体の組み合わせは、インバリアントT細胞に優先的に結合する。別の望ましい態様では、抗体または抗体の組み合わせと結合しているNK T細胞は、CD1d反応性T細胞、インバリアントT細胞、CD1d反応性非インバリアントT細胞、またはJ<sup>+</sup>Q<sup>+</sup>T細胞である。さらに別の望ましい態様では、抗体または抗体の組み合わせは、TCRの抗原結合部位に優先的に結合する。望ましくは、NK T細胞

50

、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup>T細胞はインバリアントT細胞である。望ましくは、TCRのCDR3ループ、 $\alpha$ - $\beta$ 接合、または抗原結合部位は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup>T細胞上で発現されている。さらに別の望ましい態様では、抗体もしくは抗体の組み合わせは、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup>T細胞上に発現されたTCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または $\alpha$ - $\beta$ 接合に優先的に結合し、また抗体もしくは抗体の組み合わせは、結合しているT細胞の増殖もしくは活性化を優先的に調節する。望ましくは、抗体または抗体の組み合わせに結合するTCRを発現するT細胞は、抗体の存在下で増殖される。別の望ましい態様では、T細胞上に発現されたTCRのCDR3ループ、 $\alpha$ - $\beta$ 接合、または抗原結合部位の結合は、T細胞、CDR3ループ、 $\alpha$ - $\beta$ 接合、もしくは抗原結合部位を定量するのに十分な量である。望ましい態様では、二次抗体を用いて、本発明の抗体と結合する異なるT細胞亜集団を区別する。一つの態様では、このような抗体は二機能性の抗体である。一つの態様では、このような抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。望ましい態様では、このような抗体は毒素、治療的に活性のある化合物、酵素、サイトカイン、放射標識、蛍光標識、磁気標識、または親和性タグに共有結合している。望ましい抗体には、マウス以外の哺乳類（ヒトなど）にみられる定常領域がある。望ましくは、このような抗体はヒト化されている。

10

## 【0017】

関連する局面では、本発明は、TCRのCDR3ループもしくは $\alpha$ - $\beta$ 接合に優先的に結合するか、あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup>T細胞からなる群より選択される、少なくとも一つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、もしくはその増殖もしくは活性化を調節する抗体の断片または誘導体を提供する。望ましい断片には、ScFv、Fab、およびF(ab')<sub>2</sub>断片などがある。

20

## 【0018】

別の局面では、本発明は、(a)本発明の抗体もしくは同抗体の断片、および(b)TCRを発現するT細胞に結合する二次抗体もしくは抗体断片、または本発明の抗体または断片に結合するNK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ Q<sup>+</sup>T細胞に結合する二次抗体もしくは抗体断片を含む、二機能性の抗体を提供する。望ましくは、このような二次抗体も本発明の抗体である。別の態様では、このような二次抗体は、抗CD3抗体、抗CD161抗体、抗CD28抗体、または抗CD94抗体である。関連する局面では、本発明はTCRのCDR3ループ、もしくは $\alpha$ - $\beta$ 接合に優先的に結合する二機能性抗体、またはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup>T細胞からなる群より選択される、少なくとも一つのT細胞亜集団に優先的に結合するか、またはその増殖もしくは活性化を調節する二機能性抗体を特徴とする。上記局面のさまざまな態様において、このような抗体は、二機能性の抗CD3抗体および抗CD161抗体、抗V $\alpha$ 24抗体および抗CD161抗体；抗V $\alpha$ 24抗体および抗CD94抗体；抗V $\alpha$ 11抗体および抗CD161抗体；抗V $\alpha$ 11抗体および抗CD94抗体；抗CD3抗体および抗CD94抗体、抗CD3抗体および抗CD28抗体；または抗V $\alpha$ 24抗体および抗V $\alpha$ 11抗体である。特定の態様では、二機能性抗体はCD1d反応性T細胞を優先的に結合するか、該細胞を増殖させるか、または活性化する。

30

40

## 【0019】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体を産生する安定なハイブリドーマを提供する。

## 【0020】

本発明の抗体は、T細胞亜集団の精製に使用することもできる。したがって本発明は、精製されたT細胞亜集団も特徴とする。亜集団に含まれるT細胞は、本発明の抗体または抗体の組み合わせに特異的に結合する。望ましくは、このような抗体または抗体の組み合わせは、T細胞亜集団上に発現したTCRのCDR3ループ、 $\alpha$ - $\beta$ 接合、または抗原結合部位に特異的に結合する。望ましい態様では、亜集団に含まれるT細胞はNK T細胞である。望ましいNK T細胞にはCD1d反応性T細胞、インバリアントT細胞、CD1

50

d 反応性非インバリアント T 細胞、および  $J Q^+$  T 細胞などがある。別の望ましい態様では、このような T 細胞は CD 1 d 反応性 T 細胞である。さらに別の望ましい態様では、このような T 細胞は  $J Q^+$  T 細胞である。望ましくは、NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、または  $J Q^+$  T 細胞はインバリアント T 細胞である。

【0021】

本発明はまた、TCR の CDR 3 ループもしくは  $-$  接合に優先的に結合する本発明の抗体、または NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、および  $J Q^+$  T 細胞からなる群より選択される、少なくとも 1 つの T 細胞亜集団に優先的に結合するか、または該 T 細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する、本発明の抗体を作製する方法も提供する。このような方法の一つには、(a) 環状ペプチドと担体を結合する段階、(b) 結合しているペ  
10  
プチドで動物を免疫化する段階、および (c) TCR の CDR 3 ループもしくは  $-$  接合に優先的に結合する抗体、あるいは NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、および  $J Q^+$  T 細胞からなる群より選択される、少なくとも 1 つの T 細胞亜集団に優先的に結合するか、または該 T 細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を単離する段階が含まれる。望ましくは、段階 (b) は繰り返し行う。別の望ましい態様では、動物は CD 1 またはインバリアント T 細胞を欠く哺乳類もしくは鳥類である。

【0022】

関連する局面では、本発明は、本発明の抗体を作製する別の方法を提供する。この方法は、(a) 動物 (例えば哺乳類もしくは鳥類) を NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、ま  
20  
たは  $J Q^+$  T 細胞で免疫化する段階、および (b) TCR の CDR 3 ループもしくは  $-$  接合に優先的に結合する抗体、または NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、および  $J Q^+$  T 細胞からなる群より選択される、少なくとも 1 つの T 細胞亜集団に優先的に結合するか、または該 T 細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を単離する段階が含まれる。望ましくは段階 (a) は繰り返し行う。一つの望ましい態様では、インバリアント T 細胞は、CD 1 またはインバリアント T 細胞を欠く動物に投与される。

【0023】

別の関連する局面では、本発明は、本発明の抗体を作製する方法を特徴とする。この方法は、(a) 環状ペプチドと担体を結合する段階、(b) 結合しているペプチドで動物 (例  
30  
例えば哺乳類もしくは鳥類) を免疫化する段階、(c) NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、もしくは  $J Q^+$  T 細胞で動物を免疫化する段階、および (d) TCR の CDR 3 ループもしくは  $-$  接合に優先的に結合する抗体、または NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、および  $J Q^+$  T 細胞からなる群より選択される、少なくとも 1 つの T 細胞亜集団に優先的に結合するか、または該 T 細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を単離する段階を含む。望ましくは段階 (b) または (c) は繰り返し行う。一つの望ましい態様では、インバリアント T 細胞は、CD 1 またはインバリアント T 細胞を欠く動物に投与される。

【0024】

さらに別の関連する局面では、本発明は、(a) NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、  
40  
または  $J Q^+$  T 細胞で動物 (例えば哺乳類もしくは鳥類) を免疫化する段階、(b) 環状ペプチドと担体を結合する段階、および (c) 結合させたペプチドで動物を免疫化する段階、ならびに (d) TCR の CDR 3 ループもしくは  $-$  接合に優先的に結合する抗体、または NK T 細胞、CD 1 d 反応性 T 細胞、および  $J Q^+$  T 細胞からなる群より選択される、少なくとも 1 つの T 細胞亜集団に優先的に結合するか、または該 T 細胞亜集団の増殖もしくは活性化を調節する抗体を単離する段階による、本発明の抗体を作製する方法を提供する。望ましくは段階 (a) または段階 (c) は繰り返し行う。一つの望ましい態様では、インバリアント T 細胞は、CD 1 またはインバリアント T 細胞を欠く動物に投与される。

【0025】

抗体を作製する方法の望ましい態様では、動物 (例えば哺乳類もしくは鳥類) は、CD 1  
50  
またはインバリアント T 細胞を欠く動物、CD 1 d ノックアウトマウス、インバリアント

T細胞が除去された動物、TCR-鎖の一部を欠く動物、またはTCR-鎖の一部を欠く動物である。他の望ましい態様では、このような動物は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、JQ<sup>+</sup>T細胞、インバリアントT細胞、またはインバリアントTCRに寛容である。別の望ましい態様では、このような動物は、V14分子またはJ281分子の全体または一部を欠く。NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJQ<sup>+</sup>T細胞の量が低下したり、または欠いている別の動物が使用されることも意図される。

【0026】

本発明の抗体、二機能性抗体、抗体の断片、および抗体の誘導体は、診断、画像化、および治療上のさまざまな応用性を有する。

【0027】

このような一つの局面では、本発明はNK TCRの量、または試料に含まれるNK T細胞の量を、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせを試料に接触させることで測定する方法を提供する。望ましくは抗体もしくは抗体の組み合わせは、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または-接合に優先的に結合する。別の態様では、このような抗体は、同じT細胞上に発現したCD3およびCD161の両方に結合する二機能性抗体である。

【0028】

関連する局面では、本発明は、CD1d反応性TCRの量、または試料に含まれるCD1d反応性T細胞の量を測定する方法を特徴とする。この方法には、本発明の抗体または抗体の組み合わせを試料に接触させる段階が含まれる。望ましくは抗体または抗体の組み合わせは、TCRのCDR3ループ、-接合、または抗原結合部位に優先的に結合する。さまざまな態様では、このような抗体は二機能性の抗V24抗体および抗CD161抗体；抗V24抗体および抗CD94抗体；抗V11抗体および抗CD161抗体；抗V11抗体および抗CD94抗体；抗CD3抗体および抗CD94抗体、抗CD3抗体および抗CD28抗体；または抗V24抗体および抗V11抗体である。

【0029】

別の関連する局面では、本発明は、本発明の抗体または抗体の組み合わせを試料に接触させることで、JQ<sup>+</sup>TCRの量、または試料に含まれるJQ<sup>+</sup>T細胞の量を測定する方法を特徴とする。一つの望ましい態様では、このような抗体はTCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または-接合に優先的に結合する。

【0030】

試料に含まれるNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJQ<sup>+</sup>T細胞の量を測定する望ましい方法では、試料は、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、および癌からなる群より選択される症状に対する治療法を検討する臨床試験に参加していたり、治療を受けている被験者に由来する。望ましくはTCRまたはT細胞の量を基に、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、および癌からなる群より選択される症状の、治療または予防に対する望ましい治療法が決定される。以上の局面の別の望ましい態様では、TCRまたはT細胞の量を基に、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、妊娠、および癌からなる群より選択される症状からの回復または寛解、または同症状に対する任意の治療法の有効性の判断を行う。

【0031】

別の局面では、本発明は、本発明の抗体または抗体の組み合わせを試料に接触させる段階を含む、試料に含まれるNK TCRまたはNK T細胞を視覚化する方法を提供する。望ましくは、このような抗体または抗体の組み合わせは、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または-接合に優先的に結合する。別の態様では、このような抗体は、同じT細胞上に発現するCD3およびCD161の両方に結合する二機能性抗体である。

10

20

30

40

50

## 【0032】

関連する局面では、本発明は、本発明の抗体または抗体の組み合わせを試料に接触させることで、試料に含まれるCD1d反応性TCRまたはCD1d反応性T細胞を視覚化する方法を特徴とする。一つの望ましい態様では、このような抗体または抗体の組み合わせは、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する。望ましくは、このような抗体または抗体の組み合わせは、TCRのCDR3ループ、 - 接合、または抗原結合部位に優先的に結合する。さまざまな態様において、このような抗体は二機能性の抗V<sub>24</sub>抗体および抗CD161抗体；抗V<sub>24</sub>抗体および抗CD94抗体；抗V<sub>11</sub>抗体および抗CD161抗体；抗V<sub>11</sub>抗体および抗CD94抗体；抗CD3抗体および抗CD94抗体、抗CD3抗体および抗CD28；または抗V<sub>24</sub>抗体および抗V<sub>11</sub>抗体である。 10

## 【0033】

別の関連する局面では、本発明は、試料に含まれるJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>TCRまたはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞を視覚化する方法を提供する。このような方法は、本発明の抗体または抗体の組み合わせを試料に接触させる段階を含む。望ましくは、このような抗体または抗体の組み合わせは、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する。

## 【0034】

試料に含まれるNK細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞を測定または視覚化する望ましい態様では、試料はトランスジェニック動物に由来するか、または剖検組織である。望ましくは、このような抗体は、蛍光標識、放射標識、または磁気標識（例えば磁気ビーズ）と共有結合している。 20

## 【0035】

別の局面では、本発明は、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、および癌からなる群より選択される症状に関して、危険性のある被験者を同定する方法を提供する。この方法は、(a)被験者に由来する試料に含まれるT細胞亜集団の量を定量する段階、および(b)試料に含まれるT細胞の量を、その症状であると診断された被験者、またはその症状でないと診断された被験者におけるT細胞の量と比較する段階を含む。望ましくは試料に含まれるT細胞の量は、その症状であると診断された被験者、およびその症状でないと診断された被験者の両方におけるT細胞の量と比較される。一つの望ましい態様では、この方法は、試料に含まれる別のT細胞種の量を、対象症状であると診断された被験者、または対象症状でないと診断された被験者における別のT細胞種の量と比較する段階をさらに含む。望ましくは試料に含まれる別のT細胞種の量は、対象症状であると診断された被験者、および対象症状でないと診断された被験者の両方にみられる別のT細胞種の量と比較される。さまざまな態様では、試料に含まれるT細胞亜集団の量は、T細胞のCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせ、またはNK細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞に優先的に結合する抗体もしくは抗体の組み合わせなどの、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせを試料に接触させることで決定される。 30

## 【0036】

関連する局面では、本発明は、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、および癌からなる群より選択される、症状を有する被験者を診断する方法または病期を決定する(staging)方法を提供する。この方法は、(a)被験者に由来する試料に含まれるT細胞亜集団の量を定量する段階、および(b)試料に含まれるT細胞の量を、症状を有すると診断された被験者、または症状がないと診断された被験者におけるT細胞の量と比較する段階を含む。望ましくは試料に含まれるT細胞の量は、対象症状であると診断された被験者、および対象症状でないと診断された被験者の両方におけるT細胞の量と比較される。一つの望ましい態様では、この方法は、試料に含まれる別のT細胞種の量を、対象症状であると診断された被験者、または対象症状でないと 40 50

診断された被験者における他のT細胞種の量と比較する段階をさらに含む。望ましくは試料に含まれる別のT細胞種の量は、対象症状であると診断された被験者、および対象症状でないと診断された被験者の両方にみられる別のT細胞種の量と比較される。さまざまな態様では、試料に含まれるT細胞亜集団の量は、T細胞のCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合するか；あるいはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞に優先的に結合する、抗体もしくは抗体の組み合わせなどの、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせを試料に接触させることで決定される。

**【0037】**

上記の任意の局面の望ましい態様では、対象試料は末梢血、リンパ液、腹水、臍帯血、尿、便、骨髄、胆汁、または生検試料である。他の血液試料または組織試料などの、哺乳類に由来する他の任意の試料が使用されうることも意図される。

10

**【0038】**

別の局面では、本発明は、動物の自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、または癌を治療または予防する方法を特徴とする。この方法は、本発明の抗体または抗体の組み合わせを動物に投与する段階を含む。望ましくは、このような抗体もしくは抗体の組み合わせは、動物の動脈内、病巣内、経口、筋肉内、静脈内、皮下、または腹腔内に投与される。別の望ましい態様では、このような抗体または抗体の組み合わせは、薬学的に適切な担体とともに投与される。一つの望ましい態様では、サイトカインも動物に投与される。別の望ましい態様では、このような抗体と協調して作用する細胞種または他の薬剤も動物に投与される。

20

**【0039】**

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体または抗体の組み合わせを動物に投与することで、動物におけるT細胞の病因を抑制する方法を提供する。このような抗体または抗体の組み合わせの投与は、抗体もしくは抗体の組み合わせが結合するTCRを発現するT細胞、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞を十分抑制する。望ましくは、このような抗体もしくは抗体の組み合わせは、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ Q<sup>+</sup> T細胞のTCRのCDR3ループ、抗原結合部位、もしくは - 接合に優先的に結合する。別の望ましい態様では、このような抗体もしくは抗体の組み合わせは、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団の増殖または活性化を抑制する。別の望ましい態様では、このような抗体もしくは抗体の組み合わせは、毒素、放射標識、または細胞に対する宿主の防御過程もしくは異化過程を標的とする分子に共有結合する。望ましくは、このような抗体もしくは抗体の組み合わせは、経口、筋肉内、静脈内、動脈内、病巣内、皮下、腹腔内、またはT細胞を抑制するのに適切な用量を提供する他の任意の経路により、動物に投与される。別の望ましい態様では、このような抗体または抗体の組み合わせは薬学的に適切な担体とともに投与される。一つの望ましい態様では、1つまたは複数のサイトカインも動物に投与される。別の態様では、T細胞の病因は、肝炎感染、ピコルナウイルス感染、ポリオ感染、またはコクサッキー感染などの、ウイルス感染に対するT細胞の反応である。

30

40

**【0040】**

別の局面では、本発明は、本発明の抗体または抗体の組み合わせを、T細胞を有する試料に接触させることで、T細胞亜集団のサイズを増大させる方法を提供する。

**【0041】**

関連する局面では、本発明は、T細胞亜集団のサイズを増大させる方法の特徴とする。この方法は、(a) T細胞と抗体または抗体の組み合わせとの複合体の形成が可能な条件下で、本発明の抗体または抗体の組み合わせにT細胞を含む試料を接触させる段階、(b) 複合体を単離する段階、および(c) 接触によりT細胞数を増やすことが可能な条件下で、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせに、複合体中のT細胞、もしくは複合体から回収されたT細胞を接触させる段階を含む。

50

## 【 0 0 4 2 】

別の局面では、本発明は、T細胞亜集団のサイズを増大させる方法を提供する。この方法は、(a) T細胞と抗体もしくは抗体の組み合わせとの複合体の形成が可能な条件下で、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせに、T細胞を含む試料を接触させる段階、(b) 複合体を単離する段階、ならびに(c) 接触によりT細胞数を増やすことが可能な条件下で、抗原および抗原提示細胞に、複合体中のT細胞もしくは複合体から回収されたT細胞を接触させる段階を含む。望ましくは、このような抗原は、感染性病原体に由来する - ガラクトシルセラミド、脂質、もしくはグリコシル - ホスファチジルイノシトール抗原、癌性細胞に由来する抗原、または内因性供給源もしくは非生理学的供給源に由来する、自己脂質もしくは他の任意の抗原である。

10

## 【 0 0 4 3 】

さらに別の局面では、本発明は、T細胞亜集団のサイズを増大させる方法を特徴とする。この方法は、(a) T細胞を含む試料に由来するT細胞を精製する段階、および(b) 接触によりT細胞数を増やすことが可能な条件下で、本発明の抗体または抗体の組み合わせに精製細胞を接触させる段階を含む。

## 【 0 0 4 4 】

T細胞亜集団のサイズを増大させる方法の望ましい態様では、上記の方法は、1つもしくは複数のサイトカイン、または抗体もしくは抗体の組み合わせと協調して作用する、他の細胞を試料または複合体に接触させる段階をさらに含む。

## 【 0 0 4 5 】

別の局面では、本発明は、動物のT細胞亜集団のサイズを増大させる方法を提供する。この方法は、(a) 動物のT細胞を含む試料を得る段階、(b) 接触によりT細胞数を増やすことが可能な条件下で、本発明の抗体または抗体の組み合わせにT細胞を接触させる段階、および(c) 接触させたT細胞を動物に投与する段階を含む。

20

## 【 0 0 4 6 】

関連する局面では、本発明は、動物のT細胞亜集団のサイズを増大させる方法を提供する。この発明は、(a) 動物由来のT細胞を含む試料を得る段階、(b) T細胞を精製する段階、(c) 接触によりT細胞数を増やすことが可能な条件下で、本発明の抗体または抗体の組み合わせにT細胞を接触させる段階、および(d) 接触させたT細胞を動物に投与する段階を含む。望ましくはT細胞の精製は、本発明の抗体または抗体の組み合わせに試料を接触させる段階を含む。望ましい態様では、T細胞の精製は、抗V<sub>24</sub>抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD56抗体、抗CD161抗体、または抗V<sub>11</sub>抗体に試料を接触させる段階を含む。T細胞に結合する別の抗体または抗体の組み合わせを用いても、細胞を精製しうることも意図される。

30

## 【 0 0 4 7 】

さらに別の局面では、本発明は、動物のT細胞亜集団サイズを増大させる方法を提供する。この方法は、(a) 動物のT細胞を含む試料を得る段階、(b) T細胞と抗体との複合体が形成可能な条件下で、本発明の抗体または抗体の組み合わせをT細胞に接触させる段階、(c) 複合体を単離する段階、および(d) 接触によりT細胞数を増やすことが可能な条件下で、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせを、複合体中のT細胞、もしくは複合体から回収されたT細胞に接触させる段階、ならびに(e) 接触させたT細胞を動物に投与する段階を含む。

40

## 【 0 0 4 8 】

さらに別の局面では、本発明は、動物のT細胞亜集団のサイズを増大させる方法を特徴とする。この方法は、(a) 動物からT細胞を含む試料を得る段階、(b) T細胞と抗体もしくは抗体の組み合わせとの複合体の形成が可能な条件下で、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせをT細胞に接触させる段階、(c) 複合体を単離する段階、および(d) 接触によりT細胞数を増やすことが可能な条件下で、複合体中のT細胞、または複合体から回収されたT細胞を、抗原および抗原提示細胞に接触させる段階、ならびに(e) 接触させたT細胞を動物に投与する段階を含む。望ましくは、このような抗原は、感染性病原体

50

に由来する - ガラクトシルセラミド、脂質、もしくはグリコシル - ホスファチジルイノシトール抗原、癌性細胞に由来する抗原、または内因性供給源もしくは非生理学的供給源に由来する自己脂質もしくは他の任意の抗原である。

【0049】

動物のT細胞亜集団のサイズを増大させる方法の望ましい態様では、この方法は、1つまたは複数のサイトカインを動物に投与する段階も含む。望ましくはサイトカインは、接触させたT細胞を動物に投与する前、投与中、または投与の後に動物に投与される。望ましい態様では、このようなサイトカインは、筋肉内、静脈内、動脈内、病巣内、皮下、またはT細胞の活性を調製するのに適切な用量を提供するのに十分な、他の任意の経路で投与される。望ましくは、1つまたは複数のサイトカインをこのような試料またはT細胞に接触させる。望ましくは以上の局面の方法は、動物の自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、または癌の治療または予防に用いられる。

【0050】

別の局面では、本発明は、本発明の抗体または抗体の組み合わせを試料に接触させることによって、T細胞亜集団を試料から精製する方法を提供する。

【0051】

関連する局面では、本発明は、試料からT細胞亜集団を精製する方法を提供する。この方法は、(a) T細胞と抗体との複合体の形成が可能な条件下で、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせを試料に接触させる段階、ならびに(b) 複合体を単離する段階を含む。望ましくは、このような試料は、抗V<sub>24</sub>抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD56抗体、抗CD161抗体、または抗V<sub>11</sub>抗体にも接触させる。別の態様では、このような試料は、関連したT細胞サブセットに結合する他の任意の抗体に接触させる。望ましくは、このような方法は、T細胞を複合体から回収する段階も含む。一つの望ましい態様では、このような抗体は蛍光標識に共有結合され、複合体は複合体の蛍光シグナルを基に単離される。別の望ましい態様では、このような抗体は磁気標識に共有結合され、複合体は複合体の磁性を基に単離される。

【0052】

本発明のあらゆる局面の望ましい態様では、試料、T細胞、もしくは複合体に接触させるサイトカイン、または動物に投与されるサイトカインは、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、およびGM-CSFからなる群より選択される。他の任意のサイトカインまたはサイトカインの組み合わせを使用しうることも意図される。望ましくは、このようなサイトカインは、接触させたT細胞によってTh1/Th2/免疫偏向反応の比を変化させる。望ましくは被験者または動物はヒトである。他の望ましい望ましい動物には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ニワトリ、およびシチメンチョウなどの、実験用または家畜用の哺乳類および鳥類などがある。望ましい態様では、本発明の方法に関連するウイルス感染は、肝炎感染、ピコルナウイルス感染、ポリオ感染、HIV感染、またはコクサッキー感染である。別の態様では、自己免疫疾患は1型糖尿病である。

【0053】

本発明の各方法の望ましい態様では、抗体または抗体の組み合わせはインバリアントT細胞に優先的に結合する。望ましくは、T細胞亜集団、T細胞、またはTCRを発現するT細胞は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞である。望ましいNK T細胞は、CD1d反応性T細胞、インバリアントT細胞、CD1d反応性非インバリアントT細胞、またはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞である。望ましいCD1d反応性T細胞またはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞は、インバリアントT細胞である。望ましいJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞は、V<sub>24</sub><sup>+</sup>J $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞である。望ましくは抗体もしくは抗体の組み合わせは、T細胞上に発現されたTCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または $\beta$ -接合に優先的に結合し、あるいは結合症状のT細胞に結合したり、またはその増殖もしくは活性化を優先的に

10

20

30

40

50

調節する。望ましくは、このような抗体もしくは抗体の組み合わせは、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より唯一選択される1つのT細胞亜集団のみに優先的に結合するか、またはその増殖もしくは活性化を調節する。望ましくは、本発明の抗体もしくは抗体の組み合わせに結合したTCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、J Q<sup>+</sup> T細胞、またはインバリアントT細胞で発現される。他の望ましい態様では、関心対象のT細胞亜集団（例えばNK T細胞、CD1d反応性T細胞、J Q<sup>+</sup> T細胞、またはインバリアントT細胞）に結合するか、またはその増殖または活性化を調節する抗体は、関心対象のT細胞亜集団のTCRの抗原結合部位に優先的に結合する。本発明の任意の局面に関連するインバリアントT細胞が、CD1d反応性ではない可能性があることも意図される。望ましい標識抗体には、ビオチン、FITC、PE、または磁気ビーズに結合する抗体などがある。

10

**【0054】**

本発明の各局面は、本発明の抗体、二機能性抗体、抗体の断片、および抗体の誘導体に等しく適用されると理解される。本発明の各局面は、TCRのCDR3ループまたは - 接合に優先的に結合する抗体の組み合わせにも等しく適用される。さまざまな態様では、本発明の抗体の組み合わせに含まれる抗体は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ Q<sup>+</sup> T細胞、またはNK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ Q<sup>+</sup> T細胞を含む試料に、同時にまたは連続的に接触させる。別の態様では、本発明の抗体の組み合わせに含まれる抗体は、疾患または症状を治療または予防するために、動物に同時にまたは連続的に投与される。

20

**【0055】**

本発明の各局面は、任意の抗原感作に応じて、動物（例えばヒト、他の哺乳類、および鳥類）で生じる、任意の抗原特異的な、オリゴクローナ的に（*oligoclonally*）増殖したT細胞亜集団にも適用される。このような抗原特異的なオリゴクローナ的に増殖したT細胞亜集団は、複数の個体に含まれる抗原の免疫優性な成分に反応して、オリゴクローナ的に増殖したT細胞を含む。

**【0056】**

関心対象のT細胞に対する抗原の提示が、抗原提示細胞（APC）を必要としないことも重要である。例えば可溶性または固定化された状態の抗原提示分子を用いて、APCの非存在下でT細胞の活性化または増殖が可能な条件下で、抗原をT細胞、または関心対象のT細胞を含む試料に提示することができる。

30

**【0057】**

「CDR3ループ」とは、TCR - 鎖のVセグメントとJセグメント間における再編成により、またはTCR - 鎖のVセグメント、Dセグメント、およびJセグメント間における再編成により生じる、接合のアミノ酸を意味する。CDR3ループの同定は、Vセグメントの末端に保存されたシステインを配置することで単純化することができる。このシステインに続く最初のアミノ酸が、CDR3ループの最初の残基である。

**【0058】**

CDR3ループの配列は、関心対象のTCRのアミノ酸配列と、他のTCRの一つまたは複数の配列との配列アライメントを基に、容易に同定することができる。例えば多くのT細胞受容体のアミノ酸配列のアライメントを含むカバト（Kabatt）表を用いることで、関心対象のTCR - 鎖またはTCR - 鎖に含まれるCDR3ループを同定することができる（JohnsonおよびWu、Nuc. Acid. Res. 29（1）：205～206、2001；<http://immuno.bme.nwu.edu>）。CDR3ループはまた、CDR3ループがX線結晶構造を基に同定された、1つまたは複数のTCRとの配列アライメントを基に同定することもできる（Reinherzら、Science 286（5446）：1913～1921、1999）。またCDR3ループは、関心対象のTCR鎖の3次元構造を決定することで同定することができる。

40

**【0059】**

50

「TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に優先的に結合する抗体」は、TCRのCDR3ループ、抗原結合部位、もしくは - 接合を認識して結合する抗体、またはT細胞上に発現されたTCRのCDR3ループ、抗原結合部位、もしくは - 接合を認識して結合し、T細胞上で発現されたTCRのCDR3ループ、抗原結合部位、もしくは - 接合を認識して結合するが、試料（例えば他のタンパク質もしくは細胞を天然の状態を含む生物試料）に含まれる他の分子を実質的に認識せず結合しない抗体を意味する。T細胞上に発現されたTCRのCDR3ループ、抗原結合部位、または - 接合に対する抗体の結合に関して、実施例1に記載されたELISAアッセイ法におけるシグナルは、T細胞ではない対照細胞、またはアミノ酸配列の同一性が、抗体に優先的に結合するCDR3ループ、 - 接合、または抗原結合部位の対応配列に対して、99%、95%、90%、85%、80%、70%、60%、50%、40%、または20%未満のCDR3ループ、 - 接合、および抗原結合部位をもつTCRを発現するT細胞に対する結合に比べて、望ましくは少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍、または500倍大きい。ヒト化された抗体、または他の種の状態となった抗体は、標準的な手法で作製することができる。

#### 【0060】

望ましくは、抗体は「精製される」。これは抗体が、天然の状態と共存する他の成分から分離されることを意味する。典型的には、抗体は、天然の状態と共存するタンパク質、抗体、および天然有機分子を重量換算で少なくとも50%含まない場合に実質的に純粋である。望ましくは抗体は少なくとも75%、より望ましくは少なくとも90%、また最も望ましくは少なくとも99%が、重量換算で純粋である。TCRのCDR3ループ、 - 接合、もしくは抗原結合部位に優先的に結合する実質的に純粋な抗体は、例えば抗体を産生するように哺乳類を免疫化する本発明の方法により、抗体を分泌するハイブリドーマを構築することにより、抗体を化学的に合成することにより、または抗体を天然供給源から分離することによって得られる。純度は、抗体の単離に関して後述する、任意の適切な方法で調べることができる。

#### 【0061】

「TCRの - 接合」とは、TCRの鎖と鎖の境界を意味する。この境界は、鎖と鎖の可変ドメイン間の非共有結合性の相互作用を含む。望ましくは - 接合の3次元構造、もしくは - 接合の3次元構造のモデルを用いて、哺乳類を免疫化してTCRの - 接合に対する抗体を産生させるためのポリペプチドもしくは小分子を設計する。TCRの鎖と鎖間の境界の複数の3次元構造が既に報告されており、当業者はこれを基に、NK細胞、CD1d反応性細胞、J<sub>Q</sub><sup>+</sup>細胞、またはインバリアントT細胞によって発現された、TCRの鎖と鎖の境界をモデル化することができる。例えば鎖と鎖の境界のモデル構造、または実際の構造を基に、3次元構造が境界の曝露された領域に似た小分子を設計することができる。また3次元構造がTCRの - 接合の一部または全体に似たポリペプチドを設計することができる。例えば関心対象のTCRのモデル構造または実際の構造を用いて、設計されたポリペプチド（例えば約100アミノ酸のポリペプチド）に後に似せることのできるTCRの - 接合のモデル構造または実際の構造が得られる。共有結合またはリンカーを、設計ポリペプチドのドメイン間に加えることで、1本鎖のポリペプチドを作製することができる。このようなモデル化の手順には、MolScriptなどの任意の標準的なモデル化プログラムを使用することができる。

#### 【0062】

同様に、以上の方法で、対象TCRの - 接合に優先的に結合する抗体を作製することができる。

#### 【0063】

「TCRの抗原結合部位」は、抗原に結合するTCRの領域を意味する。この領域は、TCR可変領域の曝露表面の一部を含む。例えば、このような抗原結合部位は、鎖のCDR3ループ、鎖のCDR3ループ、CDR1ループの予測可能な部分、CDR2ループ

の予測可能な部分、およびある程度近傍の構造表面を含む。

【0064】

望ましくは、抗原結合部位の3次元構造、もしくは抗原結合部位の3次元構造のモデルを用いて、哺乳類を免疫化するためのポリペプチドもしくは小分子を設計し、TCRの抗原結合部位に対する抗体を作製する。TCRの抗原結合部位の複数の3次元構造が（抗原の存在下または非存在下で）既に報告されており、当業者は、これを用いて、NK細胞、CD1d反応性細胞、J<sub>H</sub>Q<sup>+</sup>細胞、またはインバリアントT細胞に発現されるTCRの抗原結合部位をモデル化することができる。またCD1dのモデル構造または実際の構造を用いて、他の成分がCD1d反応性T細胞と相互作用する機構を決定することができる。抗原結合部位のモデル構造、もしくは実際の構造を基に、小分子もしくはポリペプチドを、抗原結合部位の一部または全体に似た3次元構造をもつように設計することができる。例えば対象TCRのモデル構造または実際の構造を用いることで、TCRの抗原結合部位のモデル構造または実際の構造が得られる。これは後に、設計されたポリペプチド（例えば約100アミノ酸のポリペプチド）に似せることができる。共有結合またはリンカーを、設計されたポリペプチドのドメイン間に加えることで1本鎖のポリペプチドが得られる。このようなモデル作製の手順には、MolScriptなどの任意の標準的なモデル化プログラムを使用することができる。

10

【0065】

「インバリアントT細胞」とは、CD1d反応性のインバリアントT細胞抗原受容体を有するT細胞を意味する。「ヒトCD1d反応性インバリアントT細胞抗原受容体」とは、CD1dを認識し、N領域の多様性がほとんどないか全くなくなる、V<sub>H</sub>24とJ<sub>H</sub>Q間の再編成から生じる、鎖を有するT細胞抗原受容体を意味する（Kentら、Human Immunology 60:1080~1089、1999）。マウスでは、インバリアントTCR-鎖は、N領域の多様性がほとんどないか全くない、V<sub>H</sub>14とJ<sub>H</sub>281間の再編成で生じる。このような等価の再編成は、他の哺乳類（例えばラット）および鳥類で生じることがある。ヒトのインバリアントTCR-鎖は、V<sub>H</sub>11と優先的に対を形成するが、他のV<sub>H</sub>と対を形成することができる。ヒトのCD1d反応性インバリアントT細胞抗原受容体はCD1dを認識するが、CD1a、CD1b、またはCD1cファミリーの分子とはそれほど関連性は強くない（Exleyら、J. Exp. Med. 186(1):109~120、1997）。

20

30

【0066】

「断片」とは、本発明の抗体の対応領域と同一な連続的なアミノ酸の領域を有するポリペプチドを意味する。断片は、本明細書に記載されたアッセイ法で決定すると、エキソピボまたはインピボでT細胞に結合し、それを活性化し、および/または増殖させることができる。望ましくは、増殖した細胞の数、活性、または純度は、本明細書に記載されたアッセイ法で測定すると、本発明の抗体の少なくとも20%、40%、60%、80%、または90%である。望ましくは、このような断片とTCRのCDR3ループ、-接合、または抗原結合部位との結合は、本発明の抗体との結合の少なくとも20%、40%、60%、80%、または90%である。

【0067】

「誘導体」とは、化学的に修飾されるか、または遺伝子融合もしくは化学合成により修飾された、毒素、治療的に活性のある化合物、酵素、サイトカイン、放射標識、蛍光標識、または親和性タグと共有結合される、本発明の抗体または断片を意味する。共有結合で連結された官能基を、抗体もしくは断片のアミノ末端、カルボキシ末端、アミノ末端とカルボキシ末端の間、またはアミノ酸の側鎖に結合させることができる。「親和性タグ」とは、別のペプチド、タンパク質、または化合物に結合するペプチド、タンパク質、または化合物を意味する。望ましい態様では、親和性タグは、誘導体の精製または固定化に使用される。別の望ましい態様では、親和性タグまたは毒素を用いて、抗体または断片を、インピボにおいて特定の細胞、組織、または器官系に標的化する。さらに別の望ましい態様では、蛍光標識または放射標識が誘導体の画像化に使用される。さらに別の望ましい態様で

40

50

は、治療的に活性のある化合物または放射標識が、疾患または障害の治療または予防に用いられる。別の態様では、本発明の抗体の誘導体または断片は、上記の抗体に比べて安定性を増強したり可溶性を上昇させる。本発明の抗体、断片、または誘導体が、毒素、治療的に活性のある化合物、酵素、サイトカイン、放射標識、蛍光標識、磁気標識、または親和性タグに共有結合で連結された別の抗体に、非共有結合的に結合されうることも意図される。

【0068】

「ヒト化」とは、抗体のアミノ酸配列を変更して、ヒトに投与された場合に、抗体および/または免疫応答が、そのヒト化抗体に対してほとんど生じなくなるようにすることを意味する。ヒト以外の哺乳類の抗体を用いる場合は、本発明の抗体を、関心対象の種のフォーマットに変換することができる。

10

【0069】

「二機能性抗体」とは、別の抗体、または抗体の別の断片に共有結合で連結された、抗体または抗体の断片を含む抗体を意味する。望ましくは抗体または断片の両方が、同じT細胞上に発現された異なるエピトープに結合する。望ましくは、二機能性抗体に含まれる少なくとも1つの抗体は、本発明の抗体である。望ましくは、このような抗体は、CD3、CD161、またはCD3およびCD161の両方に結合する。別の望ましい態様では、このような抗体は、V<sub>H</sub>24、CD94、V<sub>H</sub>11、および抗CD28の1つまたは複数に結合する。

【0070】

「環状ペプチド」とは、TCRのCDR3ループの領域に少なくとも60%、望ましくは80%、より望ましくは90%、また最も望ましくは100%が同一なアミノ酸配列を有する、非線形ペプチドを意味する。一つの望ましい態様では、このペプチドのアミノ酸配列は、ヒトインバリアントTCR - のCDR3ループに由来する

20

CVVSDRGSTLGRLADCG

(配列番号：1)、または配列番号：1の少なくとも5個、8個、10個、もしくは15個の連続したアミノ酸領域を含む。別の望ましい態様では、このペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：1と同一である。このペプチドは、ペプチドもしくは残基の側鎖のN末端のアミノ酸と、C末端のカルボキシル基もしくは残基の側鎖との間に共有結合を形成することで環状化する。例えばペプチドラクタムは、N末端のアミノ基もしくはアミノ酸側鎖のアミノ基と、C末端のカルボキシル基もしくはアミドを含む側鎖(グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、またはアスパラギンなど)との間で環状化することで形成する。他の起こりうる環状化には、システイン側鎖に含まれるチオール基と、N末端のアミノ基、C末端のカルボキシル基、または別のアミノ酸の側鎖との反応による、チオエーテルの形成が含まれる。ジスルフィドが2個のシステイン残基の間に形成されることもある。インバリアントTCRまたは別のTCRの鎖もしくは鎖の別のループ、または曝露表面の領域に少なくとも60%、望ましくは80%、より望ましくは90%、また最も望ましくは100%同一なアミノ酸配列を有するペプチドが、別のTCRに対する抗体の作製に使用される場合がある。望ましいループには、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup> T細胞の鎖もしくは鎖のCDR3ループなどがある。

30

40

【0071】

「CD1dまたはインバリアントT細胞を欠く哺乳類」とは、同じ種の他の哺乳類と比較したときに、機能性のCD1d分子、インバリアントT細胞、TCR - 鎖、またはTCR - 鎖の量が減少しているか、または全く存在しない哺乳類を意味する。このような哺乳類の望ましい例には、CD1dノックアウトマウス(Sonodaら、1999、前掲)、インバリアントTCRに寛容性のない哺乳類、インバリアントT細胞が除去された哺乳類、TCR - 鎖の一部を欠く哺乳類(Cuiraら、Science 278:1623、1997)、VB8分子の一部を欠く哺乳類、またはインバリアントNK T細胞、もしくは関連する亜集団が、抗体、サイトカイン、もしくは反復性抗原性刺激によって除かれた動物などがある。

50

## 【0072】

「免疫化する」とは、担体に結合させたペプチド、インバリアントT細胞のいずれか、または両方を標準的な手順で動物（例えば哺乳類もしくは鳥類）に投与する段階を意味する。望ましい投与経路には、腹腔内、筋肉内、皮内、および皮下への投与がある。投与の用量および頻度は、標準的な手順で決定することができる。

## 【0073】

「抗体を単離する」とは、抗血清、腹水、またはハイブリドーマ上清から抗体を精製する段階を意味する。抗体は、当業者であれば、オースベル(Ausubel)ら(「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」、第2巻、p. 11.13.1~11.13.3、John Wiley & Sons、1995)に記載された手法などの標準的な手法で精製することができる。抗体は、望ましくはポリアクリルアミド電気泳動、カラムクロマトグラフィー、光学密度、HPLC分析、またはウェスタン分析で測定して、混入タンパク質の減少を検出するか、またはELISAで、特定のT細胞亜集団に関して対マーカー結合の比活性の上昇を検出すると、出発材料の少なくとも2倍、5倍、または10倍純粋である。

10

## 【0074】

「接触させる」とは、試料を抗体またはサイトカインとインキュベートする段階を意味する。このような抗体またはサイトカインは、可溶性の状態であっても固定化された状態であってもよい。一つの態様では、固定化された抗体もしくはサイトカインは、ビーズもしくはプレートと緊密に結合した状態であるか、または共有結合で連結されている。望ましい態様では、接触はエキソピボまたはインピボで生じる。

20

## 【0075】

「測定する」とは、特定のT細胞亜集団に属する、試料中の細胞の割合(%)を決定する段階、または本明細書に記載されたように、特定のT細胞亜集団に属する、試料中の細胞数を決定する段階を意味する。望ましい態様では、このようなT細胞は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞である。

## 【0076】

「治療または予防する」とは、本発明の抗体、または抗体とインキュベートされたT細胞を、本明細書に記載されるように、哺乳類に投与する段階を意味する。

## 【0077】

「T細胞の病因」とは、サイトカイン産生もしくは細胞毒性などの、T細胞の活性によって生じたり悪化される疾患または障害を意味する。

30

## 【0078】

「自己免疫疾患」とは、自己エピトープに対して免疫系応答が生じる疾患を意味する。自己免疫疾患の例には、インスリン依存性糖尿病、慢性関節リウマチ、尋常性天疱瘡、多発性硬化症、および重症筋無力症などがある。

## 【0079】

「T細胞亜集団のサイズを増大させる」とは、T細胞亜集団を抗体とインキュベートすることにより、またはT細胞亜集団を抗原および抗原提示細胞とインキュベートすることにより、細胞の増殖を促進する段階を意味する。望ましくは、インキュベーション後に存在する、亜集団に属するT細胞の数は、抗体または抗原および抗原提示細胞の非存在下で、対応する対照のインキュベーション後に存在する、これらの細胞数より、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、70倍、90倍、150倍、または500倍多い。より望ましくは、インキュベーション後に存在する、亜集団に属するT細胞の数は、0.1~2 μg/mlのフィトヘマグルチニン(PHA)の存在下における、対応するインキュベーション後に存在する細胞数より、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、または50倍多い。T細胞の総数が増加した場合に、上記割合(%)が同じまま留まるが、関連するサブセットの実際の数が増加することも意図される。望ましくは、T細胞亜集団に属する細胞の割合(%)の変化は、抗体とインキュベートされていない対照試料における、T細胞亜集団に属する細胞の割合(%)におけ

40

50

る、対応する変化より少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、または50倍大きい。別の望ましい態様では、このようなT細胞は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞である。

【0080】

「NK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> 細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団の増殖または活性化を優先的に調節する」とは、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞の増殖もしくは活性化を誘導する段階、または抑制する段階を意味する。このようなT細胞亜集団の増殖の誘導は、T細胞亜集団のサイズの拡大の判定に関して記載されたように、測定することができる。このようなT細胞亜集団の増殖の抑制は、抗体を含まない対象インキュベーションと比較される、本発明の抗体とのインキュベーション後における同亜集団に属するT細胞の数を比較することで決定することができる。望ましくは、抗体とのインキュベーション後に存在する、同亜集団に属するT細胞の数は、対応する対照のインキュベーション後に存在するT細胞数より2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、または100倍少ない。このようなT細胞増殖の抑制は、T細胞の病因の予防または治療に有用な場合がある。T細胞亜集団の活性化の誘導もしくは抑制は、T細胞亜集団のサイトカイン産生もしくは細胞毒性を測定する標準的な手順で調べることができる。望ましくは、サイトカインの産生もしくは細胞毒性の上昇または低下は、抗体の非存在下でインキュベートした対照T細胞亜集団の活性の、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、70%、90%、または100%である。望ましくは、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、少なくとも1つのT細胞亜集団のサイズまたは活性の変化は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞以外の細胞における、対応する変化より少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、70倍、90倍、150倍、または500倍大きい。望ましい態様では、このような抗体は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞からなる群より選択される、唯一のT細胞亜集団に優先的に結合するか、またはその増殖もしくは活性化を調節する。

10

20

【0081】

「抗V 24抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD56抗体、抗CD161抗体、抗CD94抗体、抗CD28抗体、または抗V 11抗体」とは、V 24分子、CD4分子、CD8分子、CD56分子、CD161分子、CD94分子、CD28分子、もしくはV 11分子、またはこれらの分子の1つを発現する細胞を認識して結合するが、他のタンパク質もしくは細胞を天然の状態を含む試料（例えば生物学的試料）に含まれる他の分子を実質的に認識せず結合しない抗体を意味する。

30

【0082】

「T細胞を含む試料を得る」とは、哺乳類に由来するT細胞を有する試料を除去する段階、またはこのような細胞を有し、かつ哺乳類によって産生される試料を得る段階を意味する。望ましい態様では、このような試料は末梢血である。別の態様では、このような試料は尿、胆汁、または体組織などの体液である。別の態様では、このような試料は骨髄、または臍帯試料である。

40

【0083】

「T細胞を精製する」とは、天然の状態での他の細胞を含む試料からT細胞を単離する段階を意味する。T細胞は、本発明の抗体、または抗V 24抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD56抗体、抗CD161抗体、もしくは抗V 11抗体を用いて標準的な手順で精製することができる。望ましい精製法には、蛍光活性化細胞選別（FACS）、免疫沈殿、免疫親和性クロマトグラフィー、磁気ビーズ免疫親和性精製、およびプレートに結合している抗体を用いる細胞パニングなどがある。望ましくは、精製されたT細胞は、精製したT細胞と、それが属するT細胞亜集団用のマーカーとの結合を検出する、ELISA分析またはFACS解析で測定されると、元の試料の少なくとも2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、500倍、または900倍純粋である。

50

## 【0084】

「精製されたT細胞亜集団」とは、天然の状態での他の細胞を含む試料から単離される、実質的に純粋なT細胞亜集団を意味する。精製されたT細胞亜集団は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞の少なくとも1つについて濃縮される。望ましくは、このようなT細胞亜集団は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞のただ1つについて濃縮される。精製されたT細胞亜集団は、天然の状態では認められるT細胞亜集団の純度より純粋である。望ましくは、精製されたT細胞亜集団は、その数について少なくとも1%、5%、15%、30%、50%、75%、90%、または99%が、天然の状態では結合している細胞を含まない。通常、T細胞亜集団と結合するこのような他の細胞は、細胞表面細胞を発現しない点、リガンドと結合しない点、またはT細胞亜集団の活性をもたない点、対象亜集団に属するT細胞とは異なる。

10

## 【0085】

「複合体」とは、T細胞に対する抗体の結合により、試料からの複合体の単離または分離が十分可能となる抗体に結合しているT細胞を意味する。

## 【0086】

「複合体から細胞を回収する」とは、標準的な手順でT細胞と抗体を分ける段階を意味する。

## 【0087】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明によって明らかになる。

## 【0088】

詳細な説明

本発明者らは、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞のT細胞抗原受容体(TCR)に対する抗体を産生させる方法を開発した(図1)。本発明はまた、T細胞もしくは特定のT細胞亜集団の数、および/または活性の影響を受ける疾患もしくは症状の診断、画像化、および治療の応用に有用なNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞のTCRに対する精製抗体を提供する。このような疾患または症状の例には、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、および癌などがある。本発明の抗体を用いるエキソピボもしくはインピボにおけるNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞の増殖は、単独で、または

20

30

## 【0089】

- GalCerなどの抗原を使用するのではなく、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞の増殖に用いる抗CDR3ループのモノクローナル抗体を使用することにより、自家APCに対する要件が排除され、それらを変動性の潜在的な原因として除き、臨床試験の手順を大いに単純化できると考えられる。またモノクローナル抗体を使用することで、複数の細胞種に由来する非特異的なポリクローナルT細胞の増殖に対する、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞の特異的な増殖が可能になると考えられる。

40

## 【0090】

Bリンパ球およびTリンパ球のほぼすべての個々のクローンの抗原受容体は、固有のランダムな体細胞再編成の産物である。このような再編成は一卵性双生児でも起こり、相互に異なる数百万種の受容体が生じる。これとは対照的に、本発明で使用されるCD1d-選択的およびCD1d-反応性のインバリアントTCRは、固有に普遍的な標的となる。インバリアントTCR-のCDR3ループの配列は、すべての個体で同一なので、同領域を用いて、ヒトのインバリアントTCR-鎖を認識する新しいモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作製することができる。このモノクローナル抗体は、正常なドナーに由来するインバリアントT細胞をエキソピボで優先的に同定し、それを増殖させることができる。本発明のモノクローナル抗体を用いた、本発明者らによる細胞を増殖させる

50

方法により、バルク培養物に含まれる細胞集団サイズが約  $> 10^8$  のインバリアントT細胞、および  $10 \sim 20$  mlの末梢血を出発材料とする  $> 10^7$  の個々のクローンが得られる。わずかに数万個のインバリアントT細胞が、マウスを対象に実施された細胞輸送実験で機能することが報告されている (Sonodaら、前掲)。したがって、ヒトの第1相臨床試験は、約  $10^6$  個の細胞から始め、 $10^9$  個の最大細胞量を標的とするような、用量増加群 (a dose escalation arm) を組み入れることができる。この範囲の細胞の注入は耐容性が優れていると予測されている。例えばドナーの白血球の注入では、顕著な副作用がない  $10^{10}$  の桁の未精製細胞を日常的に用いる。

#### 【0091】

抗腫瘍効果に加えて、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、および  $J Q^+$  T細胞は、細胞内病原体に対するTh1防御性の免疫応答に寄与する可能性がある。例えば本発明者らは、急性の細胞変性ウイルス (脳心筋炎ウイルス、EMCV-D) に対する免疫応答が、CD1dノックアウトマウスではみられないことを見出している (Exleyら、J. Leuk Biol. 69:713, 2001)。この結果は、本発明の抗体をウイルス、細菌、寄生虫、真菌、原虫、または他の真核性病原体を原因とする疾患を含む、感染症の予防または治療にも使用できることを示唆している。

#### 【0092】

NK T細胞、CD1d反応性T細胞、および  $J Q^+$  T細胞は、刺激条件に依存して、Th1応答、Th2応答、または免疫偏向反応を増強することができるため、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、および  $J Q^+$  T細胞の反応は、エキソピボで増殖させたNK T細胞、CD1d反応性T細胞、および  $J Q^+$  T細胞の注入前、注入中、もしくは注入後におけるサイトカインのインピボにおける投与か、あるいはサイトカインの存在下におけるエキソピボにおける細胞の増殖の実施のいずれかにより、または2つの方法を組み合わせることによって調節することができる。Th1応答へT細胞を向けることが公知の、IL-12、IL-15、またはIL-18などのサイトカインを用いることで、癌、感染症、アレルギー、喘息、妊娠、および炎症の予防または治療における、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、および  $J Q^+$  T細胞の有効性が上昇すると予測されている。または、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、およびGM-CSFなどの他の任意のサイトカインを用いて、Th2応答が防御的に作用する自己免疫疾患および移植片対宿主病を予防または治療するために、T細胞をTh2応答方向に偏向させることができる。または、このようなサイトカインを用いることで、T細胞をTh1応答およびTh2応答から離して、妊娠維持に寄与する可能性のある免疫偏向反応に偏向させることができる。免疫偏向反応には、免疫的に隔絶された部位における応答などの、持続的な免疫応答の抑制が含まれる。TGF- $\beta$  およびIL-10は、免疫偏向反応に関与する可能性のあるサイトカインの例である (Sonodaら、前掲)。

#### 【0093】

エキソピボにおけるNK T細胞、CD1d反応性T細胞、または  $J Q^+$  T細胞の増殖における用途に加えて、本発明の抗体をヒトなどの哺乳類に投与して、自己免疫疾患、感染症、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、または癌の予防もしくは治療に用いるNK T細胞、CD1d反応性T細胞、または  $J Q^+$  T細胞の数を、インピボで増やすことができる。例えばインバリアントNK T細胞などの特定のT細胞のレベルの低下は、前立腺癌、多発性硬化症、HIV、および1型糖尿病の患者で確認されている (実施例9、11、および12)。または、V $\alpha$ 24 $^+$ CD161 $^+$  T細胞数の減少は黒色腫患者で過去に報告されている (Kawanoら、Cancer Res. 59:5102, 1999)。したがってインバリアントNK T細胞の機能の喪失は、進行癌における一般的な結果となる可能性がある。または、サイトカイン産生または細胞毒性などの、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、および  $J Q^+$  T細胞に対する結合、およびその増殖または活性を抑制する抗体を用いて、哺乳類におけるT細胞の病因を抑制することができる。例えばアレルギーはNK T細胞

10

20

30

40

50

胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞のTh2応答により生じたり悪化させる場合があるので、NK細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞の増殖またはTh2応答を抑制することは、上記症状の予防または治療に有用な場合がある。同様にNK細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞のTh1応答を低下させることは、自己免疫疾患の改善、安定化、もしくは予防、または自然流産の予防につながる場合がある。肝炎ウイルスなどの感染源によって誘導されるTh1応答も、以上の細胞を抑制することで極めて小さくなる可能性のある損傷を生じる場合がある。上記細胞を抑制する抗体の例には、一価の分子もしくはFab分子、または抗体が細胞に結合することで細胞を損なう毒素もしくは放射標識を結合させた抗体などがある。このような抗体は、細胞上に発現したTCRに結合して、リガンドとTCRとの結合を妨げることがある。

10

#### 【0094】

本発明の抗体は、画像化における応用にも使用できる。特に本発明の抗体を蛍光または放射標識に結合させることで、インビボにおける、または生検試料、血液、および他の身体材料、もしくは体液における、NK細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞の視覚化に使用することができる。本発明の抗体は、上記試料からNK細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞を精製する際にも使用することができる。本発明の抗体は、インバリアントT細胞ではなく、骨髄や肝臓などの複数の部位においてインバリアントT細胞より豊富に存在する他のNK細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞にも結合可能である。細胞の約0.1%がインバリアントT細胞である末梢血試料から、インバリアントT細胞を精製する際に本発明の抗体を用いて、90%~95%がインバリアントT細胞である細胞を単離することができる。より高い純度も、複数回の精製を行うことで、または1回の精製段階に複数の抗体を用いることで達成することができる。

20

#### 【0095】

さらに高い純度またはより多い細胞数は、抗原および抗原提示細胞(APC)をT細胞に接触させることでも達成することができる。関心対象のT細胞に対する任意の抗原(例えばタンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物、核酸、感染性物質、または小分子)を使用することができる。CD1d反応性T細胞に対して使用可能な抗原の例には、感染性病原体に由来する脂質またはグリコシル-ホスファチジルイノシトール抗原、およびGalCerなどがある。他の抗原には、クラスIまたはクラスIIのMHC分子によって提示されるペプチド抗原およびタンパク質抗原などがある。

30

#### 【0096】

さらに抗原は、APCの非存在下で関心対象のT細胞に提示させることができる。例えばリポソームに結合させた可溶性の抗原提示分子、または固定化された状態の抗原提示分子(例えばCD1d、クラスI MHC、またはクラスII MHC)を用いて、APCの非存在下で関心対象のT細胞の活性化または増殖が可能な条件下で、抗原(例えば脂質もしくはペプチド)をT細胞または関心対象のT細胞を含む試料に提示させることができる。使用される抗原提示分子は天然分子の場合もあれば、化学的または遺伝学的に修飾された分子の場合もある。例えば、このような分子は、GST、マルトース結合タンパク質、ヘキサヒスチジン、またはFc領域融合タンパク質などの融合タンパク質として発現させることができる。膜結合ドメイン、膜貫通ドメイン、または疎水性領域を含む融合タンパク質として発現される抗原提示分子を脂質分子と混合することで、融合タンパク質を含むリポソームもしくはミセルを形成させることができる。表面に抗原提示細胞を有するリポソームまたはミセルは、APCが抗原をT細胞に提示する能力を模倣している。または抗原提示分子は、硬質表面または半硬質表面などの固相支持体上に固定化することができる。このような支持体は、膜、フィルター、チップ、スライド、ウエハー、ファイバー、磁気ビーズまたは非磁気ビーズ、ゲル、チュービング、ストリップ、プレート、ロッド、ポリマー、粒子、微粒子、およびキャピラリーを含むがこれらに限定されない、任意の多孔性または非多孔性の水に不溶性の材料でありうる。望ましいならば、このような支持体には、

40

50

タンパク質を結合させるためのウェル、トレンチ、ピン、チャンネル、および孔などの、さまざまな表面形状をもたせることができる。

【0097】

溶液、固相支持体に固定化された状態、またはリポソームもしくはミセルに含まれる、いずれかの状態の抗原提示分子は、同分子が抗原と結合できる条件下で、関心対象のT細胞亜集団に対する抗原に接触させることができる。次にこのような抗原を関心対象のT細胞に相互作用させて、T細胞の増殖および/または活性化を誘導することができる。APCの非存在下で抗原によって、関心対象のT細胞を増殖させるかまたは活性化させる、これらの方法は、APCなどの余分な細胞の存在が望ましくない場合がある臨床状況で、望ましい可能性がある。

10

【0098】

フローサイトメトリーによるインバリアントT細胞の定量に本発明の抗体を用いることは、現行の方法に勝る多くの利点がある。現行の方法には、実施例6に記載されたように、それほど特異的でない抗体を用いるフローサイトメトリー、またはTCR-鎖をコードするmRNAに対応するcDNAを合成および増幅する段階、ならびに増幅したcDNAを、インバリアントT細胞クローンから作られたcDNAおよび対照T細胞クローンから作られたcDNAと比較する段階を含む、PCRを利用した方法のいずれかが含まれる。フローサイトメトリー法にはインバリアントT細胞の総数を決定できるという利点がある。これに対しPCRを利用した方法では、試料に含まれるインバリアントT細胞の相対頻度しか決定できない。またフローサイトメトリーでは、インバリアントT細胞上でどのマーカーが発現されているかを決定することができる。フローサイトメトリー法はまた、約1日を要するPCR法に比べて単純かつ迅速な方法であり、約1時間で実施することが可能であり、分子生物学的技術における熟練を必要としない。したがって本発明の抗体を用いるフローサイトメトリー法は、臨床状況によってはさらに望ましい場合がある。同様の方法で、本発明の抗体を用いることで他のNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞を定量することもできる。

20

【0099】

また本発明の抗体を、疾患を有する被験者、または疾患の危険性のある被験者の診断に用いることができる。実施例6、9、および10に記載されたように、本発明の抗体を用いることで、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞の数を定量して、このような細胞を、サイトカイン産生および細胞毒性活性の測定用に単離することができる。このようなパラメータを、被験者と、症状を有する被験者、および/または症状がない被験者との間で比較することで、症状に対する危険性、症状の存在、重症度、病期、回復度、寛解を診断することができる。

30

【0100】

以下の例は、本発明を説明するためのものである。これらは本発明をいかなる様式でも制限しないことを意味する。以下の実施例に記載された方法は、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、J<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞、および/またはインバリアントT細胞に適用されうると理解すべきである。

【0101】

実施例1：ヒトNK T細胞の抗原受容体 鎖に対する抗体の作製

ヒトのすべてのインバリアントTCR<sup>+</sup>T細胞には、CDR3ループ中に同じアミノ酸配列が存在するので、この領域を用いて抗CDR3ループ抗体を作製するためのペプチドを設計することができる。マウスおよびヒトのCDR3ループの配列はほぼ同一（CVVSDRGST<sub>マウス</sub>およびCVVGDRGSA<sub>ヒト</sub>）

40

それぞれ配列番号：2および3)なので、ヒトCDR3ループ配列をもつペプチドをマウスに投与すると、マウスの免疫系により自己ペプチドとして認識され、そのため抗体産生を誘導しないと考えられる。

【0102】

このような潜在的な問題を克服するために、インバリアントTCR<sup>+</sup>T細胞をもたない

50

CD1dノックアウトマウス(Sonodaら、前掲)を、抗CDR3ループ抗体を産生させるための宿主として用いた。このようなマウスはインバリアントTCR-鎖をもたないので、異物としてヒトCDR3ループの配列を含むペプチドを認識することが可能であり、そのため、このようなエピトープに対する抗体を産生する。

#### 【0103】

抗体およびハイブリドーマの産生には、ヒトのインバリアントTCR-鎖のCDR3ループの一部に対応するアミノ酸配列をもつペプチド(CVVSDRGSTLGRLADCG, 配列番号: 1)

を使用した。このペプチドを、そのN末端のアミノ基とC末端のカルボキシル基を反応させることで環状化した。この環状ペプチドにキーホールリンペットヘモシニアン担体を結合させ、CD1dノックアウトマウスに標準的な手法で投与した。またウシ血清アルブミンに結合させた同ペプチドを、ブースター注射として投与した。次にインバリアントTCR<sup>+</sup>T細胞を数匹のマウスに投与して免疫系をさらに刺激した。このマウスから採取した血清を対象に、卵白アルブミンに結合させたペプチドに結合する抗体の有無について、標準的なELISAアッセイ法で調べた。ハイブリドーマは、血清陽性マウスの脾臓から標準的な手法で作製した。ELISAで陽性を示したハイブリドーマのウェルをさらにFACSで調べ、V24J Qクローンに対する抗体の結合を陰性対照と比較した。V24J Qクローンには結合したが陰性対照には結合しなかった抗体を産生する細胞をクローン化し、標準的な手法で脾臓の免疫細胞と融合させた。対象ペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの集団を、次にELISAアッセイ法で同定した。続いて、無処置のNK T細胞上に発現されたインバリアントTCR-鎖を認識するクローンを選択するスクリーニングでは、ハイブリドーマの反復クローニングを行い、インバリアントTCR-鎖を発現する細胞には結合するが陰性対照には結合しない細胞をFACSで調べ、ペプチドに対する特異的な結合の有無をELISAで確認した。ハイブリドーマのクローンを分泌するこのような安定なモノクローナル抗体は、当業者によって、臨床試験レベルの質および量をもつモノクローナル抗体試薬の作製および精製に使用することができる。

#### 【0104】

2つの抗体(3A6および6B11)が、ヒトのインバリアントT細胞を優先的に認識することが判明した(図2)。6B11はIgG1であり、3A6はIgMである。6B11が独占的にV24モノクローナル抗体でないことを示すために、FACSで精製されたバルクV24<sup>+</sup>T細胞をPHAを用いて増幅した。この細胞を次にV24、V11および6B11の各モノクローナル抗体で分析した(図3)。得られた結果は、6B11が、V11モノクローナル抗体に似て、V24<sup>+</sup>T細胞の一部を認識することを示している。また複数のドナーを対象に単細胞選別を行い、6B11<sup>+</sup>T細胞に由来するクローンを確立した。6B11は、CD1d<sup>+</sup>標的と同じサイトカイン応答を誘導することも判明した。

#### 【0105】

CDR3ループに反応する抗体を産生させる上記の方法は、任意のTCRを対象として実施することもできる。関心対象のTCR-鎖またはTCR-鎖のCDR3ループの配列は、他のTCR-鎖もしくはTCR-鎖との配列アライメントを基に、または関心対象のTCR-鎖もしくはTCR-鎖の3次元構造モデル化、もしくは実験的に決定された3次元構造を基に決定することができる(JohnsonおよびWu、Nuc. Acid. Res. 29(1): 205~206、2001; <http://immunobme.nwu.edu>)。上述するように、このようなCDR3ループの配列を含む環状ペプチドを、CDR3ループに反応する抗体を産生させるための抗原ペプチドとして使用することができる。この環状ペプチドは、動物(例えば実験動物または獣医学的な関心がもたれる動物)に1回または複数回投与することができる。抗体の産生をさらに促進するために、関心対象のT細胞を動物に投与することもできる。抗体の産生に使用可

能な哺乳類の例にはマウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、およびウシなどがある。使用可能な鳥類の例にはニワトリやシチメンチョウなどがある。このような宿主動物は野生型動物でも、抗体が産生されるT細胞亜集団の量が減少した動物、またはこれを欠く動物でもよい。使用可能な他の動物には、天然の動物、遺伝的修飾を受けた動物、またはT細胞を欠く動物の場合がある。抗体を産生させることのできる他の任意の動物も、本発明の抗体を産生させる際に使用することができる。

【0106】

結果として得られた抗体を、抗体産生用の宿主動物として、同じ属もしくは種の他の動物を対象とした診断または臨床における応用に用いることができる。また本発明の抗体は、宿主動物として異なる属の動物を対象とした応用に使用することができる。例えばニワトリで産生された抗体を、他のニワトリもしくは他の鳥における疾患の治療または予防に使用することができる。

10

【0107】

特定の疾患もしくは症状の治療、予防、または診断用の抗体を作製するために、疾患もしくは症状に関連するT細胞亜集団のCDR3ループを使用することができる(例えば表1を参照)。例えば、疾患もしくは症状のない対照被験者における、対応するT細胞亜集団に対して、疾患もしくは症状を有する被験者において、上昇したレベルもしくは低下したレベルで存在するか、または活性が増大もしくは減少したT細胞亜集団を用いて、本発明の抗体を作製することができる。あるいはT細胞を、疾患もしくは症状を有する被験者から採取した試料(生検試料など)から単離することができる。試料に含まれるT細胞亜集団の特性は、さまざまなT細胞マーカーに反応する抗体を用いたFACS解析、またはTCR-鎖もしくはTCR-鎖の配列決定などの標準的な手法で決定することができる。単離されたT細胞亜集団に由来するCDR3ループは、抗体の作製に使用することができる。このような抗体を、疾患または症状を有する被験者(T細胞亜集団を単離した元の被験者、ならびに同じ症状を有する他の被験者を含む)に投与して、関連するT細胞の数および/または活性をインビボで調節することができる。このような抗体を用いて、関連するT細胞をエキソビボで増殖させた後に、増殖させたT細胞を被験者に再投与することもできる。

20

【0108】

本発明の抗体を、任意の抗原感作に反応して動物(例えばヒト、他の哺乳類、および鳥類)の体内で遭遇する任意の抗原に特異的な、オリゴクローナ的に増殖したT細胞亜集団に対するように作製することもできる。このようなT細胞サブセットには、複数の個体における抗原の免疫優性成分に反応してオリゴクローナ的に増殖したT細胞が含まれる。例えば対象抗原を動物に投与して、投与によって生じるオリゴクローナ的に増殖したT細胞サブセットを単離して、本明細書に記載された抗体の作製に使用することができる。

30

【0109】

【表1】記載した疾患または症状が関与する臨床応用に用いる抗体の作製に使用可能なT細胞受容体

疾患/症状	引用
多発性硬化症	Wucherpfennig <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 175:993-1002 (1992).
環境性病原体/ 経口耐性の増進	Blumberg <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 150:5144-5153 (1993).
潰瘍性大腸炎	Chott <i>et al.</i> , <i>J. Immunol</i> 156:3024:3035, (1996).
潰瘍性大腸炎	Shigematsu <i>et al.</i> , <i>J. Clin. Lab. Immunol.</i> 48:177-186 (1996).
慢性炎症性腸疾患	Probert <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 157:3183-3191 (1996).
抗原	Porcelli <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 178:1-16 (1993).
関節リウマチ	Fitzgerald <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 154:3538-3547 (1995).
関節リウマチ	Sottini <i>et al.</i> , <i>J. Autoimmun.</i> 6:621-637 (1993).
関節リウマチ	Hingorani <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 156:852-858 (1996).
多発性筋炎	Bender <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 181:1863-1868 (1995).
巨細胞動脈炎	Grunewald <i>et al.</i> , <i>Arthritis Rheum.</i> 37:1221-1227 (1994).
骨髄移植	Gorochov <i>et al.</i> , <i>Blood</i> 83:587-595 (1994).
全身性硬化症	Kuwana <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 158:485-491 (1997).
ヒトリーシュマニア症	Uyemura <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 151:7095-7104 (1993).
B慢性リンパ性白血病	Farace <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 153:4281-4290 (1994).
多発性骨髄腫および 異常タンパク血症	Moss <i>et al.</i> , <i>Blood</i> 87:3297-3306 (1996).

10

20

30

40

## 【 0 1 1 0 】

実施例 2 : モノクローナル抗体によるヒトインバリアント T 細胞の単離および増殖

50

図4は、プレートに結合させた6B11モノクローナル抗体を、インバリアントT細胞の選択的な増殖に使用できることを示す。このように、15人の健康なドナーに由来する20クローンおよび15系列を上回る、6B11を用いた分析では全体的に一貫した結果が得られた。すなわち100%がV $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>であり、CD1d反応性が高く、IL-4を多く産生し、またIFN- $\gamma$ を中程度に産生した(表2)。得られた結果から、このようなモノクローナル抗体に特異性があること、および臨床試験の状況次第では望ましくない場合がある自家APCを必要としない、より限定的かつ単色の代替法として使用できることがさらにわかる。

【0111】

【表2】6B11抗体によるT細胞系またはT細胞クローンの増殖後に、インバリアントNK T細胞マーカーを発現し、サイトカインを産生する細胞の割合(%)

ドナー	細胞	V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	V $\beta$ 11 <sup>+</sup>	CD161 <sup>+</sup>	CD1d反応性	IL-4	IFN- $\gamma$
T細胞系	15	10-100	10-100	10-100	100	100	10-100
T細胞クローン	20	100	100	100	100	100	65

10  
20

【0112】

モノクローナル抗体6B11<sup>+</sup>は単独でも使用され(2ドナー、10クローン)、または抗V $\alpha$ 24抗体と対として(9ドナー、87クローン)、追加的なインバリアントT細胞を単細胞選別でクローン化した。すべてのクローンは、インバリアントCD1d拘束T細胞であることが確認された。これらのクローンはいずれも、TCR-鎖の配列分析の結果、インバリアントTCR-鎖も含んでいた。またすべてのクローンがCD1dに拘束されていた(Exleyら、J. Exp. Med. 186:109, 1997)。一部のドナーでは、6B11<sup>+</sup>T細胞およびCD3<sup>+</sup>T細胞の数は極めて少なかった。T細胞の精製に6B11抗体のみが使用された2人のドナーには上記集団は認められなかった。ドナーの1人は、末梢血に0.01%のV $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>細胞を含んでいた。このドナーの6/6V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>CD1d拘束T細胞の産生は、6B11に特異性があることを意味する。偶然に6/6V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>のクローンとなる確率は(10<sup>-4</sup>)<sup>6</sup>である。図6A~6Cに示すように、6B11抗体は、CD1d拘束T細胞系のIL-4分泌も促進する。

30

【0113】

またFACS選別段階、または磁気ビーズを用いた免疫親和性精製段階のいずれかで6B11抗体を使用してから、分裂促進因子の存在下で増殖させるとインバリアントNK T細胞が単離された(例えば図8、9、10A~10H、および11A~11Fを参照)。PBM C中の約0.05%のリンパ球がインバリアントT細胞であるPBM Cを出発材料とすると、精製および増幅された細胞の約5~30%がインバリアントT細胞であった。

40

【0114】

6B11抗体は、さまざまな人種および年齢群の100人以上の被験者を含む、検討されたすべてのドナーに由来するインバリアントNK T細胞のクローンおよび系列を認識した(例えば図8B~8Iを参照)。この抗体は、癌と診断された被験者、および癌と診断されていない被験者を含む男女被験者におけるインバリアントNK T細胞も認識した。以上の結果から、6B11抗体がインバリアントNK T細胞を認識する能力が、特定の患者集団に制限されないことがわかる。

【0115】

6B11抗体が、インバリアントNK T細胞を増殖させる能力は、GalCerを

50

パルスした自家樹状細胞がもつ同能力と同等であった。比較目的で、「M o F l o」で選別したV<sub>24</sub>細胞を、 $\alpha$ -GalCerをパルスした自家樹状細胞、6B11モノクローナル抗体、または分裂促進因子(PHA)で、IL-2の存在下で約4週間の増幅で増殖させた。図7A~7Cに示したように、6B11抗体を用いたときのインバリアントNK T細胞の増殖は、 $\alpha$ -GalCerを用いて達成された増殖と同等であった。しかし6B11抗体を用いたときの増殖では、APCを必要としないという利点があった。

【0116】

実施例3：関心対象のT細胞の単離および増殖の例示的な方法

関心対象のT細胞亜集団の精製では、正および/または負の選択段階を行うことができる。正の選択段階に使用可能な抗体の例には6B11抗体、3A6抗体、抗V<sub>24</sub>抗体、抗V<sub>11</sub>抗体、および抗CD161抗体などがある。 10

【0117】

関心対象のT細胞は、一部の望ましくないT細胞を除いたり、または試料に含まれる他の混入物を除いたりする負の選択段階で濃縮することができる。例えば抗CD8抗体、および/または抗CD4抗体を用いて、インバリアントNK T細胞に関して試料を濃縮することができる。負の選択段階は、正の選択段階の前に、正の選択段階と同時に、または正の選択段階の後に実施することができる。

【0118】

正および/または負の選択段階は、T細胞増殖段階の前もしくは後に実施することができる。一つの可能な方法では、関心対象のT細胞を最初に精製した後に優先的に増殖させる。別の可能な方法では、増殖させたT細胞を高容量カラムを用いて精製する(例えば $10^{10}$ 個に増殖させた癌患者の末梢血単核球(PBMC)からは、大規模なMiltenyi(ミルテニ)または他のカラムを用いた精製段階後に、 $10^6$ 個のインバリアントNK T細胞が得られる)。 20

【0119】

可能な正の精製段階の例には以下のような段階がある。これらの方法は、関心対象の任意のT細胞亜集団に反応する本発明の抗体とともに使用することができる。

【0120】

例示的なFACSの手順

PBMCまたは他の組織供給源を自家血清を用いて4℃でブロックする。インバリアントT細胞に反応する抗体(例えば6B11抗体または3A6抗体)を、約1~10 $\mu$ gの抗体/ $10^7$ ~ $10^8$ のPBMCの比になるように添加し、4℃で20分間インキュベートする。この方法で使用する抗体はFITCまたはビオチンなどの結合体(conjugate)で直接標識することができるほか、抗体を二次抗体で間接的に標識することができる(例えば抗IgG-Fluorochromeまたはストレプトアビジン-Fluorochrome)。異なるフルオロフォアで標識された1つまたは複数の他の抗体も添加することができる(図7A~7Cおよび9)。次に細胞および抗体の溶液をPBSまたは他の任意の生理的緩衝液で洗浄し、未結合状態の抗体を除去する。 30

【0121】

望ましいならば、FACS細胞選別装置の設定は、正の対照抗体(例えば一般的な抗T細胞抗体)、または陰性対照抗体のいずれかを用いて調節することができる。関心対象の試料は、高速FACS選別装置(例えば「M o F l o」FACS選別装置)を用いることで、1時間あたり約1億個の細胞の速度で分析することができる。精製されたT細胞は、PHA、抗CD3抗体、6B11抗体、3A6抗体、および/または $\alpha$ -GalCer抗原刺激CD3モノクローナル抗体などの分裂促進因子の存在下で、T細胞用培地[例えば緩衝液(例えばHepes)、グルタミン、および抗生物質(例えばゲンタマイシン)を添加したRPMI-1640または等価の培地を溶媒とする10%ウシ胎児血清、またはヒト自家血清もしくはABプール血清]中で増殖させることができる(Exleyら、1997および1998、前掲;Wilsonら、Nature 391:177、1998)。このような抗体は、溶液中に存在してもプレート状に結合した状態であってもよい 40 50

。放射線を照射した自家フィーダーおよびIL-2 (10~100 U/ml)を直ちに添加することもでき、または増殖中の任意の時点で添加することができる。IL-7 (~1~10 ng/ml)、および/またはIL-15 (~1~10 ng/ml)は、インバリアントNK T細胞の収量を増加させることができる(例えばWilsonら、1998、前掲; van der Vlietら、Journal of Immunological Methods 247:61~72、2000)。デキサメタゾンまたは関連する選択的な免疫抑制剤(~1 μM)は、典型的なT細胞の成長を抑制しつつインバリアントNK T細胞の成長を優先的に促進することができる(例えばMilnerら、J. Immunol. 163(5):2522~2529、1999)。培地は、1週間に2回程度の頻度で新鮮な培地と交換する。増殖中または増殖後(例えば増殖開始から2~4週後)に、T細胞の表現型をFACSで解析することができる。この分析は6B11抗体、抗V<sub>β</sub>24抗体、抗V<sub>β</sub>11抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、または抗CD161抗体を染色することで実施可能である。

#### 【0122】

磁気ビーズを用いる例示的な手順

PBMCまたは他の組織供給源を、PBSまたは他の生理的緩衝液と4で混合することで、1~10%の自家血清でブロックする。インバリアントT細胞(例えば6B11抗体または3A6抗体)に反応する1つまたは複数の抗体を、約1~10 μgのモノクローナル抗体/10<sup>7~8</sup>のPBMCの比になるように添加し、4で20分間インキュベーションする。この方法に使用される抗体は、FITCもしくはビオチンなどの結合体で直接標識することができるほか、二次抗体(例えば抗IgG-Fluorochromeまたはstreptavidin-fluorochrome)で間接的に標識することができる。異なるフルオロフォアで標識した1つまたは複数の他の抗体も添加することができる(図7A~7Cおよび9)。次に細胞および抗体の溶液をPBSまたは他の任意の生理的緩衝液で洗浄する。10<sup>7~8</sup>個のPBMCあたり10~100 μlのMilteny MACS Microbeads Anti-mouse IgG #484、またはMACS Strepavidin Microbeads #481/などの磁気ビーズ; 10<sup>7~8</sup>個のPBMCあたり10<sup>5~7</sup>個のダイナル(Dynal)抗IgG #M450ビーズを添加し、溶液を4で混合する。磁石を用いてビーズを単離した後に、製造業者の推奨(例えば製品番号130-042-201などのMilteny MS型分離カラム、およびMACSマルチスタンドまたはダイナルもしくは互換性のある磁石上のチューブ内のダイナルビーズ)にしたがって洗浄する。洗浄して精製した細胞を、マルチウェルにT細胞培地[緩衝液(例えばHepes)、グルタミン、および抗生物質(例えばゲンタマイシン)を添加したRPMI-1640または等価の培地を溶媒とする10%ウシ胎児血清、またはヒト自家血清もしくはABプール血清]とともにプレティングする。この細胞は、ビーズに直接結合するモノクローナル抗体を用いて、または溶液中のモノクローナル抗体を用いて増殖させることができる。追加的に、もしくは代替的に上記細胞を、PHAなどの分裂促進因子、抗CD3抗体、6B11抗体、3A6抗体、またはGalCer抗原刺激性CD3モノクローナル抗体などを添加した培地を用いて増殖させることができる。この抗体は、溶液に含まれる状態か、またはプレート、ビーズ、もしくは他の固相表面に結合した状態とすることができる。上述の通り、IL-7、IL-15、およびデキサメタゾンなどの他のさまざまな試薬は、産物の収率および/または純度を改善することができる。増殖後のT細胞の表現型は上述の手順で分析することができる。

#### 【0123】

実施例4: インバリアントT細胞の磁気ビーズによる精製

図10A~17は、このような磁気ビーズを用いた精製法で、多数の精製インバリアントT細胞を調製可能なことを示す。具体的には6B11抗体を、(1)親和性精製したヤギ抗マウスIgGを表面に共有結合させたダイナル超常磁性ポリスチレンビーズ(Dynabeads(登録商標)M-450ヤギ抗マウスIgG、製品番号110.05)、または(2)ヤギ抗マウスIgGを結合させたMilteny MACSコロイド超常磁性マイク

ロビーズ（製品番号484-02、ミルテニ・バイオテック）のいずれかに、製造業者の指示書（Dynabeads（登録商標）M-450ヤギ抗マウスIgGの添付文書；MACSヤギ抗マウスIgGマイクロビーズの指示書）にしたがって結合させた。PBM C細胞は、6B11-ダイナルまたは6B11-ミルテニビーズを用いて精製することでインバリアントT細胞について濃縮した。次に精製細胞を、さまざまな条件で4～8時間かけて増殖させた。例えば、このようなT細胞を、図12～17に示すようにPHA、6B11抗体、IL-5、IL-7、同種APC、および自家APCの1つまたは複数の存在下で増殖させた。「PBM C」の列は増殖前に選別されなかったPBM C細胞を示す。「ダイナル@40」の列は、増殖前に6B11-ダイナルbeadsで精製されたPBM C細胞を示す。「ミルテニ@20」の列は、増殖前に6B11-ミルテニビーズで選別されたPBM C細胞を示す。

#### 【0124】

図12～17に記載された実験では、IL-7およびIL-15を添加するとインバリアントT細胞の収量が増加した。検討した濃度において、IL-7、IL-15、およびデキサメタゾンはインバリアントT細胞の純度を上昇させなかった。6B11を用いた増殖後にGalCerを用いたときの増殖ではインバリアントT細胞の純度は改善しなかったが、インバリアントT細胞の数は増加した。制限性(6B11<sup>+</sup>CD161)または(CD3<sup>+</sup>CD161)のいずれもインバリアントNK T細胞の収量を増加させなかった(図12～17)。

#### 【0125】

インバリアントT細胞はビオチン化6B11でも精製された。この手順では、フィコールで精製したPBLを6B11-ビオチンとインキュベートした。次に細胞を洗浄して未結合状態の抗体を除き、ミルテニ微粒子に結合させたストレプトアビジンとインキュベートした。6B11<sup>+</sup>細胞は製造業者の指示書にしたがって磁気ビーズ選択法で単離した。IL-2およびIL-7を併用して6B11抗体を用いることで計6系列が得られた。6系列のうち3系列が増殖し、表面の表現型はインバリアントV $\alpha$ 24<sup>+</sup>CD1d拘束T細胞と一致していた。この系列は、増殖後に76%～99%がインバリアントとなった。純粋な系列のFACSプロファイルを図18に示す。インバリアントT細胞のクローニングおよび増殖が成功したことは、6B11をMACS（商標）テクノロジーとあわせて用いることで、FACSを利用したクローニングプロトコルおよび放射線を照射したフィーダーを必要とすることなく、CD1d拘束T細胞を血液から直接単離可能なことを意味する。

#### 【0126】

実施例5：NK T細胞のTh1/Th2/免疫偏向反応の比を変化させるエキソピボまたはインピボにおけるサイトカイン療法

特定の理論に本発明を制限する意図はないが、一つの作業仮説は、高レベルのIL-4（他の「Th2」サイトカインを伴うと考えられる）を産生するNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞は、Th2免疫応答へ偏向する一方、IL-4に比べて高レベルのIL-12（活性化されたCD1d反応性T細胞によりAPCから誘導される）および/またはIFN- $\gamma$ （T細胞そのものから産生される）が、腫瘍もしくは感染性病原体に対する免疫応答を誘導する（または少なくとも誘導性インバリアントT細胞のマーカーとなる）というものである。

#### 【0127】

NK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞は、Th1-様のNK、またはリンフォカインで活性化されるキラー（LAK）様のインバリアントT細胞の細胞毒性、ならびにインピボにおける抗腫瘍活性もしくは抗病原体活性を増大させると考えられるIFN- $\gamma$ 産生に偏向する可能性がある。この方法の実行可能性は、初期のIL-4によるインバリアントT細胞の偏向が、IL-12のエキソピボにおける増殖によって変化して、IL-4に対して著しく高いレベルのIFN- $\gamma$ を生じるという所見により示されるため、これはTh1により偏向されたインバリアントT細胞を産生するための、有望

で単純な方法となる(表3)。IL-12による培養が、インバリアントT細胞のIFN- $\gamma$ の産生を増強し、またNK/LAK様の細胞毒性を有意に増強させることを示す確証的な結果が最近報告されている(van der Vlietら、Immunology 98:557~63、1999)。

【0128】

【表3】IL-12とインキュベートしたインバリアントNK T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生の促進

	増殖	IL-4	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ /IL-4	
系	IL-12なし	36239	1.4	60.4	43.1
1	+IL-12	56593	4.8	>500	>100
系	IL-12なし	21858	1.1	18.1	16.5
2	+IL-12	42499	1.6	331.8	207

10

CD1d反応性V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>T細胞系は、IL-12の有無にかかわらず確立され、インバリアントNK T細胞を特異的に刺激する限定的なプレート結合性抗CD3抗体および過剰なCD161抗体で促進された。

【0129】

したがってインバリアントT細胞は、本発明の抗体とのエキソピボにおける増殖中に0.3 nMのIL-12中で培養することでTh1表現型に再極性化される(Exleyら、前掲(1998))。IL-15、IL-18、および1型INFは、ヒトT細胞のTh1極性化を促進することも知られている。NK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞をTh1応答、Th2応答、または免疫偏向反応に向かって偏向させる可能性のある、他のサイトカインもしくはサイトカインの組み合わせには、IL-2、IL-4、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、およびGM-CSFなどがある。Th2応答は、自己免疫疾患の予防または治療に望ましい場合がある。または妊娠維持に関して、サイトカインを用いてNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞をTh1 30

20

30

【0130】

1つまたは複数の上記サイトカインの存在下における増殖後に、T細胞の機能をIL-4、IL-10、GM-CSF、およびIFN- $\gamma$ の分泌に関して検討することができる。サイトカインの追加によるCD1d<sup>+</sup>(CIR、CD1d)、「NK」標的(JY、K562、721.221、およびYAC-1)、またはLAK標的に対する細胞側性の制 40

40

【0131】

または1つまたは複数のサイトカインを、エキソピボで増殖させたNK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞の再導入前、再導入中、再導入後にインピボで患者に投与して、再導入細胞をTh1応答、Th2応答、もしくは免疫偏向反応に偏向させることができる。

【0132】

実施例6：疾患の治療法または予防法で誘導されたインバリアントT細胞の数または活性の変化の決定

50

本発明のモノクローナル抗体を高感度で特異的な方法に用いて、疾患の治療法または予防法が、インバリアントT細胞の数を増加させるか、および/またはインバリアントT細胞に優先的に結合したり、その機能を調節するか否かの判定を行うことができる。これとは対照的に、インビボにおけるIL-12抗癌療法がインバリアントに及ぼす作用を決定する従来の分析法が、インバリアントT細胞の増加が検出されていないV<sub>11</sub>モノクローナル抗体を併用する場合(n=10)において、V<sub>24</sub>モノクローナル抗体を使用する比較的感度の低いフローサイトメトリー法で実施されている(図5)。正常なドナーにおけるインバリアントT細胞の数が少なく、また進行癌タンパク質でみられる数がさらに少ないことを考えれば、後述する方法を用いることで、IL-12療法、または他の治療法がインバリアントT細胞に及ぼす作用をより正確に決定することができる。累積用量がインバリアントT細胞に及ぼす作用は、このような分析を各投与後に行うことで決定することができる。

10

#### 【0133】

患者は、上記実験において自身の対照となることができる。約20 mlの末梢血を、治療開始前と治療中に患者から回収する。この細胞の少量のアリコート(約10<sup>6</sup>個の細胞)を用いてTCR-鎖をコードするmRNAに対応するcDNAを合成し、またV<sub>24</sub>プライマーおよびC<sub>β</sub>プライマーを用いてPCR増幅を行うことで、インバリアントTCR-鎖を発現する細胞の出現頻度を決定することができる。集団全体におけるインバリアントTCRの占める比率は、連続希釈したインバリアントT細胞クローンを対照T細胞クローンに較正することで決定することができる。

20

#### 【0134】

上記のPCR分析に代わる方法として、フローサイトメトリーを用いて、インバリアントT細胞の出現頻度および数を決定することができる。特に癌患者でみられる数は少ないので、条件の最小数および分析回数(100, 000回)の大きな数を各試料に使用する。標準的な方法でフルオレセインに良好に結合する抗CDR3ループモノクローナル抗体6B11、および/または3A6を簡単な1色または2色のFACS解析に使用することができる。また本発明の1つまたは複数のモノクローナル抗体、および他のインバリアントT細胞マーカー(V<sub>24</sub>、CD4、CD8、CD56、CD161、V<sub>11</sub>)に対する抗体を用いたインバリアントTCR-鎖の同時解析にはマルチカラーFACSを用いることができる。治療前後の患者試料を対象に得られた上記結果を比較することで、治療がインバリアントT細胞数に及ぼす作用の有無を決定することができる。サイトカインの産生および活性化細胞による細胞毒性は、実施例5に記載した手順で実施することができる。上記の結果をインバリアントT細胞の数に対して補正することで治療前後の患者を直接比較することができる。

30

#### 【0135】

または、定量に1回の増殖が必要な場合がある。患者の試料はモノクローナル抗体による増殖に直接使用することができるほか、増殖前に標準的な手順で高速FACS選別、または磁気ビーズを用いた免疫親和性精製を行うことで、試料をインバリアントT細胞に関して濃縮することができる。FACS選別による濃縮に関しては、抗V<sub>24</sub>、6B11、もしくは3A6を用いた1色選別、または6B11または3A6、および抗V<sub>24</sub>、V<sub>11</sub>、もしくはCD161を用いた2色選別を実施することができる。あるいは免疫親和性精製による濃縮では、1つまたは複数の負または正の選択を実施することができる。例えばネガティブディプリション(negative depletion)を用いて、単球および/またはB細胞を除去することができる。続いてV<sub>24</sub>モノクローナル抗体、および/または抗CDR3ループモノクローナル抗体を用いて正の選択を実施することができる。

40

#### 【0136】

このような細胞は、プレートに結合させた抗CDR3ループモノクローナル抗体(6B11もしくは3A6)、または可溶性の同抗体とともに培養することができるほか、抗原をパルスした自家APCまたは同種APCとともに培養することができる。T細胞の1回の

50

増殖は、初期の割合を広く表すが、このような細胞を増殖前に約1週間かけて培養することで、休止細胞と比べて増殖に対してほとんど反応しないように活性化細胞を休止状態にすることができる。

【0137】

初期刺激から約3~4週後に、細胞の一部をV<sub>24</sub>、V<sub>11</sub>、および6B11の各モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで解析し、インバリアントT細胞の占める比率を決定することができる。インバリアントT細胞数で補正したサイトカイン産生および細胞毒性は、治療前後の患者を対象に上述の通りに比較することができる。また初期刺激前の細胞を対象としたPCR分析またはFACS解析により、インバリアントT細胞の回収率(初期刺激後)の上昇が、エキソピボにおける刺激への反応の上昇に対する治療に起因する、インピボにおける増殖にどの程度影響するかを決定することができる。

10

【0138】

8~10人の患者(治療後の2つの時点の平均)を対象に実施されたこの分析では、治療がインバリアントT細胞の数を増加させることができるか、または同細胞の活性を調節可能か否かを適切に決定すべきである。インバリアントT細胞に対する正の作用が明らかにされれば、用量、スケジュール、および他の免疫機能にインバリアントT細胞の反応を相関させる調査を行うことができる。例えばインバリアントT細胞の数、および/または反応の変化は、血清IFN- $\gamma$ 、TNF、およびIL-15; IL-12ならびに他のサイトカインおよびケモカイン受容体の発現;ならびにT細胞、骨髄系および他の細胞マーカー(Fas、FasL、Lymphotoxin- $\alpha$ 、CD3、CD4、CD8、LFA-1、CD80、CD86、CD161)の変化を含む重要な免疫パラメータに相関する場合がある。

20

【0139】

インバリアントT細胞の数または活性の変化をみる上記の方法は、NK細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞にも適用することができる。このようなT細胞の定量に事前の濃縮段階が必要であれば、本発明の抗体を含むこのような細胞に結合する任意の抗体を初期精製段階に使用するか、または負の選択により、T細胞でない細胞、またはNK細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ $\alpha$ Q<sup>+</sup>T細胞でない細胞を除去することができる。

【0140】

実施例7:エキソピボで増殖させたインバリアントT細胞の増殖および哺乳類への再導入  
哺乳類の末梢血試料(20ml、または白血球除去療法の産物に由来)に由来するインバリアントT細胞を、エキソピボにおける増殖前に、既に挙げた実施例で説明した通りにFACS選別または免疫親和性精製で濃縮することができるほか、本発明の抗体を用いて直接増殖させることができる。実施例5で説明したように、このような細胞をサイトカインの存在下で増殖させることで、Th1応答、Th2応答、または免疫偏向反応に向かって偏向させることができる。またIL-2、IL-7、または分裂促進因子を添加して細胞増殖を促進することができる。必要であれば、おそらく2回目の濃縮段階後における2回目のエキソピボ増殖を、初期増殖に用いられる条件で実施して、細胞の数および純度の両方を上昇させることができる。刺激後に、このような細胞を対象に、純度ならびにサイトカイン産生および細胞毒性を上述の通りに調べることができる。複数回の刺激により、正常なドナーに由来する、長期のヒトインバリアントT細胞の系列およびクローンを確立可能であり、そのために同様の結果が他の患者で予測されることに留意する必要がある。望ましくは少なくとも10<sup>6</sup>個、より望ましくは少なくとも10<sup>8</sup>個、また最も望ましくは少なくとも10<sup>9</sup>個のインバリアントT細胞が増殖後に得られる。望ましくはインバリアントT細胞は、V<sub>24</sub>、V<sub>11</sub>、およびCD161といったインバリアントT細胞マーカーの存在に基づき、少なくとも60%、80%、または90%純粋であり、IFN $\gamma$ およびCD1d<sup>+</sup>および「NK」標的に対する細胞毒性の産生を維持している。

30

40

【0141】

2回目の刺激で適切な細胞数が得られない場合は、追加の刺激を行うことがある。あるいは

50

は大量の血液試料を用いることで、または白血球除去療法により最初の細胞数を増加させることができる。この場合、インバリアントT細胞の初回濃縮は、上述の通りにビーズに結合させたV<sub>24</sub>または6B11モノクローナル抗体を用いた正の選択で実施することができる。純度を高めるために、インバリアントT細胞を再注入する前にFACSまたはビーズに結合させた抗体を用いて精製することもできる。また増殖させたポリクローナルのインバリアントT細胞系の細胞再注入による治療上の可能性を、増殖させたインバリアントT細胞のクローン、またはそのプールと比較することができる。

#### 【0142】

エキソピボで増殖させたインバリアントT細胞の投与が、特定の投与様式、用量、もしくは投与の頻度に制限されることは意図されず、現行の様式は、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、宿主対移植片疾患、自然流産、妊娠、または癌の予防もしくは治療に適切な用量を十分もたらず筋肉内、静脈内、動脈内、病巣内、皮下、または他の任意の経路を含むすべての投与様式を対象とする。望ましくは、このような細胞は、血液試料を採取した哺乳類に再注入される。この細胞が異なる哺乳類に投与されることも意図される。このような細胞は、単回または複数回、哺乳類に投与することもできる。複数回の投与を行うときは、例えば1週～1か月に用量を分けることができる。実施例5で説明したように、1つまたは複数のサイトカインを、細胞の投与前、投与中、投与後に投与して、Th1応答、Th2応答、または免疫偏向反応に向かって偏向させることもできる。任意の特定の被験者については、特定の投与方法が、組成物の投与の施行もしくは管理を行う者の必要性および専門家の判断にしたがって時間的に調節されることが重要である。またT細胞を、適用に応じて休止細胞または活性化細胞として再注入することができる。休止細胞はインビボにおける活性化を必要とする場合がある。

#### 【0143】

実施例8：エキソピボで増殖させたNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞の増殖および哺乳類への再注入

他のNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞を、実施例7に説明された手順でエキソピボで増殖させることができる。この方法は、骨髄、肝臓、臍帯、または他の試料に由来するNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞を増殖させることで改変することができる。望ましくは試料は、末梢血と比べて多くの割合を占めるCD1d反応性非インバリアントT細胞を含む。また、(CD1d、脂質、他の抗原、もしくは抗体を用いる)共刺激、または共刺激の抑制を用いて所望のT細胞亜集団を増殖させることができる。例えばCD28の刺激は、インバリアントT細胞よりCD1d反応性非インバリアントT細胞の増殖に望ましい。CD161による刺激をブロックする可溶性の抗CD161抗体も、インバリアントT細胞と比べてCD161による刺激にそれほど依存しない非インバリアントT細胞の増殖に望ましい。プレートに結合させた抗体の量は、T細胞の増殖に対する共刺激への依存性を増大させるように減少させることもできる。

#### 【0144】

また、異なるサイトカイン、またはサイトカインの組み合わせを存在させることで、所望のT細胞亜集団の増殖に有利な条件とすることができる。例えばNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞の増殖中にIL-4、IL-7、またはIL-12とインキュベートすることができる。

#### 【0145】

増殖させたNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ<sub>Q</sub><sup>+</sup>T細胞は、実施例7に記載した手順で哺乳類に再注入することができる。

#### 【0146】

実施例9：癌患者におけるインバリアントNK T細胞数の減少

詳しく後述するように、前立腺癌患者では健康な患者と比べてインバリアントNK T細胞が少ない。したがって、インバリアントNK T細胞の数もしくは活性を上昇させる本

10

20

30

40

50

発明の抗体は、前立腺癌の予防、安定化、または治療する方法として使用することができる。またエキソピボで増殖させたインバリアントNK T細胞を被験者に投与して、前立腺癌を予防、安定化、または治療することができる。インバリアントNK T細胞は他の癌患者でも低レベルで存在する。したがって、この方法を用いて他の種類の癌を治療することができる。

#### 【0147】

本試験で分析された癌患者

本試験の対象癌患者は、アンドロゲン非依存性の進行性前立腺癌患者であった (Catalona, N. Engl. J. Med. 331:996, 1994; Bubley および Balk, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 10:713, 1996)。すべての患者は、過去に睾丸摘出術によるアンドロゲン除去療法、または黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニストの投与による治療を受けていた。試験時点において、すべての患者は骨髄スキンの結果が陽性で、前立腺特異抗原 (PSA) のレベルが高く ( $> 50 \text{ ng/ml}$ )、進行性の転移性癌を意味していた。1人を除く患者全員が細胞傷害性の化学療法を受けていなかった。寛解期にある前立腺癌患者は、アンドロゲン除去療法で同様に治療されたが骨スキンの結果は陰性で、PSA のレベルは安定かつ低値であった ( $< 10 \text{ ng/ml}$ )。 10

#### 【0148】

V 24 陽性T細胞のエキソピボにおける増殖に用いられる方法

試験参加に同意した健康なドナーおよび前立腺癌患者の末梢血 (10 ~ 20 ml) をヘパリンを含むチューブに採取した。PBMCはFicoll-Paque (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて単離した。V 24 陽性T細胞を抗V 24モノクローナル抗体 (C15) (Coulter, Miami, FL) で染色後に、ヤギ抗マウスIgG (H<sup>+</sup>L) FITC結合体 (KPL, Gaithersburg, MD) で染色し、高速FACS (Modular Flow FACS, Cytomation, Boulder, CO) で選別した (Dellabonara, J. Exp. Med. 180:1171, 1994)。自家PBMCに放射線を照射し (5000 rads)、APCとして使用した。FACSで精製したV 24<sup>+</sup>細胞を最初に96ウェル平底プレート (1ウェルあたり約20,000個) 内で、放射線を照射した同数の自家PBMCと、-GalCer (50 ng/ml, KRN7000, Kirin Brewery Co., Gunma, Japan)、および組換え型IL-2 (100 U/ml) (National Cancer Institute, Bethesda, MD) の存在下で共培養した。次に培養物を24ウェルプレート中に移して、同じ培地を用いて徐々に増殖させた。一部の培養物には、ヒト組換え型IL-12 (1 ng/ml) (Genetics Institute, Cambridge, MA) を培養の最終週に添加した。 20

#### 【0149】

増殖させたT細胞のフローサイトメトリ解析に用いられる方法

-GalCerで増殖させた細胞の表現型解析を、培養を開始してから3~4週後に2色または3色のフローサイトメトリで実施した。V 24およびV 11がバルクT細胞によって極めてまれにしか使用されないことから、過去の報告でV 24およびV 11に対する二重染色がインバリアントNK T細胞のマーカーとなることが明らかにされている (Dellabonara, J. Exp. Med. 180:1171, 1994; Exleyら, J. Exp. Med. 186:109, 1997; Prussin および Foster J. Immunol. 159:5862, 1997)。抗体は、抗V 24 PE抗体、抗V 11 FITC抗体、抗CD8 PE抗体 (Immuno tech)、抗CD3 Cychrome抗体、抗CD161 PE抗体、および抗CD4 Cychrome抗体 (PharMingen, La Jolla, CA) を使用した。文献に記載されているように (Exleyら, J. Exp. Med. 186:109, 1997; Exleyら, J. Exp. Med. 188:867, 1998)、約 40

1 × 10<sup>6</sup> 個の細胞を96ウェルプレートの1ウェルあたり50 μlのFACS緩衝液(リン酸緩衝液食塩水+1%ウシ胎児血清および0.1%NaN<sub>3</sub>)に懸濁した(Exleyら、J. Exp. Med. 186:109、1997; Exleyら、J. Exp. Med. 188:867、1998)。非特異的な抗体結合は、細胞を10%ヒト血清と共に15分間氷上でプレインキュベートすることでブロックした。次に抗体を細胞懸濁物に添加し、20分間氷上でインキュベートした。細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、FACSscan(Becton Dickinson)でCell Questソフトウェアを用いて分析を行った。

【0150】

健康なドナーおよび癌患者から単離直後のPBMCに含まれるインバリアントNK T細胞の分析でも、6B11モノクローナル抗体を使用した。この実験では、細胞を6B11-FITCおよび抗V24-PE(交差競合しない)で染色し、インバリアントTCRを発現するT細胞を検出した。癌患者ではこのような細胞の出現頻度は低いため、総細胞数10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>を分析した。

【0151】

癌患者におけるインバリアントNK T細胞数の減少を示す結果

健康なドナーおよび癌患者の末梢血に含まれるインバリアントNK T細胞を、インバリアントV24-JQTCRに対する、V24モノクローナル抗体およびV11モノクローナル抗体、または6B11モノクローナル抗体を用いた2色フローサイトメトリで定量した。健康なドナーのV24<sup>+</sup>T細胞を-GalCerで増殖させて得られたインバリアントNK T細胞系は、V24、V11、および6B11の各モノクローナル抗体に反応した(図19Aおよび19D)。V11が、この健康なドナー、また他の複数の健康なドナーに由来する、すべての-GalCer増殖V24<sup>+</sup>T細胞で本質的に発現されたという結果は、このVが-GalCer反応性インバリアントNK T細胞の作製に必要であったことも意味している。

【0152】

V24<sup>+</sup>V11<sup>+</sup>の二重陽性T細胞が健康なドナーの末梢血に認められた。その数はV24<sup>+</sup>6B11<sup>+</sup>細胞と同等であり、インバリアントT細胞NK T細胞であるV24<sup>+</sup>V11<sup>+</sup>細胞の大半の比率に一致していた(図19Bおよび19E)。一連の健康なドナーにおけるV24<sup>+</sup>6B11<sup>+</sup>細胞の平均比率は0.11%であった。少数のV24<sup>+</sup>V11<sup>+</sup>T細胞が、進行性前立腺癌患者の末梢血中に認められた(表4および5)。また調査対象の6人中5人の患者にはV24<sup>+</sup>6B11<sup>+</sup>細胞は検出されなかった(図19Cおよび19F)。以上の結果から、インバリアントNK T細胞が進行性前立腺癌の患者では少ないことが判明した。

【0153】

【表4】6B11抗体および抗V24抗体による染色に基づく、PBMCに含まれるインバリアントNK T細胞の数

ドナー		Va24 <sup>+</sup> 6B11 <sup>+</sup> (インバリアント)
健常者 (n=3)	平均	41 x 10 <sup>5</sup>
	範囲	14 x 10 <sup>5</sup> から90 x 10 <sup>5</sup>
前立腺癌患者 (n=7)	平均	4 x 10 <sup>5</sup>
	範囲	0から20 x 10 <sup>5</sup>

【0154】

【表5】V<sub>24</sub>抗体、および抗V<sub>11</sub>または6B11抗体による染色に基づく、インバリアントT細胞であるV<sub>24</sub><sup>+</sup>細胞の割合(%)

ドナー		<u>Va24<sup>+</sup> Vb11<sup>+</sup></u>	<u>Va24<sup>+</sup> 6B11<sup>+</sup>(インバリアント)</u>
		Va24 <sup>+</sup>	Va24 <sup>+</sup>
健康者	平均(範囲)	4.8% (2-7%)	4.3% (1.4-6.5%)
n=3			
前立腺癌患者	平均(範囲)	2.3% (0-8.0%)	0.4% (0-2.3%)
n=6			

10

## 【0155】

健康なドナーに由来するインバリアントNK<sup>+</sup>T細胞の増殖の結果

末梢血に含まれるインバリアントNK<sup>+</sup>T細胞の数は少ないため、1回のエキソピボにおける増殖を行って、細胞の出現頻度および機能の評価をさらに行った。健康なドナーおよび進行性前立腺癌患者に由来するインバリアントNK<sup>+</sup>T細胞を、V<sub>24</sub>に特異的なモノクローナル抗体を用いた初期FACS精製と、それに続く、APCの供給源としての-GalCerおよび放射線を照射した自家PBMCを用いた3~4週間に及ぶインビトロにおける選択的増殖によって末梢血から単離した。次にT細胞をV<sub>24</sub>およびV<sub>11</sub>または6B11の各モノクローナル抗体による二重染色で分析した。

20

## 【0156】

FACSで精製したV<sub>24</sub><sup>+</sup>T細胞を、T細胞分裂促進因子PHAによってインビトロで刺激したところ、異なるドナーでは数が変化するV<sub>24</sub><sup>+</sup>V<sub>11</sub><sup>+</sup>T細胞の小集団のみが得られた(図20A)。これとは対照的に、健康なドナーに由来する精製されたV<sub>24</sub><sup>+</sup>T細胞を-GalCerおよび放射線を照射した自家PBMCで刺激したところ、V<sub>24</sub><sup>+</sup>V<sub>11</sub><sup>+</sup>の大集団が得られた(図20B、全細胞の94.4%)。一連の健康なドナーに由来する、-GalCerで増殖させたV<sub>24</sub><sup>+</sup>V<sub>11</sub><sup>+</sup>T細胞の追加的な表現型分析で、主要なCD4<sup>+</sup>集団およびCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>集団の存在が明らかになり、各ドナーの大多数(>70%)でCD161が発現されていることが判明した。

30

## 【0157】

健康なドナーに由来する、-GalCerで増殖させたV<sub>24</sub><sup>+</sup>V<sub>11</sub><sup>+</sup>T細胞の評価を、CD1d認識およびサイトカイン産生を対象に行った。CD1d反応性インバリアントNK<sup>+</sup>T細胞である多くの細胞と一致して、このような細胞は、CD1dをトランスフェクトしたC1R細胞に反応して実質的な量のIL-4とIFN- $\gamma$ の両方を産生したが、疑似トランスフェクトしたC1R細胞では産生は認められなかった(図20C)。この認識にCD1d特異性があることは、抗CD1dモノクローナル抗体51.1によってブロックされるが、対照の抗体に対応するアイソタイプではブロックされないことによってさらに証明されている。CD1dに対するサイトカイン応答は、これらのT細胞のPHAによるポリクローナル刺激後に得られた応答と等価であり、大部分の細胞が実際にCD1d反応性T細胞であることが確認された。以上の応答はいずれも、健康なドナーに由来するインバリアントNK<sup>+</sup>T細胞クローンについて過去に得られた結果(Exleyら、J. Exp. Med. 186:109, 1997; Exleyら、J. Exp. Med. 188:867, 1998)と同等であり、後者のインビトロで確立されたクローンが、インピボにおける細胞の機能状態を反映していることを示している。

40

## 【0158】

50

進行性前立腺癌患者に由来するインバリアントNK T細胞の増殖の低下

進行性のアンドロゲン非依存性の前立腺癌患者に由来するインバリアントNK T細胞を同様に調べた。健康なドナーに対して、アンドロゲンを除去した進行性のホルモン不応性前立腺癌の患者から回収された培養細胞の総数は減少しており、またV<sub>24</sub><sup>+</sup>V<sub>11</sub><sup>+</sup>インバリアントNK T細胞であった増殖細胞の比率に顕著な低下が認められた(図21Aおよび21B)。健康なドナーとアンドロゲンを除去したホルモン不応性前立腺癌患者の各インバリアントNK T細胞は98.5%と13.6%)。-GalCerが、アンドロゲン除去療法を受けた寛解期にある前立腺癌患者のV<sub>24</sub><sup>+</sup>T細胞を増殖させたことも示され(インバリアントNK T細胞の比率は75%)、アンドロゲン除去療法が、インバリアントNK T細胞の増殖の低下を説明しないことが判明した(図21C)。

10

#### 【0159】

いずれも転移性癌で、前立腺特異抗原(PSA)のレベルが高い進行性のアンドロゲン非依存性前立腺癌の一連の患者から得られたデータから、V<sub>24</sub><sup>+</sup>V<sub>11</sub><sup>+</sup>インバリアントNK T細胞の回復が顕著に低下したことが確認された(平均値は前立腺癌患者の10%に対し、健康なドナーでは>80%) (図21D)。以上の結果は、進行性前立腺癌患者の末梢血のV<sub>24</sub>およびV<sub>11</sub>または6B11染色で検出されるインバリアントNK T細胞数が減少することと矛盾していなかった。インビトロ刺激中における増殖の低下またはアポトーシスの増加を含む他の因子も回収率の低さに寄与する可能性があった。これとは対照的に、アンドロゲン除去療法を受けているが寛解期にある前立腺癌患者に由来するV<sub>24</sub><sup>+</sup>V<sub>11</sub><sup>+</sup>インバリアントNK T細胞の回収率は、健康なドナーで得られた値に近い値であった(図21D)。

20

#### 【0160】

実施例10：癌患者におけるインバリアントNK T細胞の活性の低下

低レベルで存在することに加えて、前立腺癌患者におけるインバリアントNK T細胞の活性は低かった。特にこのようなインバリアントNK T細胞は、IFN- $\gamma$ をわずかにしか産生しなかった(Th1エフェクター)。後述するように、IL-12とインキュベートすると、このようなインバリアントNK T細胞の活性は上昇してIFN- $\gamma$ を産生した。この結果は、IL-12が癌の治療に望ましい細胞傷害活性などのTh1応答方向へと、インバリアントNK T細胞を偏向させる能力をもつことを支持する。

#### 【0161】

サイトカイン産生およびCD1d反応性の測定に使用される方法

サイトカイン産生に関しては、文献に記載されているように、96ウェルプレートに $1 \times 10^5$ 個/ウェルの細胞を同数のCD1dと共培養するか、C1R細胞を、10% FBS、20 U/ml IL-2、および1 ng/ml PMAを添加したRPMI 1640培地中で疑似トランスフェクトした(Exleyら、J. Exp. Med. 186:109、1997)。CD1dに対する細胞応答は、抗CD1d抗体51.1(10  $\mu$ g/ml)でブロックされた(Exleyら、J. Exp. Med. 186:109、1997; Exleyら、Immunology 100:37、2000)。上清は、IL-4の測定用およびIFN- $\gamma$ の測定用にそれぞれ48時間と72時間の時点で採取した。放出されたサイトカインの濃度は、サイトカイン標準に適合させた抗体ペアとの捕捉的ELISAにより3回にわたって決定した(Endogen, Inc. Cambridge, MA)。IFN- $\gamma$ およびIL-4の両方に対する以上のアッセイ法の検出限界は10~50 pg/mlであった。

30

40

#### 【0162】

癌患者に由来するインバリアントNK T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生の喪失を示す結果  
前立腺癌患者に由来するインバリアントNK T細胞が増殖し、また同等のレベルのIL-4を、健康なドナーに由来するインバリアントNK T細胞として、CD1dをトランスフェクトした細胞に応じて産生した(図22A)。しかしIFN- $\gamma$ の産生は、健康なドナーに由来するインバリアントNK T細胞に比べて顕著に低下していた(図22B)。一連の進行性前立腺癌患者および健康なドナーに由来する、-GalCerで増殖さ

50

せたインバリアントNK T細胞によるIFN- $\gamma$ の産生に対するIL-4を分析した結果、前立腺癌患者に由来する細胞によるIFN- $\gamma$ 産生が顕著に減少することが確認された(図22C、IFN- $\gamma$ については対数スケールを使用)。IL-4に対するIFN- $\gamma$ の喪失は、IFN- $\gamma$ /IL-4産生比を比較したときに最も明らかであり、前立腺癌と健康なドナーに由来するNK T細胞系間の差は約50倍であった(図22E)。

#### 【0163】

IFN- $\gamma$ 産生の以上のような喪失が他のT細胞集団で一般的にみられるか否かを決定するために、進行性のアンドロゲン非依存性の前立腺癌患者、および健康なドナーに由来するバルク末梢血のT細胞をインビトロでPHAで刺激した。その結果、前立腺癌患者に由来するバルクT細胞によるIFN- $\gamma$ の生産は損なわれておらず(図22D)、前立腺癌患者と健康なドナーの細胞でIFN- $\gamma$ /IL-4比は同等であった(図22E)。以上をまとめると、得られたデータから、進行性の前立腺癌患者に由来するインバリアントNK T細胞集団においてIFN- $\gamma$ 生産が優先的に失われることが判明した。

10

#### 【0164】

インバリアントNK T細胞は、IL-12の抗腫瘍効果に寄与することがあるので、次に、このような癌患者に由来する細胞がIL-12に反応するか否かを判定した。前立腺癌患者に由来するインバリアントNK T細胞を、培養の最終週にIL-12(1 ng/ml)で処理して、このサイトカインに反応するか否かを判定した。IL-12で処理した細胞では、IFN- $\gamma$ 産生の顕著な上昇が認められ、IFN- $\gamma$ /IL-4産生比は健康なドナーにおける比と同等であった(図22E、癌+IL-12)。

20

#### 【0165】

##### 実施例11：多発性硬化症患者におけるNK T細胞のレベルの低下

多発性硬化症(MS)は、中枢神経系(CNS)の炎症性脱髄疾患であり、自己ミエリン関連抗原に対する自己免疫応答が関与する可能性が高い。MS患者のNK T細胞が少ないか否かを判定するために、一次性進行型疾患のMS患者(6人)、または再発寛解型疾患のMS患者(8人)の末梢血試料に含まれるNK T細胞(V $\alpha$ 24J $\beta$ Q $^+$ )の割合(%)を正常なドナー(6人)と比較した。正常なドナーのNK T細胞の割合(%)は、過去の報告(0.114 $\pm$ 0.020)と同等であったが、一次性進行型疾患のMS患者のNK T細胞の割合(%)は(0.010 $\pm$ 0.007)であるか、または再発寛解型疾患のNK T細胞の割合(%) (0.027 $\pm$ 0.071)は有意に低値であった。

MS患者のNK T細胞数が少ないことは、NK T細胞の数および/または活性の上昇が、再発寛解型のMS、一次性進行型のMS、または慢性進行型のMSなどのMSの治療または予防に有用な可能性があることを示唆している。またMS患者の試料を、さまざまな時点で採取することで、上記MS患者の末梢に含まれるNK T細胞の数が経時的に変動するか否か、また疾患症状の状態と相関するか否かを判定することができる。

30

#### 【0166】

##### 実施例12：臨床コホートを調べる診断ツールとしての6B11の用途

CD1d拘束T細胞は、複数の免疫疾患に免疫調節的な役割を果たす可能性がある。高リスクの前記糖尿病およびHIV感染患者の臨床状況をモニタリングする6B11抗体の診断上の有用性を検討するために、V $\alpha$ 24-PE抗体を併用した6B11-FITC抗体を用いて、診断日における糖尿病患者の循環性CD1d拘束T細胞、またUCCLAメディカルセンターで追跡されたHIV MACSコホートの循環性CD1d拘束T細胞の出現頻度を決定した。上述の通りにPBLを染色し、FACSで解析した。また樹状細胞(DC)のサブタイプをHIV MACSコホートを対象に決定した。得られた結果を図23および24にまとめる。

40

#### 【0167】

##### 実施例13：1型糖尿病の有無が一致しない一卵性双生児に由来するインバリアントT細胞における遺伝子発現

特にT細胞型で活性化される遺伝子のパターンを同定できれば、T細胞亜集団の機能を予測する情報が得られると思われる。例えばサイトカイン/ケモカインファミリーにおける

50

遺伝子発現パターンの変化は、サイトカインの分泌とインビボにおけるT細胞の機能が関連する場合に特に重要である。後述するように、このような細胞が自己免疫および1型糖尿病に果たす役割を詳しく理解するためにV<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞の遺伝子発現パターンを決定した。この方法で、関心対象の他の任意のT細胞亜集団が、任意の疾患または症状の発生および/または進行に果たす役割を決定することもできる。

【0168】

ヒトV<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞クローンにおけるT細胞受容体の活性化の転写の結果を調べるために、DNAマイクロアレイにより、1型糖尿病とIL-4の分泌が一致しない一卵性双生児に由来するクローンの抗CD3刺激によるmRNA量の変化の定量が行われた(Wilsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(13): 7411~7416、2000)。活性化により、IL-4分泌クローンにおける226個の転写物、およびIL-4ヌルクローンにおける86個の転写物が有意に調節された。これらの遺伝子の28個のみが共通であった。認められた差から、糖尿病患者のV<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞の分化、ならびに骨髄系細胞の動員および活性化においてインバリアントT細胞が果たす役割がいずれも有効でないことが示唆された。

【0169】

IL-4分泌の欠損は、複数の差異の結果である可能性が高いので、代表的なクローンの対を選択して、約6800個の遺伝子(Unigene collection)の発現をモニタリングするDNAマイクロアレイを用いて詳細な解析を行った。このDNAマイクロアレイは、遺伝子発現における複雑な差を調べる大規模研究に対する実用的で再現性の大きい方法である(Lockhartら、Nature Biotechnology 14、1675~1680、1996; Holsteggeら、Science 283、83~87、1999; Choら、Molecular Cell 2、65~73、1998)。発現プロファイルは、抗CD3または対照のIgGを用いた4時間の刺激によって決定した。この時間点を選択された理由は、この時間点が、1型糖尿病の有無が一致しない一卵性双生児の対に由来するクローンにおけるサイトカイン分泌を対象とした過去の分析で使用されていたためである。刺激前または刺激後の発現が検出可能な遺伝子の数は、IL-4ヌルクローンとIL-4分泌クローンでほぼ同じであった(それぞれ1523個と1558個)。予想された通り、大部分の転写物の頻度に変化は認められなかった。このセットの3分の2のみ(988個)が2個のクローンで共通であった。抗CD3刺激後における発現が、刺激されなかった場合に対して少なくとも2倍上昇または低下することが明らかとなった遺伝子の数は、IL-4ヌルクローンで86個(6%)、またIL-4<sup>+</sup>分泌クローンで226個(15%)であった。IL-4ヌルクローンとIL-4分泌クローン間の遺伝子発現の差をより詳しく分析するために、自己組織化マップ(Self-Organizing Map)アルゴリズムを用いて遺伝子群を6つの異なる発現パターンに分類されている(Tamayoraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96、2907~2912、1999)。

【0170】

DNAマイクロアレイを調べたところ、抗CD3によるV<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞クローンの活性化によって、サイトカイン/ケモカインファミリーの転写物に有意な変化が生じた。このカテゴリーに含まれる遺伝子の発現にみられる顕著な差は、IL-4<sup>+</sup>クローンとIL-4<sup>-</sup>ヌルクローンの比較時に認められた(図25A)。MIP-1<sup>α</sup>、MIP-1<sup>β</sup>、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IL-5、IL-13、およびGM-CSFにみられる転写上の変化は、それぞれELISAによりタンパク質レベルで検証されている。疾患の有無について対称性がみられない双子に由来するクローンを比較すると、IL-4分泌クローンに一般的にみられる変化を含む、IL-4<sup>-</sup>ヌルクローンにおける複数の転写物に確固とした変化が認められた。また計1523個の転写物が有意なレベルで認められ、このうち535個はIL-4ヌルクローンに固有のものであった。また上記クローン対は、抗CD3に反応して同等量のIFN- $\gamma$ を分泌した。CD161<sup>+</sup>V<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞のエフェクター機能のかなりの部分がサイトカイン分泌を介して生じると仮定すると、I

10

20

30

40

50

IL-4ヌルクローンは、分化した機能のすべての範囲と結びつかないであろうということは重要である。最近になって、サイトカインの活性化に反応する能力と、それに続くサイトカインを分泌する能力の両方がNODマウスのNK T細胞でも損なわれていることが認められた (Falcone, J. of Experimental Medicine 190, 963~972, 1999)。また、このようなサイトカイン/ケモカインの組み合わせは、CD161<sup>+</sup> T細胞が未成熟な樹状細胞および単球を動員して調節している可能性があることを示唆している。

#### 【0171】

IL-4<sup>+</sup>クローンとIL-4ヌルクローン比較すると、BCLxL、IAP、PLC1、およびtecファミリーキナーゼItkなどのPI3キナーゼ情報伝達を介して部分的に活性化される細胞生存、サイトカイン分泌、およびカルシウム流入に重要な他の遺伝子の発現に有意な差が認められた。このような転写物はIL-4<sup>+</sup>クローンに有意に多量に見出された。差は、サイトカイン分泌およびTh表現型に影響する転写因子および情報伝達調節因子をコードするmRNAの発現にも認められた。これにはGATA3、STAT1、STAT4、JunB、JunD、およびNFAT4などがある。特にJunBおよびGATA3は、Th2 T細胞で優先的に発現されることが最近報告された。GATA3、JunB、ならびにJunDの転写活性化はIL-4<sup>+</sup>クローンで優先的に認められた。STAT1 (IFN-情報伝達)、STAT4 (IL-12情報伝達)、およびCD161 (V24J Q T細胞の増殖およびIFN-の分泌の補助活性化因子)の転写物は、IL-4<sup>+</sup>クローンに対してIL-4ヌルクローンで過剰に発現していた。重要な点は、部分的にIL-4の転写のサブレッサーとして作用すると考えられる転写因子NFAT4が、IL-4<sup>+</sup>クローンに対してIL-4ヌルクローンで過剰に発現していることであった。この概念を基に、転写因子などの他の遺伝子の調節の不一致が、Th表現型の制御に影響することが予想される。発現が複数の独立した生物学的観察に一致する、調節を受ける遺伝子のモデルを図25Bに示す。

#### 【0172】

活性化されたV24J Q T細胞クローンの転写プロファイルから、(糖尿病でない一卵性双生児と比べて)糖尿病患者に由来するクローンにみられるIL-4分泌の欠損が、遺伝子発現にみられる多数の差異の一つであることが判明した。活性化がPI3キナーゼで部分的に制御される遺伝子産物の発現に差がみられたことは重要であり、これが、完全に分化したV24J Q T細胞の産生に必要であると考えられる。

#### 【0173】

実施例14：骨髄系樹状細胞上のCD1dは、V24J Q T細胞のサイトカイン分泌を刺激し、同細胞の細胞溶解活性を促進する

DCは、T細胞応答の開始に重要な役割を果たす抗原提示細胞に由来する骨髄の特定の集団である。ヒトでは、3個のDC集団が極めて低出現頻度(0.03~0.3%)で末梢血中に見出されている。ヒトのDCには2つの骨髄系集団がある。一つはランゲルハンス細胞前駆体(Lin<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>/CD1a<sup>+</sup>/IL-3R<sup>-</sup>)および組織DC(Lin<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>/CD1a<sup>-</sup>/IL-3R<sup>-</sup>)であり、もうひとつは「形質細胞様」DC(PDC)集団(Lin<sup>-</sup>/CD11c<sup>-</sup>/CD1a<sup>-</sup>/IL-3R<sup>+</sup>)である。PDC集団も、高内皮細静脈への回帰およびリンパ組織への移動を促進するCXCR3およびCD62Lを発現する。PDCはCD40の連結を介して、またはLPSに曝露されることでリンパ系で活性化され、さまざまなサイトカインを産生し、またT細胞の刺激能力を増強する。MDCはそれぞれ表皮または真皮、および他の組織部位のいずれかを占める。MDCは未成熟な状態にある末梢組織に存在し、抗原を容易に取り込む。そしてそれまでの間、感染または組織の損傷によってもたらされる情報を受ける。この時点で、活性化されて排出性リンパ節に移動し、同リンパ節でIL-12p70などのサイトカインを容易に産生し、未感作T細胞を活性化する。MDC集団とPDC集団には、Th1応答およびTh2応答の発生の誘導に関して異なる役割があることが最近の研究で支持されている。マウスおよびヒトを対象とした研究では、MDCの成熟および機能の欠損が、1型

糖尿病の病因に影響する可能性があることも示唆されている。

【0174】

骨髄系樹状細胞がTh1細胞性免疫応答のプライミングにおいて重要な役割を果たしていることから、V24JQT細胞が、その免疫調節性の作用をこれらの細胞との相互作用を介して発揮している可能性がある。この仮説を検証するために、インビボおよびインビトロでDC上におけるCD1dの発現パターンを調べ、またV24JQT細胞クローンとDC細胞との相互作用の帰結を調べた。

【0175】

本研究に使用したV24JQT細胞クローン

V24JQT細胞クローンの由来については文献に記載されている(Wilsonら、Nature 391:177、1998)。簡単に説明すると、正常なドナーの末梢血単核球(PBMC)を、V24/V11二重陽性細胞について単細胞選別し、次に10%熱不活性化ウシ胎児血清、2mML-グルタミン、10mMHEPES、100U/mlペニシリン、および10μg/mlストレプトマイシン(R10)を含むRPMI1640(Sigma)中で、放射線を照射したフィーダーPBMC(50,000細胞/ウェル)、放射線を照射した721.221リンパ芽球細胞(500細胞/ウェル)、PHA-P(1μg/ml)、IL-2(10U/ml)、およびIL-7(10U/ml)とともに成長させた。次に、結果として得られたクローンを、放射線を照射したフィーダーPBMCおよび抗CD3抗体の存在下で、抗CD3抗体によって定期的に再刺激して増殖させた。クローンがV24およびNKRP1Aに関して陽性であることをフローサイトメトリーで確認し、配列を決定してV24JQCDR3TCRを有することを確認した。

【0176】

T細胞の転写プロファイリングに使用した方法

V24JQT細胞クローンの転写解析を、アフィメトリックス(Affymetrix)社が開発した高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて実施した。簡単に説明すると、細胞を10μg/mlの可溶性の抗CD3または対照となるIgGで4時間かけて活性化し、その後全RNAを単離して逆転写した。結果として得られたcDNAを、ピオチン化ヌクレオチドとともにインビトロ転写に用いて、標識されたアンチセンスRNAを作製し、DNAマイクロアレイチップ(Genechips 商標、Affymetrix、San Jose、CA)との間でハイブリッドを形成させた。PE-ストレプトアビジンで染色後、結合しているRNAの蛍光をGenechip Reader(改変型の共焦点顕微鏡)で定量した。

【0177】

サイトカイン分泌および増殖のアッセイ法

V24JQT細胞クローンを、プレートに結合している抗CD3抗体または対照となるアイソタイプ抗体と4時間、8時間、または24時間刺激した(25,000/ウェル)。上清を回収し、定量ELISA(Quantikine kits、R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)でIL-4、IFN-、マクロファージ炎症性タンパク質-1-(MIP-1-)、MIP-1-、TNF-、およびGM-CSFを定量した。24時間後に、1μCi/ウェルとなるように[<sup>3</sup>H-]チミジン(Dupont NEN、Boston、MA)を添加し、取り込みを文献の方法で測定した(Wilsonら、Nature 391:177、1998)。制限実験も、トランスフェクトしたC1R細胞中のCD1のアイソフォーム(CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、およびpSR-neoベクターのみ)を用いて文献の方法で行った(Wilsonら、Nature 391:177、1998; Exleyら、The Journal of Experimental Medicine 186:1、1997)。

【0178】

骨髄系樹状細胞の調製

単球に由来する樹状細胞を、新鮮なPBM Cから文献の方法(O'Dohertyら、Journal of Experimental Medicine 178:1067、1993)を応用して調製し、抗CD14微粒子による濃縮で正の選択を製造業者のプロトコルにしたがって実施した(ミルテニ・バイオテック、Auburn、CA、USA)。簡単に説明すると、同系のドナーから調製した単離直後のPBM Cを、吸着および洗浄操作により単球について濃縮した。洗浄直後に、残りの単球を組換え型ヒトIL-4(rhIL-4; Genzyme)およびrhGM-CSF(1000 U/ml)を添加したR10中でそれぞれさらに7日間培養し、少なくとも90%のCD14<sup>+</sup>/DR<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup>の非接着性の細胞集団をフローサイトメトリー解析で得た。

【0179】

10

#### 細胞溶解アッセイ法

V24JQT細胞クローンによる細胞溶解活性を、<sup>51</sup>Crの特異的な放出を4時間かけて測定することで決定した。標的細胞を50 μCiのNa<sub>2</sub><sup>51</sup>Cr(New England Nuclear、North Billerica MA)で1時間かけて標識し、洗浄を2回行った。細胞溶解活性は、1ウェルあたり10<sup>4</sup>個の標識された標的細胞を含むU底96ウェルマイクロタイタープレート中で標準的なクロム遊離アッセイ法で決定した(エフェクター細胞の比は記載値を使用)。37℃で4時間インキュベートした後に上清を回収し、カウンター(Cobra、Packard、Downer's Grove IL)で計数した。特異的な溶解の割合(%)を以下の式で算出した: [(実験放出分 - 自然放出分) / (最大放出 - 自然放出)] × 100。実験によっては、細胞溶解の検証を、EGTAおよびMgCl<sub>2</sub>の存在下(各4 mM)でカルシウムキレート条件下で行った。

20

【0180】

#### 本研究に使用した抗体

42.1抗CD1dモノクローナル抗体は、スティーブン・ポージェリ(Steven Porcelli)博士(Brigham & Women's Hospital)より供与を受けた。42.1およびIgG1対照抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片は、ImmunoPure F(ab')<sub>2</sub>キット(Pierce、Rockford、IL)で調製した。ヒト吸着(human adsorbed)ヤギF(ab')<sub>2</sub>抗マウスIgG-FITCは、カルタグ(Caltag)(Burlingham、CA、USA)から入手した。FcR-ブロッキング試薬(商標)のヒトIgGは、ミルテニ・バイオテック(Miltenyi Biotec)(Auburn、CA、USA)から入手した。NOR3.2は、バイオソース・インターナショナル(Biosource International)(Camarillo、CA、USA)から入手した。抗V24、抗V11、抗TCR、および抗CD83は、イムノテック(Immunotech)(Coulter/Beckman、Fullerton、CA、USA)から入手した。抗CD14、抗CD4、抗CD8、抗CD40L、抗CD80、抗CD86、およびHLA-DRは、ファーマンゲン(Pharmingen)(San Diego、CA、USA)から入手した。抗CD3、クローンUCHT1は、アンセル(Ancell)(Bayport、MN、USA)から、またIgG1対照はSigma(St. Louis、MO)から入手した。

30

40

【0181】

#### フローサイトメトリーの方法

染色した細胞は、FACScan細胞計数器(Becton Dickinson、Franklin Lakes、USA)を用いて解析し、単細胞選別は、MoFlo細胞計数器(Cytomation、Fort Collins、NJ、USA)を用いて実施した。CD40LのCD1dの発現については、T細胞クローンを文献の方法にしたがってPMAおよびイオノマイシンで活性化した(Wilsonら、Nature 391:177、1998; Exleyら、Journal of Biological Chemistry 269:15140、1994)。

50

## 【0182】

CD1dのウェスタンブロット分析

$5 \times 10^5$  個のC1R/CD1d細胞、 $4 \times 10^7$  個の樹状細胞、および $4 \times 10^7$  個の対照C1R/neo細胞の溶解液に由来するCD1dの免疫沈殿を、モノクローナル抗体42.1に結合させたタンパク質Aビーズを用いて調製した。この免疫沈殿をSDS-PAGE (5%~15%)で分離し、親和性精製したウサギ抗CD1dポリクローナル抗体をプローブを用いて選び出した(Exleyら、Journal of Experimental Medicine 188:867、1998)。バンドは化学発光を基に視覚化した。

## 【0183】

免疫化学的な方法

NOR3.2モノクローナル抗体を用いて、固定化してパラフィンに包埋した組織中のCD1d発現を、免疫ペルオキシダーゼ染色(Vectastain ABCエリートキット、視覚化にはNovaRed、Vector Laboratories、Burlingame、CAを使用)で決定した。染色は、NOR3.2を1:100の希釈率で用いて製造業者の指示書にしたがって行った。シグナルの特異性は、GST-CD1d融合タンパク質を用いたブロッキング実験で、GSTタンパク質単独の場合と比較することで確認した。

## 【0184】

抗CD3治療によるCD1d拘束V24JQT細胞の活性化を示す結果

V24JQT細胞の転写プロファイルの詳細な分析を、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて実施した。正常なドナーに由来するクローンが活性化すると、骨髄系樹状細胞の動員および分化に重要であると考えられている数多くのエフェクター分子が発現した(図26Aおよび26B)。調べた16個のケモカインのうち4個が、MIP-1およびMIP-1を含んでおり、マクロファージおよび未成熟な樹状細胞をインビボで動員すると考えられる。GM-CSF、IL-4、およびTNF- $\alpha$ 、骨髄系樹状細胞の分化および成熟、および後の成熟にかかわるサイトカインも産生された。活性化により、検討した26個のうち8個のサイトカインの発現も誘導された。これらのサイトカイン、ならびにCD40リガンドおよび4-1BBは、調べた個々のV24JQT細胞クローンによって産生された(図26A~26D、27A、および27B)。また、活性化されたV24JQT細胞は、典型的な細胞傷害性T細胞に通常関与するタンパク質であるパーフォリンおよびグランザイムBを高レベルで発現した。したがって、この免疫調節機能はサイトカインの放出に制限されないが、細胞溶解活性にもかかわると考えられる。

## 【0185】

標的細胞上におけるCD1dの発現によるV24JQT細胞のサイトカイン分泌および細胞溶解活性の両方の活性化

完全に自家系のV24JQT細胞とDCの相互作用を調べるために、新しい一連のクローンを調製した。このようなクローンを、さまざまなCD1分子をトランスフェクトしたリンパ芽球C1R細胞のパネルに対するCD1d-特異的な反応に関して検討した。IL-4およびIFN- $\gamma$ に関して示されたサイトカインの放出、ならびにこれらのクローンの増殖は、CD1dで特異的に制限された(図27A)。活性化の誘導はCD1dではみられたが、CD1a、CD1b、またはCD1cではみられず、これは過去に報告された結果と一致した。またV24JQT細胞クローンは、他のCD1ファミリーの分子ではなくCD1dを発現するC1R細胞を特異的に溶解することが判明した(図27B)。したがってインバリアントTCRのCD1d-制限性の誘導は、サイトカインの分泌、およびMHCクラスIおよびペプチドエピトープで誘導される細胞傷害性T細胞に関して観察される状況に似た状況である、同時に生じる細胞溶解反応を活性化する。

## 【0186】

CD1dは骨髄系樹状細胞で発現される

V 24J QT細胞クローンによって産生されるサイトカインと細胞溶解タンパク質の組み合わせから、過去に提案されているようにIL-4分泌による、単純なTh2プライミング以外のエフェクターとしての役割の存在が示唆されている。以上の結果を考えれば、V 24J QT細胞による免疫調節には、Th1様応答の誘導に重要な骨髄系樹状細胞との相互作用が関与する可能性がある。未成熟な樹状細胞は、IL-4およびGM-CSFによってインビトロで分化させた末梢血単球に由来し、後に単球の培養上清で成熟させた(O'Dohertyら、Journal of Experimental Medicine 178:1067、1993)。末梢血単球は、インビトロの培養物中で速やかに失われる低レベルのCD1dを発現することが知られている。末梢単球に由来する成熟した骨髄系樹状細胞(DC1)の分析から、細胞表面におけるCD1dの発現が再び獲得されることが判明した(図28Aおよび28B)。また、活性化されたBリンパ球およびTリンパ球はCD1dを発現しなかった。免疫組織化学的分析では、CD1dがインビボにおいて、リンパ節の傍皮質T細胞領域にある樹状細胞上に優先的に発現されることが確認された(図28C~28P)。一連の切片を免疫的に染色したところ、CD1aおよびS100も発現している樹状細胞上でCD1dが発現されていることが確認された。CD1dは、濾胞性樹状細胞、または濾胞刺痛体(follicle tingl e body)マクロファージでは発現されないことが既に判明しており、またリンパ洞の組織球にはほとんどみられなかった(CD1dの発現はT細胞依存性のリンパ領域を標的としていた)。他の状態の反応性リンパ節の他の組織球/単球集団の過程を調べたところ、結核菌(M. tuberculosis)感染の乾酪性肉芽腫と、他の非マイコバクテリア性肉芽腫の両方で類上皮細胞の組織球上に顕著なCD1d染色が認められた。マウスのV 14J 281 T細胞は、結核菌の脂質抽出物による感作後の肉芽腫形成に必要なことが明らかとなっている。また樹状細胞に極めて似ていて、その新生カウンターパートと目される複数の腫瘍、例えばランゲルハンス細胞組織球増加症および組み合った樹状細胞の腫瘍も構成的にCD1dを発現する。したがってインビトロおよびインビボの両方において樹状細胞上でCD1dが発現されていることは、これがV 24J QT細胞の生理的標的である可能性を示唆する。

#### 【0187】

V 24J QT細胞による骨髄系樹状細胞のCD1d拘束性溶解

V 24J QT細胞がもつ、樹状細胞との相互作用能力は、MHCハプロタイプが異なる複数の健康なドナーに由来するDCの細胞溶解に対する、複数のV 24J QT細胞クローンを検討することで確認された(図29Aおよび29B)。同種樹状細胞も自家樹状細胞も、このクローンにより溶解したことから、死滅がMHC拘束性でもアロ反応性でもないことがわかる。さらに細胞溶解は、カルシウムをキレート化すると完全に抑制され、抗CD1dモノクローナル抗体42.1で顕著に阻害された(図29C)。以上のデータは、死滅がパーフォリン/グランザイム経路を介し、CD1dを必要とすることを示唆している。未成熟な表現型の樹状細胞(CD83-)と成熟した表現型の樹状細胞(CD83+)の比較から、V 24J QT細胞による認識に一貫した差がないことが判明した(図29A)。樹状細胞によってV 24J QT細胞が活性化されると、IL-4およびIFN- $\gamma$ の両方の分泌も誘導された(図29D)。したがってV 24J QT細胞を、CD1dを発現する樹状細胞に曝露させると、細胞溶解機能とサイトカイン放出の両方が誘導された。

#### 【0188】

免疫調節のフィードバック機構

抗CD3による活性化後、V 24J QT細胞は、IL-4およびGM-CSFを含む、骨髄系樹状細胞の動員および分化に重要な多様なサイトカイン、ケモカイン、および補助刺激タンパク質を分泌可能であることが明らかとなっている。以上の遺伝子産物の存在下で培養した骨髄系樹状細胞は、CD1dを発現し、V 24J QT細胞によるCD1d拘束性の死滅に特異的な標的となった。さらにCD1dは、インビトロで得られた発現データを補強するように、リンパ節の傍皮質T細胞領域にある骨髄系樹状細胞上で優

先に発現されていた。

【0189】

ヒトの骨髄系に由来する樹状細胞(DC1)およびリンパ球系樹状細胞(DC2)は、CD4<sup>+</sup>Tヘルパー細胞の応答を調節するため、V24JQT細胞によるDC1の特異的な溶解は、その免疫調節機能が、IL-4分泌によって誘導されるTh2の偏向に制限されないことを示唆している(Maldonado-Lopezら、J Exp Med 189:587、1999;Rissoanら、Science 283:1183、1999;Reidら、Curr Opin Immunol 12:114、2000)。T細胞と共培養すると、DC1細胞は高レベルのIL-12を分泌し、Th1表現型をもつT細胞を誘導した。DC2細胞との共培養では、顕著なTh2応答が誘導された(Rissoanら、Science 283:1183、1999)。したがって、V24JQT細胞による骨髄系樹状細胞(DC1)の特異的な溶解は、Th1T細胞応答を制限する負のフィードバック機構として働く可能性がある(図30)。

【0190】

過去の報告では、NK細胞に関する同様の溶解結果が示されている。活性化されたNK細胞が樹状細胞を溶解したことは、V24JQT細胞について提案されている機構に似た、負のフィードバック機構の存在を示唆している。またGalCerの投与によりCD1d拘束T細胞がインビボで活性化されると、マウスNK細胞は著しく活性化した(Carnaudら、J Immunol 163:4647、1999)。NK細胞の活性化の機構がインビボにおける樹状細胞の調節に影響する可能性がある一方、本明細書で示された、CD1d反応性T細胞とDCの直接的な相互作用により、上記の段階が不要になると考えられる。

【0191】

V24JQT細胞と樹状細胞との相互作用部位は現時点で不明である。典型的なリンパ節でV24JQT細胞が少ないことは、上記相互作用がリンパ節外で生じている可能性と、リンパ節内に存在するCD1d陽性の樹状細胞が末梢における破壊を逃れたものであることを示唆している(Bendelacら、Annual Review of Immunology 15:535、1997;Porcellira、Annu Rev Immunol 17:297、1999)。網内系におけるV24JQT細胞の平行した組織分布と、CD1dのインビボにおける発現パターンは、これらの相互作用が細胞性免疫応答発生の調節に重要な役割を果たしていることの強力な証拠である。CD1d拘束T細胞は、肝臓、腸、脾臓、リンパ節、および胸腺(Bendelacら、Annual Review of Immunology 15:535、1997;Porcellira、Annu Rev Immunol 17:297、1999)、活性抗原試料採取部位に分布しており、また専門的な抗原提示細胞によって提示されている。調節を受けていない樹状細胞は、組織特異的な自己抗原を提示することで自己免疫を開始して維持する能力をもつことが過去に報告されている。またDCは、II型自己免疫性リンパ球増殖性症候群(ALPS II)患者のカスパーゼ10遺伝子におけるミスセンス変異の結果として、リンパ節のT細胞領域に「残存(lingered)」していた。これは、この自己免疫疾患の主な所見である。CD1d拘束T細胞の機能不全は、げっ歯類とヒトにおけるT細胞を介した自己免疫疾患の発症に明らかに関連していた。またCD1d拘束T細胞の活性化または直接的な移動は、自己免疫のマウスモデルで自己免疫の発生を直接抑制することが報告されている。

【0192】

これまでのデータを要約すると、V24JQT細胞が骨髄系樹状細胞(DC1)上のCD1dにより活性化されて、樹状細胞の動員および分化に重要なケモカインおよびサイトカインを分泌することで、樹状細胞の機能調節に重要な役割を果たすことを示唆している(図30)。このような相互作用はまた、V24JQT細胞の細胞溶解機能も活性化し、樹状細胞の細胞溶解を介したTh1細胞性免疫応答の負の調節を誘導する。この系は、Th2細胞性応答の制限を担う成熟T細胞によるリンパ系樹状細胞(CD2)の負

の制御に相反的な可能性がある (Rissoanら、Science 283:1183、1999)。

【0193】

DCの成熟および機能が、1型糖尿病などの自己免疫疾患に寄与する可能性がある一つの可能な機構は、調節性細胞 (Th2細胞、CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>T細胞)の産生、またはエフェクターT細胞の細胞死の誘導に対する不十分な抗原提示細胞活性を含む。MDCの成熟における固有の異常は、NK T細胞の数または機能の異常に寄与する可能性がある。同様にNK T細胞の欠損は、DCの成熟を相反的に制限する可能性があり、このような抗原提示細胞の死滅を失敗に導くことで、持続的かつ好ましくない免疫応答が可能となる。

10

【0194】

実施例15：インビボにおいて標的となるT細胞亜集団に及ぼす抗体の影響を決定する方法

任意の本発明の抗体をインビボ動物モデルで検討し、抗体の薬理的および薬物動態学的な性質を決定することができる。例えば抗体の半減期、体内分布、および有効性を決定することができる。

【0195】

一つの方法では、関心対象のヒトインバリアントT細胞もしくは他の任意のT細胞集団をSCIDマウス、または免疫不全動物 (マウスなど) に投与し、抗インバリアントT細胞抗体もしくは本発明の他の任意の抗体を動物に投与して、対象抗体が投与T細胞の活性もしくは数をインビボで調節するか否かを判定する。

20

【0196】

具体的には、百万～千万個の関心対象のT細胞を含むT細胞の集団 (例えばインバリアントT細胞、または他の任意のT細胞亜集団) を静脈内、または任意の関心対象の部位に注射する。一つもしくは複数の抗体をT細胞の投与前、投与中、または投与後に投与する。例えば抗体は、宿主動物において投与T細胞の寿命があるうちの任意の時点で投与することができる。T細胞を投与する部位として、約1～100 μgの抗体を同じ部位に投与するか、または別の部位に投与する。検出用の標識抗体を使用する場合は、投与抗体および/またはT細胞の位置および量を、蛍光もしくは放射活性を基にインビボでモニタリングすることができる。さらに、組織学的測定、免疫学的測定、および/または生化学的測定を、動物の組織を対象にエキソビボで行うことができる。抗体またはT細胞亜集団の生物学的活性は、血清または組織試料に含まれるサイトカインの量または活性を分析することで測定することができる。また投与されたT細胞亜集団による、他のT細胞などの他の細胞の活性化を測定することができる。例えばCD69<sup>+</sup>T細胞の数は、抗CD69抗体を用いたFACS選別で測定することができる。

30

【0197】

実施例16：NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup>T細胞のインビボにおける増殖用の抗体、またはこれらの細胞の画像化用の抗体の投与

本発明の抗体は、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、または癌の治療もしくは予防のために、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup>T細胞インビボにおける増殖のためのサイトカインの投与に加えることで哺乳類に投与することができる。実施例7に記載されたように、すべての投与様式、用量、および頻度が意図される。

40

【0198】

一つまたは複数の本発明の抗体を含む薬学的組成物は、「レミントンの薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」 (E. W. Martin) に記載された手順で調製することができる。薬学的な安定化化合物、輸送用媒介物、または担体輸送体を使用することができる。例えばヒト血清アルブミン、または他のヒトもしくは動物のタンパク質を使用することができる。リン脂質小胞もしくはリポソ

50

ーム懸濁物は、薬学的に許容される担体、または輸送用媒介物となりうる。このような組成物は当技術分野で周知の方法で調製することができる。

#### 【0199】

蛍光標識または放射標識に共有結合で連結された本発明の抗体を用いて、NK T細胞、CD1d反応性T細胞、もしくはJ Q<sup>+</sup> T細胞のインビボにおける分布、量、または移動を視覚化することができる。NK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞の画像化により、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、真核性病原体感染、アレルギー、喘息、炎症性症状、移植片対宿主病、移植拒絶、免疫不全症、自然流産、妊娠、または癌の危険性のある被験者、またはこれらの症状のみられる被験者を同定することができる。あるいは、同様の方法で、上記疾患に対する治療がNK T細胞、CD1d反応性T細胞、またはJ Q<sup>+</sup> T細胞に及ぼす作用を決定することができる。

10

#### 【0200】

##### 他の態様

前述の記述から、さまざまな用途および条件に適合するように本明細書に記載された発明に変更および修正がなされることが明らかになる。このような態様も、特許請求の範囲内にある。

#### 【0201】

本明細書で言及されたすべての刊行物は、個々の刊行物が、参照として組み入れられると特に個別に指定されたのと同じ程度に、参照として本明細書に組み入れられる。

20

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】NK T細胞、CD1d反応性インバリアントT細胞、CD1d反応性非インバリアントT細胞、およびJ Q<sup>+</sup> T細胞間の関係を示す略図である。

【図2】図2Aは、対照のT細胞クローンを、抗CDR3ループモノクローナル抗体(3A6もしくは6B11)、または6B11アイソタイプ(IgG1)の適合させた対照で染色した結果を示すヒストグラムである。図2Bは、インバリアントNK T細胞クローンの対応する染色を示すヒストグラムである。

【図3Aおよび3B】6B11モノクローナル抗体によるV24<sup>+</sup> T細胞の認識のFACS解析を示すドットプロットである。FACSで精製したV24<sup>+</sup> T細胞をPHAで2週間エキソビボで増殖させ、V24-PEおよびV11-FITCモノクローナル抗体(図3A)またはV24-PEおよび6B11-FITCモノクローナル抗体(図3B)を用いて分析した。

30

【図4Aおよび4B】それぞれ、6B11抗CDR3ループモノクローナル抗体が結合したプレート、またはPHAと共に3週間培養したV24で選別した細胞の増殖を示すグラフである。

【図5Aおよび5B】それぞれIL-12の処置前または処置中における患者のインバリアントNK T細胞のFACS解析を示すグラフである。進行腎細胞癌患者の末梢血を、IL-12処置の直前、および最初の6週間後の時点でCD3<sup>+</sup> V24<sup>+</sup> 細胞について分析した。処置後に有意な上昇のない、V24<sup>+</sup> 細胞の同等の低い比率が、すべての場合(n=10)に認められた。

40

【図6A~6C】それぞれバルク末梢血単核球細胞、V24<sup>+</sup> 細胞、およびポリクローナル(「ポリ」)インバリアントT細胞によるIL-4産生を示すグラフである。これらの細胞を-GalCerで増殖させた後に、緩衝液、プレートに結合させた6B11抗体で刺激するか、Hela/CD1d形質移入体と共培養するか、またはPHAで刺激した。分泌されたIL-4の量を標準的なELISA分析で決定した。

【図7A~7C】同じ健康なドナーの試料に由来する、6B11および-GalCerによる、表現型および機能的に同一なインバリアントNK T細胞の増殖が同等であることを示すグラフである。「MoFlo」で選別したV24細胞を、-GalCerをパルスした自家樹状細胞、6B11モノクローナル抗体、または分裂促進因子(PHA)で、約4週間IL-2のみで増殖させた。

50

【図 8 A】末梢血試料に由来するバルク T 細胞が 3 A 6 抗体で認識されることを示すグラフである。

【図 8 D】6 B 1 1 抗体、3 A 6 抗体、または対照抗体で分析したリンパ球のゲーティングを示す細胞の前方散乱 (F S C) および側方散乱 (S S C) のグラフである。

【図 8 B、8 C、および 8 E ~ 8 I】インバリアント NK T 細胞クローンおよび系列が、3 A 6 抗体、6 B 1 1 抗体、またはアイソタイプの対照抗体で認識されることを示すグラフである。以上のインバリアント NK T 細胞のクローンおよび系列は、抗 V 2 4 モノクローナル抗体を用いて精製後に、 $\alpha$ -GalCer を用いて増殖させた。図 8 B ~ 8 I では同じ「MT」細胞系を分析した。3 A 6 抗体または 6 B 1 1 抗体、および抗 m I g - F I T C を用いた間接的 (1 色) F A C S 解析で、純粋なヒトインバリアント NK T 細胞クローンおよび細胞系が、対照 T 細胞と比べて特異的に認識されることがわかる。

【図 9】健康なドナーの全末梢血単核球 (P B M C) に由来するインバリアント NK T 細胞系の F A C S 解析を示すグラフである。このような細胞を M o F l o F A C S で 6 B 1 1 - F I T C とともに選別し、約 6 週間増殖させた後に 2 色 F A C S 解析を行った。増殖後、細胞の 2 1 % が V 2 4 <sup>+</sup> であった (増殖前は ~ 0 . 1 % )。以上の結果を図 1 2 ~ 1 7 にまとめた。

【図 1 0 A ~ 1 0 H】6 B 1 1 抗体磁気ビーズによる選別に由来する、インバリアント NK T 細胞系の F A C S 解析を示すグラフである。健康なドナーの全 P B M C に由来するインバリアント NK T 細胞を、ダイナルまたはミルテニ磁気ビーズ免疫親和性精製により、6 B 1 1 とともに全 P B M C から選別し、約 6 週間の増殖後に 2 色 F A C S 解析を行った。この結果を図 1 2 ~ 1 7 にまとめた。

【図 1 1 A ~ 1 1 F】6 B 1 1 抗体磁気ビーズ選別に由来する、インバリアント NK T 細胞系の F A C S 解析を示すグラフである。健康なドナーの全 P B M C に由来するインバリアント NK T 細胞を、ダイナル磁気ビーズ免疫親和性精製により 6 B 1 1 とともに選別し、記載の手順で全 P B M C から処理し、約 6 週間かけて増殖させた後に 2 色 F A C S 解析を行った。この結果を図 1 2 ~ 1 7 にまとめた。

【図 1 2】T 細胞用培地中における 4 ~ 8 週間の 1 回の増殖の後に記載の抗体で染色された T 細胞の割合 (%) を示す表である。「P B M C」カラムは、増殖前に選別されなかった P B M C 細胞を意味する。「ダイナル@ 4 0」カラムは、増殖前に 6 B 1 1 - ダイナルビーズで精製された P B M C 細胞を意味する。「ミルテニ@ 2 0」カラムは、増殖前に 6 B 1 1 (2 0  $\mu$ g / mL コーティング) - ミルテニビーズを用いて選別された P B M C 細胞を意味する。比較する目的で、選別されなかった全リユーコパック (L e u k o p a k) 2 1 (L K P 2 1) 細胞に関する、対応する結果を示す。図 1 2 ~ 1 7 では、1 0 % F B S および 1 0 0 U / mL のヒト組換え型 I L - 2 を添加した、R P M I - 1 6 4 0 またはバイオウィタッカー (B i o W h i t t a k e r) 培地などの標準的な T 細胞培地を使用した。

【図 1 3】6 B 1 1 - ダイナルビーズを用いた精製、および T 細胞用培地における 4 ~ 8 週の 1 回の増殖の後に、記載の抗体で染色された T 細胞の割合 (%) を示す表である。比較する目的で、選別されなかった全リユーコパック 1 0 (L K P 1 0) 細胞に関する対応する結果を示す。この表に示す通り、T 細胞の増殖の一部は、I L - 7 (1 0 n g / mL)、I L - 5 (1 0 n g / mL)、デキサメタゾン (「D e x」) (1  $\mu$ M)、および / または 6 B 1 1 抗体 (4 0  $\mu$ g / mL) を含む T 細胞用培地 (「T C M」) の存在下で行った。表の右側に記した図の番号は、T 細胞の増殖で得られた結果を示す図を意味する。

【図 1 4】T 細胞培地中における 1 回の 4 ~ 8 週の増殖後に、指定抗体で染色される T 細胞の割合 (%) を示す表である。比較する目的で、選別されなかった全リユーコパック 1 4 (L K P 1 4) 細胞に関する対応する結果を示す。増殖前に 6 B 1 1 - ダイナルビーズとともに選別された細胞の結果は、選別されなかった対照細胞と同等である。表に示す通り、T 細胞増殖の一部は、上述の 6 B 1 1 抗体、P H A (1  $\mu$ g / mL)、および / または同数の自家 A P C の存在下で実施した。

10

20

30

40

50

【図15】T細胞培地中における1回の4～8週の増殖後に、指定抗体で染色されるT細胞の割合(%)を示す表である。増殖前に6B11-ダイナルビーズとともに選別された細胞の結果は、選別されなかった対照細胞(LKP13)と同等である。T細胞増殖の一部は、上述の通り、6B11抗体、PHA、同種APC、および/または自家APCの存在下で実施した。

【図16】選別されなかった対照細胞(LKP2)と比較したときの、6B11-ミルテニ磁気ビーズ、およびT細胞培地中における1回の4～8週の増殖を用いた精製後に、指定抗体で染色されるT細胞の割合(%)を示す表である。以上のT細胞の増殖は、上述の通り、自家APCの存在下で実施した。T細胞の増殖の1回では、10 ng/mlのIL-7およびIL-15も存在していた。

【図17】6B11-ミルテニ磁気ビーズ、およびT細胞培地中における1回の4～8週の増殖を用いた精製後に、指定抗体で染色されるT細胞の割合(%)を示す別の表である。これらのT細胞の増殖は、自家APCおよびPHAの存在下で実施し、選別されなかった対照細胞(LKP11、12)と比較した。T細胞の増殖中、6B11抗体、および/またはV24抗体も上述の通り、また表に示す通りに存在していた。T細胞の増殖の1回では、10 ng/mlのIL-7およびIL-15も存在していた。表の左側に示した図の番号は、T細胞の増殖で得られた結果を示す図を意味する。

【図18】ビオチン化6B11抗体およびストレプトアビジンを結合させた磁気ビーズで精製した、T細胞系のFACS解析を示すグラフである。

【図19A～19E】V24-PE、およびV11-FITC(図19A～19C)または6B11-FITC抗体(図19D～19F)のいずれかを用いた2色フローサイトメトリーで解析した、健康なドナーの末梢血(図19Bおよび19E)、または前立腺癌患者の末梢血(図19Cおよび19F)、またはNK T細胞系(図19Aおよび19D)のフローサイトメトリー解析を示すグラフである。NK T細胞系は、健康なドナーに由来するV24で精製した、細胞の-GalCerによる増殖で生じた。

【図20Aおよび図20B】PHA(図20A)、もしくは-GalCerおよび自家PBMCフィーダー(図20B)を用いた3週間の増殖後に、V24で選別した細胞の、V24-PEおよびV11-FITCモノクローナル抗体を使用した2色フローサイトメトリー解析を示すグラフである。図20Cおよび20Dは、抗CD1dモノクローナル抗体(51.1、10 μg/ml)、またはアイソタイプの対照抗体のいずれかの存在下において、PHAで刺激されたインバリアントNK T細胞系、または偽トランスフェクトした、もしくはCD1dをトランスフェクトしたC1RヒトEBV-形質転換B細胞で刺激された、それぞれIL-4およびIFN- $\gamma$ の産生を示す棒グラフである。図20A～20Dの結果は、後述するように、複数の健康なドナーの代表である。

【図21】図21A～Cは、健康なドナーに対して、前立腺癌患者に由来するインバリアントNK T細胞の増殖が低下したことを示すグラフである。健康なドナー(図21A)、進行性前立腺癌患者(図21B)、および寛解中の前立腺癌患者(図21C)に由来する、-GalCerで増殖させたインバリアントNK T細胞を、V24-PEおよびV11-FITCによる染色で分析した。図21Dは、一連の(6)ドナーに由来する、-GalCerによる増殖後におけるV24<sup>+</sup>V11<sup>+</sup>細胞(平均および標準偏差)の割合(%)を示す棒グラフである。この結果は、図12～17でもまとめられている。

【図22A～22E】前立腺癌患者に由来するインバリアントNK T細胞によるIFN- $\gamma$ 反応がないことを示すグラフである。図22Aおよび22Bは、前立腺癌患者と健康なドナーに由来するインバリアントNK T細胞系にそれぞれ由来する、IL-4およびIFN- $\gamma$ の産生を示す。図22Cおよび22Dは、それぞれ一連の進行性前立腺癌患者( )および健康なドナー( )に由来する、CD1dで刺激したインバリアントNK T細胞、およびPHAで刺激したバルクT細胞によるサイトカイン産生の結果をまとめたグラフである。図22Eは、健康なドナーおよび進行性前立腺癌患者に由来する、インバリアントNK T細胞(上)、または典型的なバルクT細胞(下)のIFN- $\gamma$ /IL- $\gamma$

10

20

30

40

50

4比(平均および標準偏差)を示すグラフである。「癌+IL-12」は、インビトロにおいてIL-12で処理した進行性前立腺癌患者に由来する試料である。

【図23】HIV患者におけるCD1d拘束T細胞の出現頻度を決定する際の、6B11抗体の用途を示す表である。

【図24】糖尿病患者におけるCD1d拘束T細胞の出現頻度を決定する際の、6B11抗体および抗V<sub>24</sub>抗体の用途を示す表である。

【図25A】NK T細胞クローンME10とGW4とで示差的に発現される遺伝子を示す表である。11個の遺伝子機能性カテゴリーに関する、6個の発現クラスターを構成する遺伝子を示す。個々の遺伝子は、GenBankアクセッション番号(またはHT表記についてはTIGR識別子)で示されており、それに続いて一般名および所属の特定のクラスターが示されている(行、列)。

【図25B】不調和な(discordant)発現が観察されている細胞表現型と一致している、同定された転写物のモデルの略図である。イラストで表した絵は、転写物が明瞭に規定された細胞内における役割を有し、GW4とME10とで不調和な発現が、確立された表現型上の差と相関する遺伝子を示す。これらの遺伝子は、PI-3キナーゼ、特に細胞生存を調節する複数の遺伝子の下流にあるか、またはカルシウムの流入およびカルシウムで調節される遺伝子転写に関して直接必要とされることで、関連している。GW4(休止、活性化)およびME10(休止、活性化)に対する抗CD3処置によって、有意に変化したmRNA分子/数百万個の遺伝子の平均コピー数は、それぞれItk、(49、115)および(25、19);GATA3、(13、26)および(8、11);Jun-B、(15、118)および(14、30);Jun-D、(107、291)および(68、130);NFAT4、(33、35)および(64、26);STAT4、(36、29)および(76、36);14-3-3、(24、45)および(83、41);Bcl-XL、(11、50)および(6、7);ならびにIAP、(14、211)および(10、41)であった。MW10に対するGW4(GW4、ME10)に関する発現が構成的であったが、不調和であった選択された遺伝子群は、NKR-P1A、(29、459);およびSTAT1、(27、79)であった。

【図26A~26D】活性型V<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞における転写の誘導、ならびにサイトカインおよび細胞融解性酵素の放出を示すグラフである。図26Aおよび26Bでは、V<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞クローンGW4(IL-4<sup>+</sup>)クローンとME10(IL-4-ヌル)クローン間における、サイトカインおよびケモカインの遺伝子の発現の変化を比較している。個々の転写物について、抗CD3で誘導されたハイブリダイゼーションの強度を示す。RNAを単離し、増幅し、かつ免疫学的関心対象の250個の遺伝子に対するプローブを並べたジーンチップ(Affymetrix、San Jose、CA)とハイブリッドを形成させた。このチップは、個々の特定の転写物を検出するためのアドレス特性の数を増やすことで、定量分析用に特別設計されている。IgG1対照による処置後の数百万個当たりの特定のmRNAのコピー数の数値を白丸( )で示し、抗CD3処置による活性化後における対応コピー数を黒丸( )で示す。遺伝子発現アルゴリズムで有意に異なると判定され、また少なくとも2倍変化した遺伝子を太字で表す。文字(A)は、転写物が検出されなかったことを意味し、MIP-1およびMIP-1の転写物が、クローンME10において抗CD3刺激で抑制されたことに留意すべきである。図26Cは、定量ELISA分析に基づく、複数のV<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞クローンに由来する、上清から産生されたサイトカインの量を示すグラフである。図26Dは、CD40Lの発現を示すグラフである。T細胞クローンBW5は、PMA/イオノマイシン刺激により4時間にわたって活性化され、フローサイトメトリーで解析された。

【図27Aおよび27B】CD1dによるV<sub>24</sub>J<sub>Q</sub>T細胞の活性化の拘束を示す。図27Aは、サイトカインの放出および増殖の拘束を示す。T細胞クローンを、(CD1a、CD1b、CD1c、もしくはCD1dを発現する)C1R形質移入体、またはプレートに結合させた抗CD3と共培養した。分泌されたIL-4、IFN-、または増殖は、本発明に記載された手順で調べた。図27Bは、細胞溶解が制限されることを示す

10

20

30

40

50

。C1R形質移入体のパネルは、標準的な4時間の $^{51}\text{Cr}$ -遊離アッセイ法で、V24JQT細胞クローンによる細胞溶解に関してスクリーニングを行った。

【図28A】培養樹状細胞のフローサイトメトリー解析に基づく、骨髓系樹状細胞上におけるCD1d発現のグラフである。

【図28B】樹状細胞と、(CD1aまたはCD1dを発現する)対照C1R形質移入細胞の免疫プロット分析の写真である。

【図28C~28J】代表的な反応性リンパ節生検(計10回の生検)の一連の切片を免疫化学的に染色した写真である。図28Cは、低出力におけるヘマトキシリン-エオシン染色の写真であり、図28Dは、抗CD3染色の写真である。四角で囲んだ部分は、図28Eおよび28Fで高倍率で示した連続切片を、さまざまなマーカーによる染色用に採取した領域の境界を示す(図28E、S100;図28F、CD1d;図28G、CD1a;図28H、CD34)。リンパ洞組織球の染色(図28Iおよび28K)、ならびに傍濾胞領域(図28Lおよび28M):ヘマトキシリン-エオシン(図28Iおよび28L);CD68、マクローファージマーカー、(図28Jおよび28M);ならびにCD1d(図28Kおよび28N)を示す。

【図29A~29D】V24JQT細胞による骨髓系樹状細胞の細胞溶解の特徴を示すグラフである。図29は、クロム遊離アッセイ法におけるV24JQT細胞クローンGW4による、未成熟樹状細胞および成熟樹状細胞の同種溶解を示すグラフである。ドナーのハプロタイプは、1)クローンGW4、A2、A24、B8、B38、Cw7、DR3、DQ2;2)DCドナーM、A2、A68、B7、B45、Cw6、Cw15;3)DCドナーO、A2、A24、B46、B60、DR14、DRw52、DQ1;5)ドナーB、A1、A3、B7、B8、DRB1\*1501、DRB5\*0101、DQB1\*0601であった。図29Bと29Cは、V24JQT細胞クローンによる樹状細胞の自家および同種の細胞溶解のグラフである。図29Dは、細胞溶解のカルシウムキレートによる抑止、および抗CD1dモノクローナル抗体42.1の付加による抑制のグラフである。クローンBW3およびBW5を、EGTAおよびMgCl<sub>2</sub>(各4mM)、またはモノクローナル抗体42.1もしくは対照IgG(100μg/ml)に由来するF(ab')<sub>2</sub>断片の存在下または非存在下で、被験者のBWDCと共培養した。図29Eは、V24JQT細胞クローンOY3およびBW5と自家DCとの共培養後における、IL-4およびIFN- $\gamma$ の分泌を示す棒グラフである。

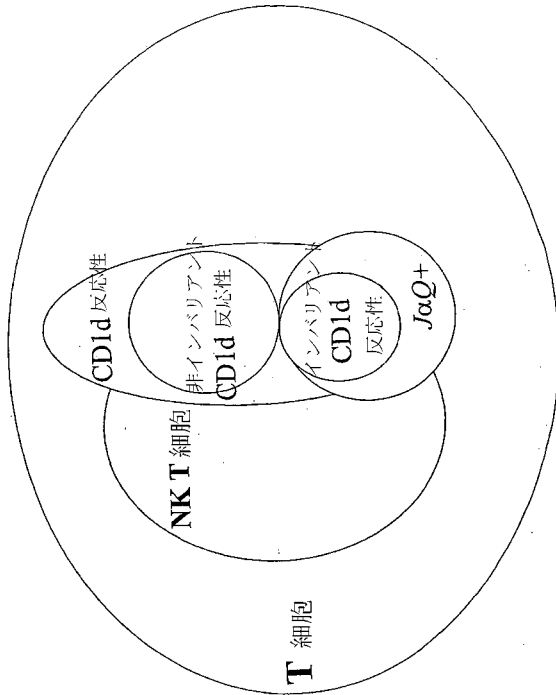
【図30】CD1d拘束T細胞と骨髓系樹状細胞との相互作用を示すモデルの略図である。インバリアントV24JQT細胞が活性化すると、骨髓系樹状細胞の動員および活性化に重要なサイトカインおよびケモカインが分泌される。また、重要な細胞表面補助刺激分子も発現される。骨髓系樹状細胞が成熟すると、CD1dの発現が促進され、CD1d拘束T細胞が活性化される。サイトカインおよびケモカインが分泌されることに加えて、活性化されたV24JQT細胞は、パーフォリン、グランザイムB、およびグランジュリン(Granulysin)の発現を促進する。これらの分子のCD1dに依存性の分泌により、骨髓系樹状細胞の溶解が起こる。

10

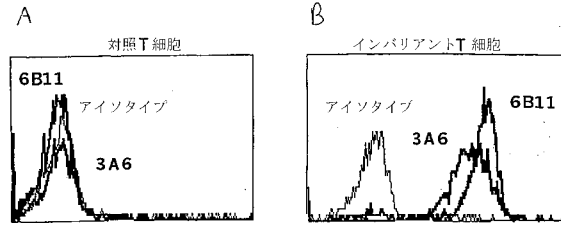
20

30

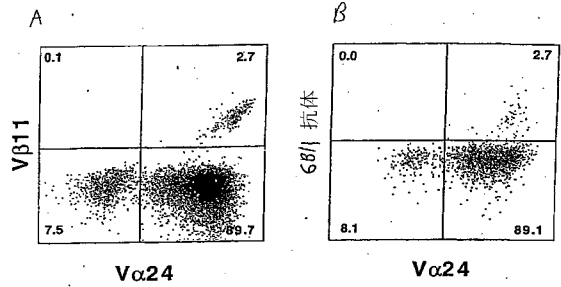
【 図 1 】



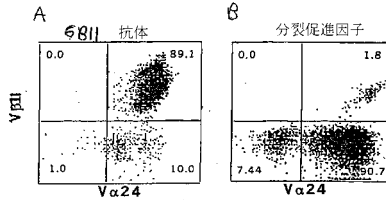
【 図 2 】



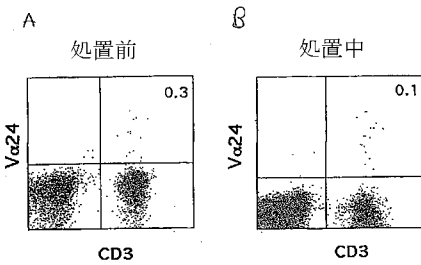
【 図 3 】



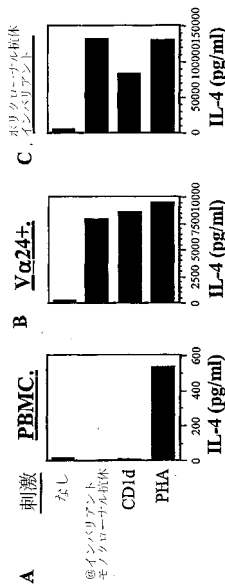
【 図 4 】



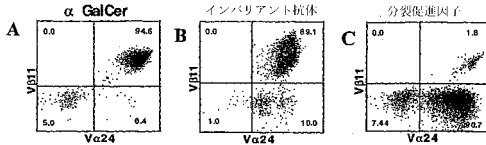
【 図 5 】



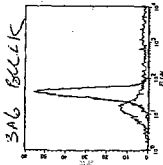
【 図 6 】



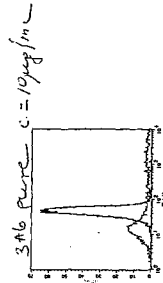
【 図 7 】



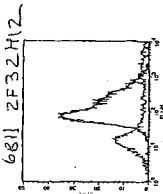
【 8 A 】



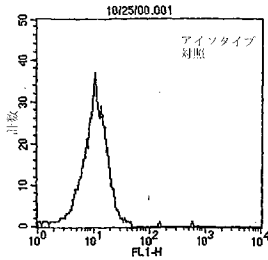
【 8 B 】



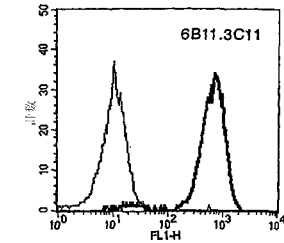
【 8 C 】



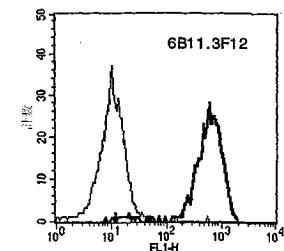
【 8 G 】



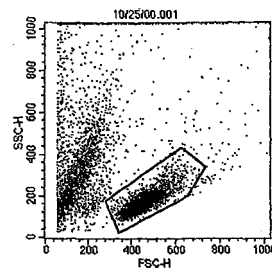
【 8 H 】



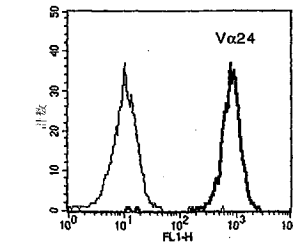
【 8 I 】



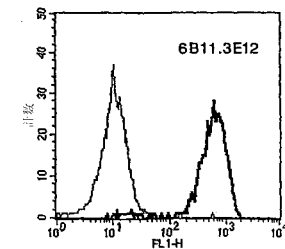
【 8 D 】



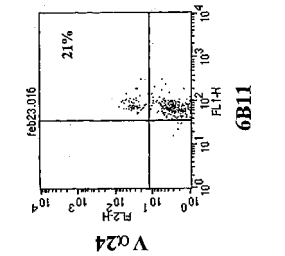
【 8 E 】



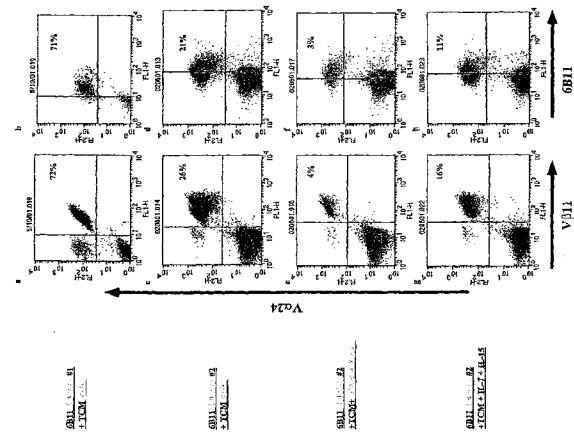
【 8 F 】



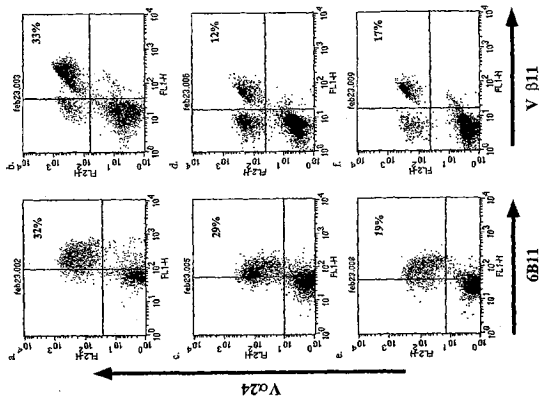
【 9 】



【 10 】



【 図 1 1 】



6B11 + TCM  
6B11 + TCM + IL-7 + IL-15  
6B11 + TCM + IL-7 + IL-15 + IL-18

【 図 1 2 】

ミルチン細胞ライン 4/11/01			
	FPMC	ダイナール@40	ミルチン@20
D <sub>0</sub> セル	0	8.46	4.53
Vα24/6B11	0.01	4.85	4.71
Vα24		3.9	
D <sub>2</sub> セル			
Vα24/6B11	0.01	0.99	5.91
Vα24/Vβ11	0.01	1.47	6.16
Vα24		0.33	
D <sub>2</sub> セル			
Vα24/6B11	0	N/A	71
Vα24/Vβ11	0.03	N/A	72
Vα24			5.98
LKP 21 非選別細胞			
Vα24/6B11	0.01		
Vα24/Vβ11	0		

【 図 1 3 】

ダイナール細胞ライン 1/19/01		
LKP 10 (TCM 30ug/ml + 6B11)		
Vα24/Vβ11	32.98	⊗ 11b
Vα24/6B11	32	⊗ 11a
LKP 10 (TCM + IL15/IL7)		
Vα24/Vβ11	12.46	⊗ 11d
Vα24/6B11	29	⊗ 11c
LKP 10 TCM + 30ug/ml IL7		
Vα24/Vβ11	17.08	⊗ 11f
Vα24/6B11	19	⊗ 11e
LKP 10 TCM + IL15/IL7 + 30ug/ml IL7		
Vα24/Vβ11	4.93	⊗ 10b
Vα24/6B11	13.81	⊗ 10a

【 図 1 4 】

ダイナール細胞ライン 6B11 非選別細胞 3/9/01		
LKP 14 非選別細胞		
3/20/01	Vα24/Vβ11	0.02%
	Vα24/6B11	0.01%
LKP 14 6B11 + PHA + 自家 APC		
3/20/01	Vα24/Vβ11	0.09%
	Vα24/6B11	0%
4/20/01	Vα24/Vβ11	0.13%
	Vα24/6B11	0.00%
	Vα24	0.01%
LKP 14 6B11 + 自家 APC		
3/20/01	Vα24/Vβ11	0.68%
	Vα24/6B11	0.02%
4/20/01	Vα24/Vβ11	0.15%
	Vα24/6B11	0.00%
	Vα24	0.73%
4/27/01	Gal Cer による刺激	
5/10/01	Vα24/Vβ11	2.73%
	Vα24/6B11	2.94%
非選別細胞		
	Vα24/Vβ11	0.01%
	Vα24/6B11	0.01%
6B11 + PHA + 自家 APC		
4/20/01	Vα24/Vβ11	3.64%
	Vα24/6B11	3.75%
5/10/01	Vα24/Vβ11	5.01%
	Vα24/6B11	4.92%

【 図 1 5 】

ダイナール細胞ライン 6B11 非選別細胞 3/9/01		
LKP 13 非選別細胞		
	Vα24/Vβ11	0.07%
	Vα24/6B11	0.06%
LKP 13 6B11 + PHA + 自家 APC		
4/20/01	Vα24/Vβ11	1.85%
	Vα24/6B11	0%
	Vα24	1.16%
5/10/01	Vα24/Vβ11	14.29%
	Vα24/6B11	
非選別細胞		
	Vα24/Vβ11	0.01%
	Vα24/6B11	0.00%
6B11 + PHA + 自家 APC		
4/20/01	Vα24/Vβ11	0.05%
	Vα24/6B11	0.06%
	Vα24	3.22%
6B11 + 自家 APC		
4/20/01	Vα24/Vβ11	0.78%
	Vα24/6B11	0.00%
	Vα24	1%

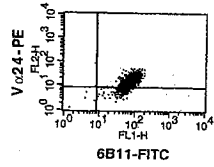
【 図 1 6 】

ミルチン細胞ライン #1 6B11 1/01		
LKP2 + 自家 APC + TCM		
2/6/01	Vα24/Vβ11	26.07%
	Vα24/6B11	21%
2/23/01	Vα24/6B11	10.79%
3/26/01 Gal Cer による刺激		
4/20/01	Vα24/Vβ11	73.40%
	Vα24/6B11	74.68%
4/27/01 Gal Cer による刺激		
5/14/01	Vα24/Vβ11	80.87%
	Vα24/6B11	79.98%
LKP2 + 自家 APC + TCM + IL7/IL15		
2/6/01	Vα24/Vβ11	16%
	Vα24/6B11	11%
3/26/01 Gal Cer による刺激		
4/20/01	Vα24/Vβ11	54.28%
	Vα24/6B11	56.89%
4/27/01 Gal Cer による刺激		
5/14/01	Vα24/Vβ11	68.05%
	Vα24/6B11	68.85%
	Vα24	1.66%

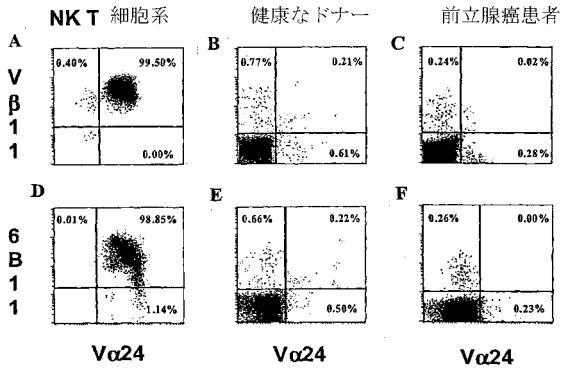
【 図 17 】

実験例	細胞株	#2	101
図10c	LKP 11	Va24 + 自家 APC + PHA	2/23/01 Va24/6B11 63.75%
			3/20/01 Va24/Vβ11 1.43%
			Vα24/6B11 0.07%
			4/27/01 α-Gal Cer による刺激
図10d	LKP 11	6B11 + 自家 APC + PHA	2/23/01 Va24/6B11 45.27%
			3/20/01 Va24/Vβ11 0.25%
			Vα24/6B11 0.25%
			4/27/01 α-Gal Cer による刺激
図10e	LKP 12	Va24 + 自家 APC + PHA	2/23/01 Va24/6B11 33.51%
			3/20/01 Va24/Vβ11 0.25%
			Vα24/6B11 0.25%
			4/27/01 α-Gal Cer による刺激
図10f	LKP 12	6B11 + 自家 APC + PHA	2/23/01 Va24/6B11 0.00%
			3/20/01 Va24/Vβ11 0.00%
			Vα24/6B11 0.00%
			4/27/01 α-Gal Cer による刺激

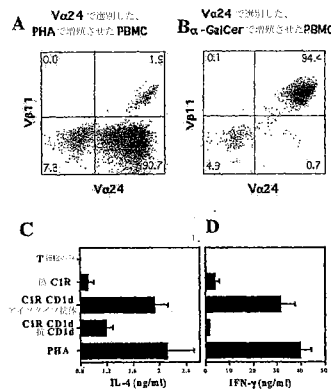
【 図 18 】



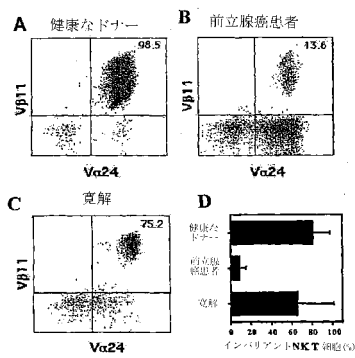
【 図 19 】



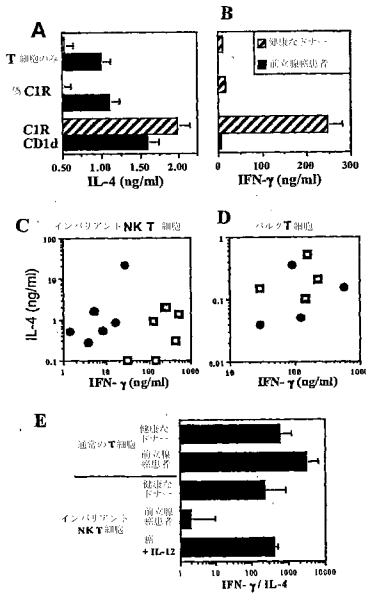
【 図 20 】



【 図 21 】



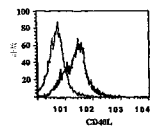
【 図 22 】



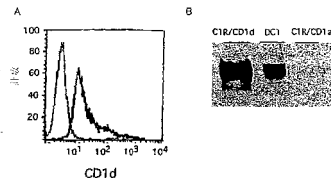




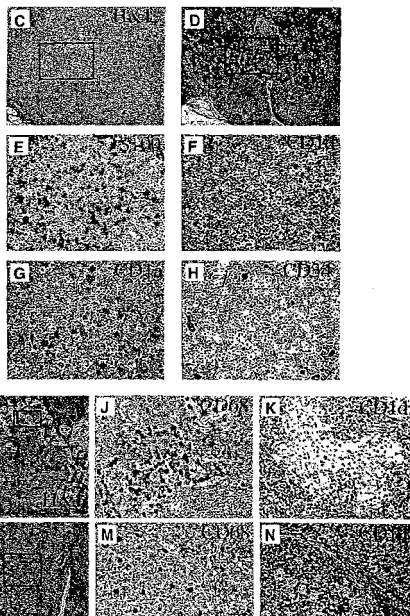
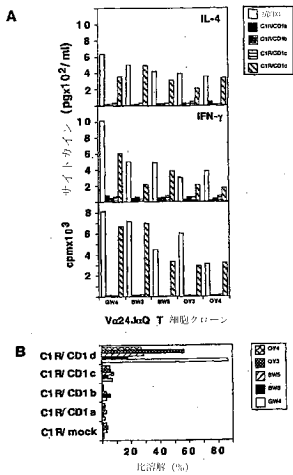
【 図 26 D 】



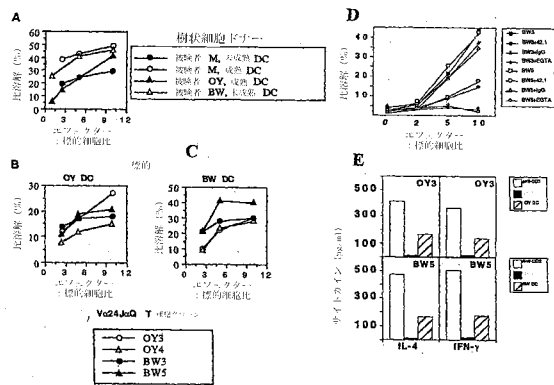
【 図 28 】



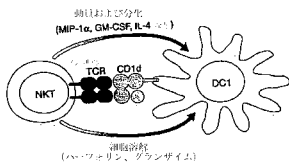
【 図 27 】



【 図 29 】



【 図 30 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/98357 A2

(51) International Patent Classification: C07K 16/00

[GB/US]: 201 Reservoir Road, Chestnut Hill, MA 02467-1426 (US). WILSON, Samuel, B. [US/US]: 33 Homestead Road, Lexington, MA 02421-6530 (US). BALK, Steven, P. [US/US]: 3 Brentwood Circle, Needham, MA 02492 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/19670

(22) International Filing Date: 19 June 2001 (19.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(74) Agent: BIEKER-BRADY, Kristina; Clark & Elbing LLP, 176 Federal Street, Boston, MA 02110-2214 (US).

(30) Priority Data: 60/212,466 19 June 2000 (19.06.2000) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/212,466 (CIP) Filed on 19 June 2000 (19.06.2000)

(81) Designated States (national): 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TT, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

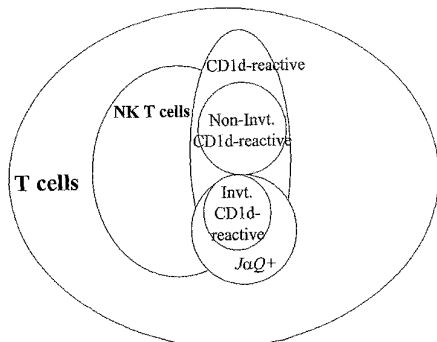
(71) Applicants (for all designated States except US): BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER [US/US]: 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215 (US). DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. [US/US]: 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): EXLEY, Mark, A.

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS OF MONOCLONAL AND POLYCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR T CELL SUBPOPULATIONS



(57) Abstract: The invention provides compounds and methods for the ex vivo or in vivo expansion of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and JaQ+ cells, and the modulation of their activities. These compounds and methods have diagnostic and therapeutic applications.



WO 01/98357 A2

**WO 01/98357 A2**



**Published:**

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 01/98357

PCT/US01/19670

5                    COMPOSITIONS AND METHODS OF MONOCLONAL AND  
                      POLYCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR T CELL  
                      SUBPOPULATIONS

Statement as to Federally Sponsored Research

                      This invention was funded by grant AI42955 from the National  
10 Institute of Health. The government may have certain rights in the  
                      invention.

Background of the Invention

                      Modulation of the immune system is desirable to treat a variety of  
15 diseases and disorders including, but not limited to, autoimmune diseases,  
                      infections, allergies, asthma, inflammatory conditions, spontaneous  
                      abortion, pregnancy, graft versus host disease, and cancers.

                      T cells are lymphocytes that participate in multiple cell-mediated  
                      immune reactions, such as the recognition and destruction of infected or  
20 cancerous cells. Subsets of T cells, such as suppressor, cytotoxic, and  
                      helper T cells, mediate different immunologic functions. Suppressor T  
                      cells are responsible for turning the immune response off after an infection  
                      is cleared. Cytotoxic or "natural killer" T cells destroy infected or  
                      cancerous cells. Helper T cells produce cytokines that modulate the  
25 activity of cytotoxic T cells and/or antibody-producing B cells.

                      A subset of helper T cells, Th1 cells, secrete interleukin-1 (IL-1), IL-  
                      2, gamma interferon (INF- $\gamma$ ), and IL-2 which enhance cell-mediated  
                      responses such as cytotoxic T cell activity and inhibit both Th2 helper T  
                      cell activity and humoral immunity mediated by soluble antibodies. Due

WO 01/98357

PCT/US01/19670

to their ability to kill antigen-presenting cells and their cytokine-mediated effector activity, Th1 cells are associated with vigorous delayed-type hypersensitivity reactions. Th2 cells, the other subset of helper T cells, are thought to inhibit cell-mediated responses and to enhance the humoral  
5 response. Th2 cells secrete IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, and IL-13 which activate B cell development and antibody production. T cells may also participate in immune deviation responses, such as the suppression of an ongoing immune response which may involve the secretion of TGF- $\beta$  or IL-10 cytokines (Sonoda *et al.*, J. Ex. Med. 190:1215-1255, 1999; Streilein  
10 *et al.*, Hum. Immunol. 52:138-143, 1997; Hong *et al.*, J. Ex. Med. 190, 1197-1200, 1999; Streilein *et al.*, J. Immunol. 158:3557-3560, 1997).

To recognize a particular antigen bound to an antigen-presenting cell, most T cells express a highly specific T cell receptor (TCR) on their cell surface. The chains of the most common T cell receptors are called  $\alpha$  and  
15  $\beta$ . A second T cell receptor, found on a minor subpopulation of T cells, is composed of  $\gamma$  and  $\delta$  chains. The genes for the  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  chains of the T cell receptors have organizations similar to that of antibody genes: there are libraries of V, D, and J regions from which members are joined to form entire genes.

20 In contrast to most T cell subpopulations, which have diverse sequences for their TCR- $\alpha$  chain, invariant T cells have a highly conserved invariant TCR- $\alpha$  chain, V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q in humans and V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 in mice, that pairs preferentially with human V $\beta$ 11 or murine V $\beta$ 8. These cells are either CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> or CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. This invariant TCR is presumed to enable  
25 invariant T cells to recognize endogenous or pathogen-derived lipid antigens presented by nonpolymorphic MHC class I-like proteins, called CD1 family members. Humans have four CD1 proteins (CD1a, CD1b, CD1c, and CD1d), but mice have only a duplicated CD1d gene that is

WO 01/98357

PCT/US01/19670

highly homologous to human CD1d. Human CD1d is expressed at high levels by thymocytes, at lower levels by B cells and monocytes, and by some cells outside of the lymphoid and myeloid lineages.

Many invariant T cells are distinguished by expression of several cell surface proteins otherwise found largely on natural killer (NK) cells, including CD161 (NKR-P1A) in humans, and a cell surface C-type lectin, NKR-P1C (NK1), in mice. This T cell subpopulation, referred to here as "invariant NK T cells," represents a major fraction of the mature T cells in thymus, the major T cell subpopulation in murine liver, and up to 5% of splenic T cells in some mouse strains.

Murine and human invariant T cells produce large amounts of the immunoregulatory cytokines IL-4 (a Th2 effector) and IFN- $\gamma$  (a Th1 effector) *in vivo* in response to an anti-CD3 antibody or CD1d. These cytokines allow the cells to participate in both Th2 and Th1 responses. The role of invariant T cells in augmenting the Th2 response, which appears to be protective in some autoimmune diseases, is further supported by the presence of defects in invariant T cells in a number of human and murine models of autoimmune diseases, including type 1 diabetes. Thus, alterations in the balance between Th1 and Th2 responses induced by invariant T cells may play a role in the development of autoimmune diseases.

Invariant T cells can also promote rapid Th1 immune responses and anti-tumor responses. Invariant T cells, which comprise a major fraction of the T cells in murine liver, can be stimulated by IL-12 to become active cytotoxic T cells and protect against liver metastases in tumor models. This conclusion was confirmed genetically through the generation of J $\alpha$ 281 knockout mice, which do not express the invariant V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 TCR. These mice had markedly diminished numbers of invariant T cells

WO 01/98357

PCT/US01/19670

and could not mediate IL-12 induced tumor rejection. Other studies showed that IL-12 administration no longer induced an early IFN- $\gamma$  response in the spleen and liver of CD1d knockout mice, which are invariant T cell deficient. In addition, data from human patients shows  
5 fewer invariant NK T cells and reduced Th1-like responses in patients with advanced cancer. The anti-tumor response of activated invariant T cells could be partially mediated by their CD1d specific cytotoxicity and NK/LAK cell-like toxicity. Other regulatory functions of invariant T cells, possibly through cytokine production or interactions with antigen  
10 presenting cells (APCs), may also play important roles in anti-tumor immune responses.

Invariant T cells may also have a role in the pathogenesis of spontaneous abortion. Stimulation of decidual invariant T cells in mice by administration of a ligand for invariant T cells provoked abortion in  
15 pregnant mice. The perforin-dependent killing and production of IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  by the invariant T cells were required for this induction of abortion.

In contrast to human peripheral blood in which invariant T cells are the major CD1d-reactive subpopulation, human and mouse bone marrow  
20 and human liver have T cell populations dominated by CD1d-reactive noninvariant T cells using diverse TCRs which can also produce a large amount of IL-4 and IFN- $\gamma$ . These CD1d-reactive noninvariant T cells can be either NK or non-NK T cells, and they function similarly to CD1d-reactive invariant T cells. The CD1d-reactive noninvariant T cells in  
25 bone marrow may have a role in suppressing graft versus host disease, and both populations may enhance graft versus leukemia responses. In the liver, these T cells may protect against infections, such as Hepatitis C infections, but may also cause damage due to their Th1 response.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Additionally, we found that CD1d-reactive NK T cells are critical for immune tolerance to antigens in the anterior chamber of the eye, an immune privileged site (Sonoda *et al., supra*). Such mechanisms may also be important in the maintenance of peripheral tolerance.

- 5 Parasitic glycosyl-phosphatidylinositols derived from *Plasmodium*, *Trypanosoma*, or *Leishmania* have been recently shown to stimulate murine CD1d-reactive invariant V $\alpha$ 14 NK T cells. In addition, an  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) lipid, which was isolated from marine sponge in a screen for anti-tumor activity, is a CD1d-presented antigen.
- 10  $\alpha$ -GalCer is an example of an agent which can be used to expand human CD1d-reactive invariant T cells from umbilical cord or peripheral blood samples that are first enriched for invariant T cells by purification using an anti-V $\alpha$ 24 antibody. The enriched V $\alpha$ 24<sup>+</sup> cells are cocultured in the presence of  $\alpha$ -GalCer and purified antigen-presenting cells (APCs).
- 15 However, it would be desirable in a clinical setting to use a improved method of expanding invariant T cells that does not require a two step complex protocol or the presence of antigen-presenting cells, which may be not work under certain conditions.

- There exists a need to specifically monitor and alter the population of
- 20 T cells and, more specifically, specific subpopulations of T cells in mammals for the prevention and treatment of diseases and disorders such as autoimmune diseases, infections, allergies, asthma, inflammatory conditions, spontaneous abortion, pregnancy, graft versus host disease, and cancers.

25

#### Summary of the Invention

We have discovered and reduced to practice a method for making antibodies which allow the selective identification and expansion or

WO 01/98357

PCT/US01/19670

activation of specific T cell subgroups. In particular, the invention features antibodies which recognize and expand T cells having specific TCR sequences. These antibodies may be used for diagnosing, preventing, stabilizing, and treating a variety of diseases including cancers and autoimmune diseases.

Accordingly, in one aspect, the invention features a purified antibody that preferentially binds a T cell antigen receptor (TCR). This antibody preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCR; or preferentially binds or modulates (*e.g.*, increases or decreases) the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. In a related aspect, the invention features a combination of purified antibodies (*e.g.*, a mixture of 2, 3, 4, or 5 antibodies) that together preferentially bind a T cell antigen receptor (TCR). In combination, these antibodies preferentially bind a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCR; or preferentially modulate the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. A desirable antibody combination include a mixture of one of the following pairs of antibodies: (i) an anti-V $\alpha$ 24 antibody and an anti-CD161 antibody; (ii) an anti-V $\alpha$ 24 antibody and an anti-CD94 antibody; (iii) an anti-V $\beta$ 11 antibody and an anti-CD161 antibody; or (iv) an anti-V $\beta$ 11 antibody and an anti-CD94 antibody. Desirably, these antibody combinations preferentially bind or preferentially modulate the expansion or activation of CD1d-reactive T cells.

In desirable embodiments, the antibody or antibody combination preferentially binds an invariant T cell. In another desirable embodiment, NK T cells that are bound by the antibody or antibody combination are

WO 01/98357

PCT/US01/19670

CD1d-reactive T cells, invariant T cells, CD1d-reactive noninvariant T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells. In yet other desirable embodiments, the antibody or antibody combination preferentially binds the antigen binding site of a TCR. Desirably, the NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells  
5 are invariant T cells. Desirably, the CDR3-loop,  $\alpha$ - $\beta$  junction, or antigen binding site of a TCR is expressed on a NK T cell, CD1d-reactive T cell, or  $J\alpha Q^+$  T cell. In still other desirable embodiments, the antibody or antibody combination preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR expressed on a NK T cell, CD1d-  
10 reactive T cell, or  $J\alpha Q^+$  T cell, and the antibody or antibody combination preferentially modulates the expansion or activation of the bound T cell. Desirably, a T cell expressing a TCR that is bound by the antibody or antibody combination is expanded in the presence of the antibody. In another desirable embodiment, the binding of the CDR3-loop,  $\alpha$ - $\beta$   
15 junction, or antigen binding site of a TCR expressed on a T cell is sufficient to quantify the T cells, the CDR3-loops,  $\alpha$ - $\beta$  junctions, or the antigen binding sites. In desirable embodiments, a second antibody is used to distinguish different T cell subpopulations bound by the antibody of the invention. In one embodiment, the antibody is a bifunctional  
20 antibody. In one embodiment, the antibody is a polyclonal or monoclonal antibody. In a desirable embodiment, the antibody is covalently linked to a toxin, therapeutically active compound, enzyme, cytokine, radiolabel, fluorescent label, magnetic label, or affinity tag. Desirable antibodies have a constant region found in a mammal other than the mouse, such as a  
25 human. Desirably, the antibody is humanized.

In a related aspect, the invention provides a fragment or derivative of an antibody, wherein the antibody preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion

WO 01/98357

PCT/US01/19670

or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. Desirable fragments include ScFv, Fab, and  $F(ab')_2$  fragments.

In another aspect, the invention provides a bifunctional antibody including (a) an antibody of the invention or a fragment of the antibody, and (b) a second antibody or fragment of an antibody that binds a T cell expressing the TCR or that binds a NK T cell, CD1d-reactive T cell, or  $J\alpha Q^+$  T cell that is bound by the antibody or fragment of the invention. Desirably, the second antibody is also an antibody of the invention. In another embodiment, the second antibody is an anti-CD3, anti-CD161, anti-CD28, or anti-CD94 antibody. In a related aspect, the invention features a bifunctional antibody that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. In various embodiments of these aspects, the antibody is a bifunctional anti-CD3 and anti-CD161 antibody, anti-V $\alpha$ 24 and anti-CD161 antibody; anti-V $\alpha$ 24 and anti-CD94 antibody; anti-V $\beta$ 11 and anti-CD161 antibody; anti-V $\beta$ 11 and anti-CD94 antibody; anti-CD3 and anti-CD94 antibody, anti-CD3 and anti-CD28; or anti-V $\alpha$ 24 and anti-V $\beta$ 11 antibody. In particular embodiments, the bifunctional antibody preferentially binds, expands, or activates CD1d-reactive T cells.

In yet another aspect, the invention provides a stable hybridoma that produces an antibody of the invention.

The antibodies of the invention may be used to purify T cell subpopulations. Thus, the invention also features a purified T cell subpopulation. The T cells in the subpopulation are specifically bound by an antibody or antibody combination of the invention. Desirably, the

WO 01/98357

PCT/US01/19670

antibody or antibody combination specifically binds the CDR3-loop,  $\alpha$ - $\beta$  junction, or the antigen binding site of a TCR expressed on the subpopulation of T cells. In a desirable embodiment, the T cells in the subpopulation are NK T cells. Desirable NK T cells include CD1d-  
5 reactive T cells, invariant T cells, CD1d-reactive noninvariant T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. In another desirable embodiment, the T cells are CD1d-reactive T cells. In yet another desirable embodiment, the T cells are  $J\alpha Q^+$  T cells. Desirably, the NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells are invariant T cells.

10 The invention also provides methods for generating an antibody of the invention that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. One such method includes (a)  
15 coupling a cyclic peptide to a carrier, (b) immunizing an animal with the coupled peptide, and (c) isolating an antibody that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T  
20 cells. Desirably, step (b) is repeated. In other desirable embodiments, the animal is a CD1 or invariant T cell deficient mammal or bird.

In a related aspect, the invention provides another method of generating an antibody of the invention. This method includes (a)  
immunizing an animal (*e.g.*, a mammal or a bird) with NK T cells, CD1d-  
25 reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells, and (b) isolating an antibody that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-

WO 01/98357

PCT/US01/19670

reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. Desirably, step (a) is repeated. In one desirable embodiment, invariant T cells are administered to a CD1 or invariant T cell deficient animal.

In another related aspect, the invention features a method of  
5 generating an antibody of the invention. This method involves (a) coupling a cyclic peptide to a carrier, (b) immunizing an animal (*e.g.*, a mammal or a bird) with the coupled peptide, (c) immunizing the animal with NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells, and (d) isolating an antibody that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a  
10 TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. Desirably, step (b) or (c) is repeated. In one desirable embodiment, invariant T cells are administered to a CD1 or invariant T cell deficient animal.

In still another related aspect, the invention provides a method of  
15 generating an antibody of the invention by (a) immunizing an animal (*e.g.*, a mammal or a bird) with NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells, (b) coupling a cyclic peptide to a carrier, and (c) immunizing the animal with the coupled peptide, and (d) isolating an antibody that  
20 preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. Desirably, step (a) or step (c) is repeated. In one desirable embodiment, invariant T cells are administered  
25 to a CD1 or invariant T cell deficient animal.

In desirable embodiments of the methods of generating an antibody, the animal (*e.g.*, mammal or bird) is a CD1 or invariant T cell deficient animal, a CD1d knockout mouse, an animal in which invariant T cells

WO 01/98357

PCT/US01/19670

have been removed, an animal lacking part of the TCR- $\alpha$  chain, or an animal lacking part of the TCR- $\beta$  chain. In other desirable embodiments, the animal is tolerized to NK T cells, CD1d-reactive T cells, J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells, invariant T cells, or the invariant TCR. In other desirable embodiments, 5 the animal lacks all or part of the V $\alpha$ 14 or J $\alpha$ 281 molecule. It is also contemplated that another animal with a reduced amount or lacking NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells may be used.

The antibodies, bifunctional antibodies, fragments of antibodies, and derivatives of antibodies of the present invention have a variety of 10 diagnostic, imaging, and therapeutic applications.

In one such aspect, the invention provides a method of measuring the amount of NK TCRs or the amount of NK T cells in a sample by contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention. Desirably, the antibody or antibody combination preferentially 15 binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCRs. In another embodiment, the antibody is a bifunctional antibody that binds both CD3 and CD161 expressed on the same T cell.

In a related aspect, the invention features a method of measuring the amount of CD1d-reactive TCRs or the amount of CD1d-reactive T 20 cells in a sample. This method involves contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention. Desirably, the antibody or antibody combination preferentially binds a CDR3-loop, an  $\alpha$ - $\beta$  junction, or an antigen binding site of the TCRs. In various embodiments, the antibody is a bifunctional anti-V $\alpha$ 24 and anti-CD161 25 antibody; anti-V $\alpha$ 24 and anti-CD94 antibody; anti-V $\beta$ 11 and anti-CD161 antibody; anti-V $\beta$ 11 and anti-CD94 antibody; anti-CD3 and anti-CD94 antibody, anti-CD3 and anti-CD28; or anti-V $\alpha$ 24 and anti-V $\beta$ 11 antibody.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

In another related aspect, the invention features a method of measuring the amount of  $J\alpha Q^+$  TCRs or the amount of  $J\alpha Q^+$  T cells in a sample by contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention. In one desirable embodiment, the antibody  
5 preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCRs.

In desirable methods of measuring the amount of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells in a sample, the sample is from a subject involved in a clinical trial of a therapy or undergoing a therapy for  
10 a condition selected from the group consisting of autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, and cancer. Desirably, the amount of the TCRs or  
15 the T cells is used to determine the desirable therapy for the treatment or prevention of a condition selected from the group consisting of autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency  
20 disease, spontaneous abortion, pregnancy, and cancer. In another desirable embodiment of these aspects, the amount of the TCRs or the T cells is used to diagnose the recovery or remission from or the efficacy of any therapy for a condition selected from the group consisting of autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection,  
25 infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, pregnancy, and cancer.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

In another aspect, the invention provides a method of visualizing the NK TCRs or the NK T cells in a sample, the method comprising contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention. Desirably, the antibody or antibody combination preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCRs. In another embodiment, the antibody is a bifunctional antibody that binds both CD3 and CD161 expressed on the same T cell.

In a related aspect, the invention features a method of visualizing the CD1d-reactive TCRs or the CD1d-reactive T cells in a sample by contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention. In one desirable embodiment, the antibody or antibody combination preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCRs. Desirably, the antibody or antibody combination preferentially binds a CDR3-loop, an  $\alpha$ - $\beta$  junction, or an antigen binding site of the TCRs. In various embodiments, the antibody is a bifunctional anti-V $\alpha$ 24 and anti-CD161 antibody; anti-V $\alpha$ 24 and anti-CD94 antibody; anti-V $\beta$ 11 and anti-CD161 antibody; anti-V $\beta$ 11 and anti-CD94 antibody; anti-CD3 and anti-CD94 antibody, anti-CD3 and anti-CD28; or anti-V $\alpha$ 24 and anti-V $\beta$ 11 antibody.

In another related aspect, the invention provides a method of visualizing the J $\alpha$ Q<sup>+</sup> TCRs or the J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells in a sample. This method includes contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention. Desirably, the antibody or antibody combination preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCRs.

In desirable embodiments of measuring or visualizing NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells in a sample, the sample is from a transgenic animal or is an autopsy tissue. Desirably, the antibody is

WO 01/98357

PCT/US01/19670

covalently bound to a fluorescent label, radiolabel, or magnetic label (*e.g.*, a magnetic bead).

In another aspect, the invention provides a method of identifying a subject at risk for a condition selected from the group consisting of  
5 autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, and cancer. This method includes (a) quantitating the amount of a subpopulation of T cells in a  
10 sample from the subject, and (b) comparing the amount of the T cells in the sample to the amount of the T cells found in subjects diagnosed with the condition or subjects not diagnosed with the condition. Desirably, the amount of the T cells in the sample is compared to the amount of the T cells found in both subjects diagnosed with the condition and subjects not  
15 diagnosed with the condition. In one desirable embodiment, the method further includes comparing the amount of another T cell type in the sample with the amount of the another T cell type found in subjects diagnosed with the condition or subjects not diagnosed with the condition.

Desirably, the amount of the another T cell type in the sample is compared  
20 to the amount of the another T cell type found in both subjects diagnosed with the condition and subjects not diagnosed with the condition. In various embodiments, the amount of the subpopulation of T cells in a sample is determined by contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention, such as an antibody or antibody  
25 combination that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the T cells; or that preferentially binds NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

In a related aspect, the invention provides a method of diagnosing or staging a subject with a condition selected from the group consisting of autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, and cancer. This method includes (a) quantitating the amount of a subpopulation of T cells in a sample from the subject, and (b) comparing the amount of the T cells in the sample to the amount of the T cells found in subjects diagnosed with the condition or subjects not diagnosed with the condition. Desirably, the amount of the T cells in the sample is compared to the amount of the T cells found in both subjects diagnosed with the condition and subjects not diagnosed with the condition. In one desirable embodiment, the method further includes comparing the amount of another T cell type in the sample with the amount of the other T cell type found in subjects diagnosed with the condition or subjects not diagnosed with the condition. Desirably, the amount of the other T cell type in the sample is compared to the amount of the other T cell type found in both subjects diagnosed with the condition and subjects not diagnosed with the condition. In various embodiments, the amount of the subpopulation of T cells in a sample is determined by contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention, such as an antibody or antibody combination that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the T cells; or that preferentially binds NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells.

In desirable embodiments of any of the above aspects, the sample is peripheral blood, lymphatic fluid, ascitic fluid, umbilical cord blood, urine, fecal matter, bone marrow, bile, or a biopsy sample. It is also

WO 01/98357

PCT/US01/19670

contemplated that any other sample from a mammal may be used, such as other blood or tissue samples.

In another aspect, the invention features a method of treating or preventing an autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, 5 parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, or cancer in an animal. This method includes administering to the animal an antibody or antibody combination of the invention. Desirably, the antibody or 10 antibody combination is administered to the animal intraarticularly, intralesionally, orally, intramuscularly, intravenously, subcutaneously, or intraperitoneally. In another desirable embodiment, the antibody or antibody combination is administered with a pharmaceutically suitable carrier. In one desirable embodiment, a cytokine is also administered to 15 the animal. In another desirable embodiment, a cell type or other agent which works in concert with the antibodies is also administered to the animal.

In yet another aspect, the invention provides a method of inhibiting T cell pathogenesis in an animal by administering to the animal an 20 antibody or antibody combination of the invention. The administration of the antibody or antibody combination is sufficient to inhibit a T cell expressing a TCR bound by the antibody or antibody combination, a NK T cell, a CD1d-reactive T cell, or a  $J\alpha Q^+$  T cell. Desirably, the antibody or antibody combination preferentially binds a CDR3-loop, an antigen 25 binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR of a NK T cell, a CD1d-reactive T cell, or a  $J\alpha Q^+$  T cell. In another desirable embodiment, the antibody or antibody combination inhibits the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T

WO 01/98357

PCT/US01/19670

cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. In another desirable embodiment, the antibody or antibody combination is covalently linked to a toxin, a radiolabel, or a molecule which targets host defensive or catabolic processes toward the cells. Desirably, the antibody or antibody combination is administered to  
5 the animal orally, intramuscularly, intravenously, intraarticularly, intralesionally, subcutaneously, intraperitoneally, intrasessionally, or by any other route sufficient to provide a dose adequate to inhibit the T cell. In another desirable embodiment, the antibody or antibody combination is administered with a pharmaceutically suitable carrier. In one desirable  
10 embodiment, one or more cytokines are also administered to the animal. In another embodiment, the T cell pathogenesis is a response of a T cell to a viral infection, such as a Hepatitis infection, picornavirus infection, polio infection, or coxsackie infection.

In another aspect, the invention provides a method of increasing the  
15 size of a subpopulation of T cells by contacting a sample having T cells with an antibody or antibody combination of the invention.

In a related aspect, the invention features a method of increasing the size of a subpopulation of T cells. This method includes (a) contacting a sample comprising the T cells with an antibody or antibody combination  
20 of the invention under conditions that allow complex formation between the T cells and the antibody or antibody combination, (b) isolating the complex, and (c) contacting the T cells in the complex or recovered from the complex with an antibody or antibody combination of the invention under conditions that allow the contacting to increase the number of the T  
25 cells.

In another aspect, the invention provides a method of increasing the size of a subpopulation of T cells. This method includes (a) contacting a sample comprising the T cells with an antibody or antibody combination

WO 01/98357

PCT/US01/19670

of the invention under conditions that allow complex formation between the T cells and the antibody or antibody combination, (b) isolating the complex, and (c) contacting the T cells in the complex or recovered from the complex with an antigen and antigen presenting cells under conditions  
5 that allow the contacting to increase the number of the T cells. Desirably, the antigen is  $\alpha$ -galactosylceramide, a lipid or glycosyl-phosphatidylinositol antigen from an infectious pathogen, an antigen from a cancerous cell, a self-lipid, or any other antigen from endogenous or non-physiological sources.

10 In yet another aspect, the invention features a method of increasing the size of a subpopulation of T cells. This method includes (a) purifying the T cells from a sample comprising the T cells and (b) contacting the purified cells with an antibody or antibody combination of the invention under conditions that allow the contacting to increase the number of the T  
15 cells.

In desirable embodiments of the methods of increasing the size of a subpopulation of T cells, the method further includes contacting the sample or the complex with one or more cytokines or other cells that work in concert with the antibody or antibody combination.

20 In another aspect, the invention provides a method of increasing the size of a subpopulation of T cells in an animal. This method includes (a) obtaining a sample comprising the T cells from the animal, (b) contacting the T cells with an antibody or antibody combination of the invention under conditions that allow the contacting to increase the number of the T  
25 cells, and (c) administering the contacted T cells to the animal.

In a related aspect, the invention provides a method of increasing the size of a subpopulation of T cells in an animal. This method includes (a) obtaining a sample comprising the T cells from the animal, (b) purifying

WO 01/98357

PCT/US01/19670

the T cells, (c) contacting the T cells with an antibody or antibody combination of the invention under conditions that allow the contacting to increase the number the T cells, and (d) administering the contacted T cells to the animal. Desirably, the purification of the T cells includes  
5 contacting the sample with an antibody or antibody combination of the invention. In a desirable embodiment, the purification of the T cells includes contacting the sample with an anti-V $\alpha$ 24, CD4, CD8, CD56, CD161, or V $\beta$ 11 antibody. It is also contemplated that another antibody or combination of antibodies that binds a T cell may be used to purify the  
10 cells.

In yet another aspect, the invention provides a method of increasing the size of a subpopulation of T cells in an animal. This method includes (a) obtaining a sample comprising the T cells from the animal, (b) contacting the T cells with an antibody or antibody combination of the  
15 invention under conditions that allow complex formation between the T cells and the antibody, (c) isolating the complex, and (d) contacting the T cells in the complex or recovered from the complex with an antibody or antibody combination of the invention under conditions that allow the contacting to increase the number of the T cells, and (e) administering the  
20 contacted T cells to the animal.

In still another aspect, the invention features a method of increasing the size of a subpopulation of T cells in an animal. This method includes (a) obtaining a sample comprising the T cells from the animal, (b) contacting the T cells with an antibody or antibody combination of the  
25 invention under conditions that allow complex formation between the T cells and the antibody or antibody combination, (c) isolating the complex, and (d) contacting the T cells in the complex or recovered from the complex with an antigen and antigen presenting cells under conditions that

WO 01/98357

PCT/US01/19670

allow the contacting to increase the number of the T cells, and  
(e) administering the contacted T cells to the animal. Desirably, the  
antigen is  $\alpha$ -galactosylceramide, a lipid or glycosyl-phosphatidylinositol  
antigen from an infectious pathogen, an antigen from a cancerous cell, a  
5 self-lipid, or any other antigen from endogenous or non-physiological  
sources.

In desirable embodiments of the methods for increasing the size of a  
subpopulation of T cells in an animal, the methods also include  
administering one or more cytokines to the animal. Desirably, the  
10 cytokine is administered to the animal before, during, or after the  
contacted T cells are administered to the animal. In desirable  
embodiments, the cytokine is administered intramuscularly, intravenously,  
intraarticularly, intralesionally, subcutaneously, or by any other route  
sufficient to provide a dose adequate to modulate the activity of a T cell.  
15 Desirably, the sample or the T cells are contacted with one or more  
cytokines. Desirably, the methods of these aspects are used in the  
treatment or prevention of an autoimmune disease, viral infection,  
bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen,  
allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft  
20 rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, or  
cancer in the animal.

In another aspect, the invention provides a method of purifying a  
subpopulation of T cells from a sample by contacting the sample with an  
antibody or antibody combination of the invention.

25 In a related aspect, the invention provides a method of purifying a  
subpopulation of T cells from a sample. This method includes (a)  
contacting the sample with an antibody or antibody combination of the  
invention under conditions that allow complex formation between the T

WO 01/98357

PCT/US01/19670

cells and the antibody, and (b) isolating the complex. Desirably, the sample is also contacted with an anti-V $\alpha$ 24, CD4, CD8, CD56, CD161, or V $\beta$ 11 antibody. In another embodiment, the sample is contacted with any other antibody that binds a related T cell subset. Desirably, the method  
5 also includes recovering the T cells from the complex. In one desirable embodiment, the antibody is covalently linked to a fluorescent label, and the complex is isolated based on the fluorescence signal of the complex. In another desirable embodiment, the antibody is covalently linked to a magnetic label, and the complex is isolated based on the magnetism of the  
10 complex.

In desirable embodiments of every aspect of the invention, the cytokine that is contacted with the sample, T cells, or complex or the cytokine that is administered to the animal is selected from the group consisting of IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IFN- $\alpha/\beta$ ,  
15 IFN- $\gamma$ , and GM-CSF. It is also contemplated that any other cytokine or combination of cytokines may be used. Desirably, the cytokine alters the ratio of Th1/ Th2/immune deviation response by the contacted T cells. Desirably, the subject or the animal is a human. Other desirable animals include mammals and birds of laboratory or veterinary interest such as  
20 mice, rats, rabbits, pigs, goats, cattle, sheep, horses, chickens, and turkeys. In desirable embodiments, the viral infection relevant to the methods of the invention is a Hepatitis infection, picornavirus infection, polio infection, HIV infection, or coxsackie infection. In other embodiments, the autoimmune disease is type 1 diabetes.

25 In desirable embodiments of each method of the invention, the antibody or antibody combination preferentially binds an invariant T cell. Desirably, the T cell subpopulation, T cells, or T cell expressing the TCR are NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells. Desirable NK T

WO 01/98357

PCT/US01/19670

cells are CD1d-reactive T cells, invariant T cells, CD1d-reactive noninvariant T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells. Desirable CD1d-reactive T cells or  $J\alpha Q^+$  T cells are invariant T cells. Desirable  $J\alpha Q^+$  T cells are  $V\alpha 24^+ J\alpha Q^+$  T cells. Desirably, the antibody or antibody combination preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR expressed on the T cell and preferentially binds or modulates the expansion or activation of the bound T cell. Desirably, the antibody or antibody combination preferentially binds or modulates the expansion or activation of only one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells. Desirably a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR bound by an antibody or antibody combination of the invention is expressed by a NK T cell, CD1d-reactive T cell,  $J\alpha Q^+$  T cell, or invariant T cell. In other desirable embodiments, an antibody that binds or modulates the expansion or activation a T cell subpopulation of interest (*e.g.*, NK T cells, CD1d-reactive T cells,  $J\alpha Q^+$  T cells, or invariant T cells) preferentially binds the antigen binding site of the TCR of the T cell subpopulation of interest. It is also contemplated that the invariant T cells relevant to any of the aspects of the invention may not be CD1d-reactive. Desirable labeled antibodies include antibodies bound to biotin, FITC, PE, or a magnetic bead.

It should be understood that each of the aspects of the invention apply equally to the antibodies, bifunctional antibodies, fragments of antibodies, and derivatives of antibodies of the invention. Each of the aspects of the invention also apply equally to a combination of antibodies that together preferentially bind a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCR. In various embodiments, the antibodies in an antibody combination of the invention are simultaneously or sequentially contacted with NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells or with a sample containing

WO 01/98357

PCT/US01/19670

NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells. In other embodiments, the antibodies in an antibody combination of the invention are simultaneously or sequentially administered to an animal for the treatment or prevention of a disease or condition.

5 Each aspect of the invention also applies to any antigen-specific oligoclonally expanded T cell subpopulation encountered in animals (*e.g.*, humans, other mammals, and birds) in response to a given antigenic challenge. These antigen-specific oligoclonally expanded T cell subpopulations include those T cells oligoclonally expanded in response to  
10 an immunodominant component of the antigen in multiple individuals.

It is also noted that the presentation of an antigen to a T cell of interest does not require an antigen presenting cell (APCs). For example, a soluble or immobilized form of an antigen-presenting molecule may be used to present an antigen to a T cell or a sample containing a T cell of  
15 interest under conditions that allow the activation or expansion of the T cell without the presence of an APC.

By "CDR3 loop" is meant the amino acids in the junction that is generated by rearrangement between a V segment and a J segment of a TCR- $\alpha$  chain or by rearrangement between a V segment, a D segment, and  
20 a J segment of a TCR- $\beta$  chain. Identification of the CDR3 loop is simplified by the presence of a conserved cysteine at the end of the V segment. The first amino acid after this cysteine is the first residue of the CDR3 loop.

The sequence of a CDR3 loop can be readily identified based on a  
25 sequence alignment of the amino acid sequence of a TCR of interest with one or more sequences of other TCRs. For example, a Kabat table which contains an alignment of the amino acid sequence of numerous T cell receptors may be used to identify the CDR3 loop in a TCR- $\alpha$  chain or - $\beta$

WO 01/98357

PCT/US01/19670

chain of interest (Johnson and Wu, Nuc. Acid. Res. 29(1):205-206, 2001; <http://immuno.bme.nwu.edu>). The CDR3 loop may also be identified based on a sequence alignment with one or more TCRs for which the CDR3 loop has been identified based on the x-ray crystal structure  
5 (Reinherz *et al.*, Science 286(5446):1913-1921, 1999). Additionally, the CDR3 loop may be identified by determining the three-dimensional structure of the TCR chain of interest.

By "antibody that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR," is meant an antibody which  
10 recognizes and binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR or which recognizes and binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR expressed on a T cell, but which does not substantially recognize and bind other molecules in a sample, *e.g.*, a biological sample, which naturally includes other protein or cells.  
15 The signal in the ELISA assay described in Example 1 for the binding of the antibody to a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR expressed on a T cell is desirably at least 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, or 500 times greater than that for the binding to a control cell that is not a T cell or to a T cell that expresses  
20 TCRs with CDR3-loops,  $\alpha$ - $\beta$  junctions, and antigen binding sites with amino acid sequences that are less than 99, 95, 90, 85, 80, 70, 60, 50, 40, or 20 % identical to the corresponding sequence of the CDR3-loop,  $\alpha$ - $\beta$  junction, or antigen binding site preferentially bound by the antibody.  
Humanized or other species forms of the antibody may be generated using  
25 standard techniques.

Desirably, the antibody is "purified," meaning it has been separated from other components that naturally accompany it. Typically, the antibody is substantially pure when it is at least 50%, by weight, free from

WO 01/98357

PCT/US01/19670

proteins, antibodies, and naturally-occurring organic molecules with which it is naturally associated. Desirably, the antibody is at least 75%, more desirably, at least 90%, and most desirably, at least 99%, by weight, pure. A substantially pure antibody that preferentially binds a CDR3-loop,  $\alpha$ - $\beta$  junction, or an antigen binding site of a TCR may be obtained, for example, by using a method of the present invention to immunize a mammal for the generation of the antibody, by construction of hybridoma secreting the antibody, by chemically synthesizing the antibody, or by separation of the antibody from natural sources. Purity can be assayed by any appropriate method, as described below for the isolation of antibodies.

By " $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR" is meant the interface between the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of a TCR. The interface includes noncovalent interactions between the variable domains of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains. Desirably, the three-dimensional structure of the  $\alpha$ - $\beta$  junction or a model of the three-dimensional structure of the  $\alpha$ - $\beta$  junction is used in the design of polypeptides or small molecules for immunizing a mammal to generate an antibody to the  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCR. Several three-dimensional structures of the interface between  $\alpha$  and  $\beta$  chains of a TCR have been reported and may be used by one skilled in the art to model the interface of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of a TCR expressed by a NK, CD1d-reactive, J $\alpha$ Q $^+$ , or invariant T cell. For example, based on the modeled or actual structure of the interface of the  $\alpha$  and  $\beta$  chains, a small molecule may be designed that has a three-dimensional structure similar to that of an exposed region of the interface. Additionally, a polypeptide may be designed that has a three-dimensional structure similar to that of a portion or all of the  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR. For example, a modeled or actual structure of a TCR of interest may be used to obtain a modeled or actual structure of the  $\alpha$ - $\beta$  junction of the TCR which can then be mimicked by a designed

WO 01/98357

PCT/US01/19670

polypeptide (e.g., a polypeptide of approximately 100 amino acids).

Covalent bonds or linkers may be added between the domains of the designed polypeptide so that a single chain polypeptide is generated. For these modeling procedures, any standard modeling program, such as

5 MolScript, may be used.

Similarly, these methods may be used to generate antibodies that preferentially bind the  $\gamma$ - $\delta$  junction of a TCR of interest.

By "antigen binding site of a TCR" is meant the region of a TCR that binds an antigen. This region includes part of the exposed surface of  
10 the variable region of the TCR. For example, the antigen binding site contains the CDR3-loop of the  $\alpha$  chain, the CDR3-loop of the  $\beta$  chain, a predictable portion of the CDR1-loops, a predictable portion of the CDR2-loops, and some nearby structural surfaces.

Desirably, the three-dimensional structure of the antigen binding  
15 site or a model of the three-dimensional structure of the antigen binding site is used in the design of polypeptides or small molecules for immunizing a mammal to generate an antibody to the antigen binding site of the TCR. Several three-dimensional structures of antigen binding sites of TCRs have been reported (in the presence or absence of an antigen) and  
20 may be used by one skilled in the art to model the antigen binding site of a TCR expressed by a NK, CD1d-reactive, J $\alpha$ Q<sup>+</sup>, or invariant T cell.

Additionally, a modeled or actual structure of CD1d could be used to determine how other compounds would interact with CD1d-reactive T cells. Based on the modeled or actual structure of an antigen binding site,  
25 a small molecule or polypeptide may be designed that has a three-dimensional structure similar to that of a portion or all of the antigen binding site. For example, a modeled or actual structure of a TCR of interest may be used to obtain a modeled or actual structure of the antigen

WO 01/98357

PCT/US01/19670

binding site of the TCR which can then be mimicked by a designed polypeptide (*e.g.*, a polypeptide of approximately 100 amino acids). Covalent bonds or linkers may be added between the domains of the designed polypeptide so that a single chain polypeptide is generated. For  
5 these modeling procedures, any standard modeling program, such as MolScript, may be used.

By "invariant T cell" is meant a T cell having a CD1d-reactive invariant T cell antigen receptor. By "human CD1d-reactive invariant T cell antigen receptor" is meant a T cell antigen receptor that recognizes  
10 CD1d and has an alpha chain that is generated from a rearrangement between V $\alpha$ 24 and J $\alpha$ Q that produces little or no N-region diversity (Kent *et al.*, Human Immunology 60:1080-1089, 1999). In mice, the invariant TCR- $\alpha$  chain is generated from a rearrangement between V $\alpha$ 14 and J $\alpha$ 281 that produces little or no N-region diversity. The equivalent  
15 rearrangement may occur in other mammals (*e.g.*, rats) and in birds. Although human invariant TCR- $\alpha$  chain pairs preferentially with V $\beta$ 11, it can pair with other V $\beta$ s. The human CD1d-reactive invariant T cell antigen receptor recognizes CD1d, but not the closely related CD1a, CD1b, or CD1c family members (Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186(1):109-  
20 120, 1997).

By "fragment" is meant a polypeptide having a region of consecutive amino acids that is identical to the corresponding region of an antibody of the invention. The fragment has the ability to bind, activate, and/or expand T cells *ex vivo* or *in vivo*, as determined using the assays  
25 described herein. Desirably, the number, activity, or purity of the expanded cells is at least 20, 40, 60, 80, or 90% of that produced by an antibody of the invention, as measured using the assays provided herein. Desirably, the binding of the fragment to the CDR3-loop,  $\alpha$ - $\beta$  junction, or

WO 01/98357

PCT/US01/19670

antigen binding site of a TCR is at least 20, 40, 60, 80, or 90% of that of an antibody of the invention.

By "derivative" is meant an antibody or fragment of the invention that is modified chemically or through gene fusion technology or chemical synthesis so that it is covalently linked to a toxin, therapeutically active compound, enzyme, cytokine, radiolabel, fluorescent label, or affinity tag. The covalently linked group can be attached to the amino terminus, carboxy terminus, between the amino and carboxy termini, or to a side chain of an amino acid in the antibody or fragment. By "affinity tag" is meant a peptide, protein, or compound that binds another peptide, protein, or compound. In a desirable embodiment, the affinity tag is used for purification or immobilization of the derivative. In another desirable embodiment, the affinity tag or toxin is used to target the antibody or fragment to a specific cell, tissue, or organ system *in vivo*. In still another desirable embodiment, the fluorescent or radiolabel is used for imaging of the derivative. In yet another desirable embodiment, the therapeutically active compound or radiolabel is used for the treatment or prevention of a disease or disorder. In another embodiment, the derivative or fragment of an antibody of the invention has increased stability or increased solubility compared to the antibody. It is also contemplated that the antibody, fragment, or derivative of the invention may be bound non-covalently to another antibody covalently linked to a toxin, therapeutically active compound, enzyme, cytokine, radiolabel, fluorescent label, magnetic label, or affinity tag.

By "humanized" is meant alteration of the amino acid sequence of an antibody so that fewer antibodies and/or immune responses are elicited against the humanized antibody when it is administered to a human. For

WO 01/98357

PCT/US01/19670

the use of the antibody in a mammal other than a human, an antibody of the invention may be converted to that species format.

By "bifunctional antibody" is meant an antibody that includes an antibody or a fragment of an antibody covalently linked to another antibody or another fragment of an antibody. Desirably, both antibodies or fragments bind to different epitopes expressed on the same T cell. Desirably, at least one antibody included in the bifunctional antibody is an antibody of the invention. Desirably, the antibody binds CD3, CD161, or both CD3 and CD161. In other desirable embodiments, the antibody binds one or more of the following: V $\alpha$ 24, CD94, V $\beta$ 11, and anti-CD28.

By "cyclic peptides" is meant a non-linear peptide having an amino acid sequence at least 60%, desirably 80%, more desirably 90%, and most desirably 100% identical to a region in the CDR3 loop of a TCR. In one desirable embodiment, the amino acid sequence of the peptide includes CVVSDRGSTLGRADCG (SEQ ID NO 1) from the CDR3-loop of the human invariant TCR- $\alpha$  or a region of at least 5, 8, 10, or 15 consecutive amino acids of SEQ ID NO 1. In another desirable embodiment, the amino acid sequence of the peptide is identical to that of SEQ ID NO 1.

The peptide may be cyclized by the formation of a covalent bond between the N-terminal amino group of the peptide or the side-chain of residue and the C-terminal carboxyl group or the side-chain of a residue. For example, a peptide lactam may be formed by the cyclization between the N-terminal amino group or an amino group of an amino acid side-chain and the C-terminal carboxyl group or a carboxyl or amide containing side-chain, such as that of glutamic, aspartic acid, glutamine, or asparagine. Other possible cyclizations include the formation of a thioether by the reaction of a thiol group in a cysteine side-chain with the N-terminal amino group, C-terminal carboxyl group, or the side-chain of another amino acid. A

WO 01/98357

PCT/US01/19670

disulfide bond may also be formed between two cysteine residues. It is also contemplated that a peptide having an amino acid sequence at least 60%, desirably 80%, more desirably 90%, and most desirably 100% identical to a region of another loop or exposed surface of the alpha or beta chain of the invariant TCR or another TCR may be used for the generation of antibodies to another TCR. Desirable loops include the CDR3-loop of the  $\alpha$  or  $\beta$  chain of a NK T cell, CD1d-reactive T cell, or  $J\alpha Q^+$  T cell.

By "CD1d or invariant T cell deficient mammal" is meant a mammal that when compared to other mammals of the same species has a reduced amount of or lacks functional CD1d molecules, invariant T cells, TCR- $\alpha$  chains, or TCR- $\beta$  chains. Desirable examples of such mammals include a CD1d knockout mouse (Sonoda *et al.*, 1999, *supra*), a mammal not tolerized to the invariant TCR, a mammal in which invariant T cells have been removed, a mammal lacking part of the TCR- $\alpha$  chain (Cui *et al.*, Science 278:1623, 1997), mammal lacking part of the VB8 molecule, or animals deleted of invariant, NK T cells, or related subpopulations by antibodies, cytokines, or repeated antigenic stimulation.

By "immunizing" is meant administering to an animal (*e.g.*, a mammal or a bird) either peptides coupled to carriers, invariant T cells, or both using standard procedures. Desirable routes of administration include intraperitoneally, intramuscular, intradermal, and subcutaneous. The dose and frequency of administration can be determined using standard procedures.

By "isolating antibodies" is meant purifying the antibody from antiserum, ascites fluid, or hybridomas supernatant. The antibodies can be purified by one skilled in the art using standard techniques such as those described by Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, volume 2, p. 11.13.1-11.13.3, John Wiley & Sons, 1995). The antibody is

WO 01/98357

PCT/US01/19670

desirably at least 2, 5, or 10 times as pure as the starting material, as measured using polyacrylamide gel electrophoresis, column chromatography, optical density, HPLC analysis, or western analysis to detect a reduction in the amount of contaminating proteins or ELISA to  
5 detect an increase in specific activity for binding to markers for a particular T cell subpopulation.

By "contacting" is meant incubating a sample with an antibody or cytokine. The antibody or cytokine can be in a soluble form, or it can be immobilized. In one embodiment, the immobilized antibody or cytokine is  
10 tightly bound or covalently linked to a bead or plate. In desirable embodiments, the contact occurs *ex vivo* or *in vivo*.

By "measuring" is meant determining the percentage of cells in a sample that belong to a specific T cell subpopulation or determining the number of cells in a sample that belong to a specific T cell subpopulation,  
15 as described herein. In a desirable embodiment, the T cells are NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells.

By "treating or preventing" is meant administering an antibody of the present invention or T cells that have been incubated with the antibody to a mammal, as described herein.

20 By "T cell pathogenesis" is meant a disease or disorder that is caused or exacerbated by an activity of T cells, such as their cytokine production or cytotoxicity.

By "autoimmune disease" is meant a disease in which an immune system response is generated against self epitopes. Some examples of  
25 autoimmune diseases include insulin dependent diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, pemphigus vulgaris, multiple sclerosis, and myasthenia gravis.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

By "increasing size of a subpopulation of T cells" is meant stimulating the expansion of these cells by incubating them with an antibody or incubating them with an antigen and antigen presenting cells. Desirably, the number of T cells belonging to the subpopulation that are present after this incubation is at least 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 150, or 500 fold greater than the number of these cells present after the corresponding control incubation in the absence of the antibody or the antigen and antigen presenting cells. More desirably, the number of T cells belonging to the subpopulation that are present after this incubation is at least 2, 5, 10, 20, or 50 fold greater than the number of these cells present after the corresponding incubation in the presence of 0.1 - 2  $\mu\text{g/ml}$  phytohemagglutinin (PHA). It is also contemplated that the percentage may remain the same but the actual numbers of the relevant subset may increase if the total number of T cells increases. Desirably, the change in the percentage of cells that belong to the subpopulation of T cells is at least 2, 5, 10, 20, or 50 fold greater than corresponding change in the percentage of cells that belong to the subpopulation of T cells in a control sample that has not be incubated with the antibody. In another desirable embodiment, the T cells are NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $\text{J}\alpha\text{Q}^+$  T cells.

By "preferentially modulating the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $\text{J}\alpha\text{Q}^+$  T cells" is meant inducing or inhibiting the expansion or activation of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $\text{J}\alpha\text{Q}^+$  T cells. The induction of the expansion of these T cell subpopulations may be measured as described for determining the increase in the size of the subpopulation of T cells. The inhibition of the expansion of these T cell subpopulations may be determined by comparing the number of T cells

WO 01/98357

PCT/US01/19670

belonging to the subpopulation after incubation with an antibody of the invention compared to a control incubation without the antibody.

Desirably, the number of T cells belonging to the subpopulation present after incubation with the antibody is 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, or 5 100 fold less than the number of these T cells present after the corresponding control incubation. This inhibition of T cell expansion may be useful in the prevention or treatment of T cell pathogenesis. The induction or inhibition of the activation of a T cell subpopulation may be assayed using standard procedures to measure the cytokine production or 10 cytotoxicity of the T cell subpopulation. Desirably, the increase or decrease in the cytokine production or cytotoxicity is at least 5, 10, 20, 20, 40, 50, 70, 90, or 100% of the activity of the control T cell subpopulation incubated in the absence of the antibody. Desirably, the change in the size or activity of at least one T cell subpopulation selected from the group of 15 NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells is at least 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 150, or 500 times greater than the corresponding change in cells other than NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells. In a desirable embodiment, the antibody preferentially binds or modulates the expansion or activation of only one 20 of the T cell subpopulations selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells.

By "anti-V $\alpha$ 24, CD4, CD8, CD56, CD161, CD94, CD28, or V $\beta$ 11 antibody" is meant an antibody that recognizes and binds V $\alpha$ 24, CD4, CD8, CD56, CD161, CD94, CD28, or V $\beta$ 11 molecules or cells expressing 25 one of these molecules, but which does not substantially recognize and bind other molecules in a sample, *e.g.*, a biological sample, which naturally includes other protein or cells.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

By "obtaining a sample comprising T cells" is meant removing a sample that has T cells from a mammal or acquiring a sample that has these cells and is produced by a mammal. In a desirable embodiment, the sample is peripheral blood. In another embodiment, the sample is a bodily fluid, such as urine, bile, or a bodily tissue. In another embodiment, the sample is a bone marrow or an umbilical cord sample.

By "purifying the T cells" is meant isolating the cells from a sample that naturally contains other cells. The T cells can be purified using an antibody of the invention or an anti-V $\alpha$ 24, CD4, CD8, CD56, CD161, or V $\beta$ 11 antibody in standard procedures. Desirable methods of purification include fluorescence-activated cell sorting (FACS), immunoprecipitation, immunoaffinity chromatography, magnetic bead immunoaffinity purification, and cell panning with a plate-bound antibody. Desirably, the purified T cells are at least 2, 5, 10, 50, 100, 500, or 900 times as pure as the original sample, as measured using ELISA or FACS analysis to detect binding of the purified T cells to markers for the T cell subpopulation in which they belong.

By "purified T cell subpopulation" is meant a substantially pure T cell subpopulation that is isolated from a sample that naturally contains other cells. The purified T cell subpopulation is enriched for at least one of the following: NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells. Desirably, the T cell subpopulation is enriched for only one of the following: NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells. The purified T cell subpopulation is more pure than the purity of the T cell subpopulation found in nature. Desirably, the purified T cell subpopulation is at least 1, 5, 15, 30, 50, 75, 90, or 99%, by number, free from cells with which it is naturally associated. Typically, these other cells that are associated with the T cell subpopulation differ from the T

WO 01/98357

PCT/US01/19670

cells belonging to the subpopulation by not expressing a cell-surface molecule, not binding a ligand, or not having an activity of the T cell subpopulation.

By "complex" is meant an antibody-bound T cell in which the  
5 binding of the antibody to the T cell is sufficient to enable the isolation or separation of the complex from a sample.

By "recovering the cells from the complex" is meant separating the T cells from the antibody using standard procedures.

Other features and advantages of the invention will be apparent  
10 from the following detailed description.

#### Brief Description of the Drawing

Fig. 1 is a schematic illustration of the relationship between NK T cells, CD1d-reactive invariant T cells, CD1d-reactive noninvariant T cells,  
15 and  $J\alpha Q^+$  T cells.

Fig. 2A is a histogram of the staining of a control T-cell clone with the anti-CDR3-loop monoclonal antibodies (3A6 or 6B11) or a 6B11 isotype (IgG1) matched control. Fig. 2B is a histogram of the corresponding staining of an invariant NK T cell clone.

20 Figs. 3A and 3B are dot plots showing the FACS analysis of the recognition of  $V\alpha 24^+$  T cells by the 6B11 monoclonal antibody. FACS purified  $V\alpha 24^+$  T cells were expanded *ex vivo* for 2 weeks with PHA and analyzed using  $V\alpha 24$ -PE and  $V\beta 11$ -FITC (Fig. 3A) or  $V\alpha 24$ -PE and 6B11-FITC monoclonal antibodies (Fig. 3B).

25 Figs. 4A and 4B are graphs showing the expansion of  $V\alpha 24$  sorted cells that were cultured for three weeks with plate bound 6B11 anti-CDR3-loop monoclonal antibody or PHA, respectively.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Figs. 5A and 5B are graphs showing the FACS analysis of invariant NK T cells in a patient before and during IL-12 treatment, respectively. Peripheral blood of a patient with advanced renal cell cancer was analyzed for CD3<sup>+</sup>V $\alpha$ 24<sup>+</sup> cells immediately before IL-12 therapy and at completion of the first 6 week cycle. Comparable low fractions of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells, with no significant increase after treatment, have been observed in all cases (n=10).

Figs. 6A-6C are graphs showing IL-4 production by bulk peripheral blood mononuclear cells, V $\alpha$ 24<sup>+</sup>, and polyclonal ('poly.') invariant T cells, respectively. These cells were expanded with  $\alpha$ -GalCer and then stimulated with either buffer, plate bound 6B11 antibody, co-cultured with Hela/CD1d transfectants, or PHA. The amount of secreted IL-4 was determined using standard ELISA analysis.

Figs. 7A-7C are graphs showing the comparable expansion of phenotypically and functionally identical invariant NK T cells from the same healthy donor sample by 6B11 and  $\alpha$ -GalCer. V $\alpha$ 24 'MoFlo' sorted cells were expanded with  $\alpha$ -GalCer pulsed autologous dendritic cells, 6B11 monoclonal antibody, or mitogen (PHA) for an approximately four week expansion with IL-2 alone.

Fig. 8A is a graph showing the recognition of bulk T cells from a peripheral blood sample by the 3A6 antibody. Fig. 8D is a graph of the forward (FSC) and side (SSC) scatter of cells showing the gating for the lymphoid cells that were analyzed using the 6B11, 3A6, or control antibody. Figs. 8B, 8C, and 8E-8I are graphs showing the recognition of invariant NK T cell clones and lines by the 3A6, 6B11, or isotype control antibodies. These invariant NK T cell clones and lines were purified using the anti-V $\alpha$ 24 monoclonal antibody followed by expansion using alpha-GalCer. For Figs. 8B-8I, the same "MT" cell line was analyzed. This

WO 01/98357

PCT/US01/19670

indirect (1-color) FACS analysis using the 3A6 or 6B11 antibody and anti-mIg-FITC shows specific recognition of pure human invariant NK T cell clones and lines compared to control T cells.

Fig. 9 is a graph showing the FACS analysis of invariant NK T cell lines from whole peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of a healthy donor. These cells were sorted with 6B11-FITC by MoFlo FACS and expanded for about six weeks prior to 2-color FACS analysis. After expansion, 21% of the cells were V $\alpha$ 24<sup>+</sup>, compared to an original ~0.1%. These results are also summarized in Figs. 12-17.

Figs. 10A-10H are graphs showing the FACS analysis of invariant NK T cell lines from 6B11 antibody magnetic bead sorting. Invariant NK T cells from whole PBMC of a healthy donor were sorted with 6B11 by Dynal or Miltenyi magnetic bead immunoaffinity purification from whole PBMC and expanded for about six weeks prior to 2-color FACS analysis. These results are also summarized in Figs. 12-17.

Figs. 11A-11F are graphs showing the FACS analysis of invariant NK T cell lines from 6B11 antibody magnetic bead sorting. Invariant NK T cells from whole PBMC of a healthy donor were sorted with 6B11 by Dynal magnetic bead immunoaffinity purification and treated as shown from whole PBMC and expanded for about six weeks prior to 2-color FACS analysis. These results are also summarized in Figs. 12-17.

Fig. 12 is a table showing the percent of T cells that stain with the indicated antibodies after a single round four to eight week expansion in T cell medium. The "PBMC" column represents PBMC cells that were not sorted prior to expansion. The "Dynal @ 40" column represents PBMC cells that were purified using 6B11-Dynal beads prior to expansion. The "Milenyi @ 20" column represents PBMC cells that were sorted using 6B11 (20  $\mu$ g/mL coating)-Milenyi beads prior to expansion. For

WO 01/98357

PCT/US01/19670

comparison, the corresponding results for unsorted whole leukopak 21 (LKP 21) cells are listed. For Figs. 12-17, a standard T cell medium such as RPMI-1640 or BioWhittaker medium with 10% FBS and 100 U/mL human recombinant IL-2 was used.

5 Fig. 13 is a table showing the percent of T cells that stain with the indicated antibodies after purification using 6B11-Dynal beads and a single round four to eight week expansion in T cell medium. For comparison, the corresponding results for unsorted whole leukopak 10 (LKP 10) cells are listed. As indicated in the table, some of the T cell  
10 expansions were conducted in the presence of T cell medium ("TCM") containing IL-7 at 10 ng/ml, IL-5 at 10 ng/ml, dexamethasone ("Dex") at 1  $\mu$ M, and/or 6B11 antibody at 40  $\mu$ g/mL. The figure numbers listed to the right some of the rows in the table indicate figures illustrate the results from the T cell expansions.

15 Fig. 14 is a table showing the percent of T cells that stain with the indicated antibodies after a single round four to eight week expansion in T cell medium. For comparison, the corresponding results for unsorted whole leukopak 14 (LKP 14) cells are listed. The results for cells that were sorted with 6B11-Dynal beads prior to expansion are compared to  
20 unsorted control cells. As indicated in the table, some of the T cell expansions were conducted in the presence of 6B11 antibody as above, PHA (1  $\mu$ g/mL), and/or equivalent numbers of autologous APCs.

Fig. 15 is a table showing the percent of T cells that stain with the indicated antibodies after a single round four to eight week expansion in T  
25 cell medium. The results for cells that were sorted with 6B11-Dynal beads prior to expansion are compared to unsorted control cells (LKP 13). Some of the T cell expansions were conducted in the presence of 6B11 antibody, PHA, allogenic APCs, and/or autologous APCs, as described above.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Fig. 16 is a table showing the percent of T cells that stain with the indicated antibodies after purification using 6B11-Miltenyi magnetic beads and a single round four to eight week expansion in T cell medium compared to unsorted control cells (LKP 2). These T cell expansions were  
5 conducted in the presence of autologous APCs, as described above. During one of the T cell expansions, 10 ng/ml IL-7 and IL-15 were also present.

Fig. 17 is another table showing the percent of T cells that stain with the indicated antibodies after purification using 6B11-Miltenyi  
10 magnetic beads and a single round four to eight week expansion in T cell medium. These T cell expansions were conducted in the presence of autologous APCs and PHA and are compared to unsorted control cells (LKP 11, 12). During the T cell expansions, 6B11 antibody, and/or V $\alpha$ 24  
15 antibody were also present as described above and as indicated in the table. During one of the T cell expansions, 10 ng/ml IL-7 and IL-15 were also present. The figure numbers listed to the left some of the rows in the table indicate figures illustrate the results from the T cell expansions.

Fig. 18 is graph showing the FACs analysis of a T cell line purified using the biotinylated 6B11 antibody and streptavidin conjugated magnetic  
20 beads.

Figs. 19A-19E are graphs showing the flow cytometry analysis of peripheral blood from a healthy donor (Figs. 19B and 19E) or prostate cancer patient (Figs. 19C and 19F), or an NK T cell line (Figs. 19A and 19D), analyzed by two-color flow cytometry with V $\alpha$ 24-PE and either  
25 V $\beta$ 11-FITC (Figs. 19A-19C) or 6B11-FITC antibody (Figs. 19D-19F). The NK T cell line was generated by  $\alpha$ -GalCer expansion of V $\alpha$ 24 purified cells from a healthy donor.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Figs. 20A and 20B are graphs showing the two color flow cytometry analysis with V $\alpha$ 24-PE and V $\beta$ 11-FITC monoclonal antibody of V $\alpha$ 24 sorted cells after a three week expansion with PHA (Fig. 20A) or  $\alpha$ -GalCer and autologous PBMC feeders (Fig. 20B). Figs. 20C and 20D are bar graphs showing the production of IL-4 and IFN- $\gamma$ , respectively, by an invariant NK T cell line stimulated PHA or stimulated with mock transfected or CD1d transfected C1R human EBV-transformed B cells in the presence of either an anti-CD1d monoclonal antibody (51.1, 10 $\mu$ g/ml) or an isotype control antibody. The results in Figs. 20A-20D are representative of multiple healthy donors, as shown below.

Figs. 21A-21C are graphs showing the decreased expansion of invariant NK T cells from prostate cancer patients versus healthy donors.  $\alpha$ -GalCer expanded invariant NK T cells from a healthy donor (Fig. 21A), advanced prostate cancer patient (Fig. 21B), and prostate cancer patient in remission (Fig. 21C) were analyzed by V $\alpha$ 24-PE and V $\beta$ 11-FITC staining. Fig. 21D is a bar graph of the percentage of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> cells (mean and standard deviation) after  $\alpha$ -GalCer expansion from a series ( $\geq 6$ ) of donors. These results are also summarized in Figs. 12-17

Figs. 22A-22E are graphs showing the loss of IFN- $\gamma$  responses by invariant NK T cells from prostate cancer patients. Figs. 22A and 22B show the IL-4 and IFN- $\gamma$  production, respectively, from a prostate cancer patient versus a healthy donor derived invariant NK T cell line. Figs. 22C and 22D are graphs summarizing the cytokine production results by CD1d stimulated invariant NK T cells and PHA stimulated bulk T cells, respectively from a series of advanced prostate cancer patients (●) and healthy donors (□). Fig. 22E is a graph of IFN- $\gamma$ /IL-4 ratios (mean plus standard deviation) for invariant NK T cells (top) or conventional bulk T cells (bottom) from healthy donors and advanced prostate cancer patients.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

"Cancer + IL-12" are samples from advanced prostate cancer patients treated *in vitro* with IL-12.

Fig. 23 is a table illustrating the use of the 6B11 antibody to determine the frequency of CD1d-restricted T cells in HIV patients.

5 Fig. 24 is a table illustrating the use of the 6B11 antibody and the anti-V $\alpha$ 24 antibody to determine the frequency of CD1d-restricted T cells in diabetic patients.

Fig. 25A is a table illustrating the genes that are differentially expressed between NK T cell clones ME10 and GW4. Genes populating  
10 the six expression clusters for the eleven gene functional categories are listed. Each gene is identified by GenBank accession number (or TIGR identifier for HT designations), followed by a common name and the specific cluster into which it fell (row, column). Fig. 25B is a schematic illustration of a model for identified transcripts whose discordant  
15 expression is in accord with observed cell phenotypes. Pictured in cartoon format are genes whose transcripts have clearly defined cellular roles and whose discordant expression between GW4 and ME10 correlated with the established phenotypic differences. The genes are related by either being downstream of PI-3 kinase, particularly several genes that regulate cell  
20 survival or are directly required for calcium flux and calcium-regulated gene transcription. Average copies of mRNA molecule/million for genes that were significantly altered by anti-CD3 treatment for GW4 (resting, activated) and ME10 (resting, activated) respectively were: Itk, (49, 115) and (25, 19); GATA3, (13, 26) and (8, 11); Jun-B, (15, 118) and (14, 30);  
25 Jun-D, (107, 291) and (68, 130); NFAT4, (33, 35) and (64, 26); STAT4, (36, 29) and (76, 36); 14-3-3, (24, 45) and (83, 41); Bcl-XL, (11, 50) and (6, 7); and IAP, (14, 211) and (10, 41). Selected genes whose expression

WO 01/98357

PCT/US01/19670

was constitutive but discordantly expressed for GW4 vs. MW10 (GW4,ME10) were: NKR-P1A, (29, 459); and STAT1, (27, 79).

Figs. 26A-26D are graphs showing the transcriptional induction and release of cytokines and cytolytic enzymes by activated V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells.

5 Figs. 26A and 26B compare the changes of expression on genes for cytokines and chemokines between the V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clone GW4 (IL-4<sup>+</sup>) and the ME10 (IL-4-null) clone. For each individual transcript the anti-CD3 induced hybridization intensity is shown. RNA was isolated, amplified and hybridized to genechips displaying probes for 250 genes of  
10 immunological interest (Affymetrix, San Jose, CA). This chip is custom designed for quantitative analysis by increasing the number of address features for the detection of each specific transcript. The values for the number of copies of specific mRNA per million after treatment with IgG1 control are represented by open circles; O, and their corresponding copy  
15 numbers after activation with anti-CD3 treatment by closed circles; ●. Genes which were called significantly different by a gene expression algorithm and which changed by at least 2-fold are indicated by a bold line. The letter (A) denotes that the transcript was not detected, and it should be noted that the transcripts for MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  were  
20 suppressed by anti-CD3 stimulation in clone ME10. Fig. 26C is a graph showing the amount of cytokines produced by supernatants from several V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones, based on quantitative ELISA analysis. Fig. 26D is a graph showing the expression of CD40L. The T cell clone BW5 was activated for four hours with PMA/ionomycin stimulation and analyzed by  
25 flow cytometry.

Figs. 27A and 27B show the CD1d restriction of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell activation. Fig. 27A shows the restriction of cytokine release and proliferation. T cell clones were co-cultured with C1R transfectants

WO 01/98357

PCT/US01/19670

(expressing CD1a, CD1b, CD1c, or CD1d) or plate-bound anti-CD3. Secreted IL-4, IFN- $\gamma$ , or proliferation was assayed as described herein. Fig. 27B shows the restriction of cytolysis. The panel of C1R transfectants was screened for cytolysis by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones in standard four hour <sup>51</sup>Cr-release assays.

Fig. 28A is a graph of the CD1d expression on myeloid dendritic cells, based on flow cytometric analysis of cultured dendritic cells. Fig. 28B is a picture of the immunoblot analysis of dendritic cells and control C1R transfectant cells (expressing CD1a or CD1d). Figs. 28C-28J are pictures of the immunohistochemical staining of serial sections of a representative reactive lymph nodes biopsy (total of 10 biopsies). Fig. 28C is a picture of hematoxylin-eosin staining at low power, and Fig. 28D is a picture of anti-CD3 staining. The box outlines the region through which serial sections were taken for staining with the various markers shown at higher magnification views in Figs. 28E and 28F; (Fig. 28E) S100; (Fig. 28F) CD1d; (Fig. 28G) CD1a; (Fig. 28H) CD34. Staining of sinus histiocytes (Figs. 28I and 28K), and parafollicular regions (Figs. 28L and 28M) for: hematoxylin-eosin, (Figs. 28I and 28L); CD68, a macrophage marker, (Figs. 28J and 28M); and CD1d, (Figs. 28K and 28N) are shown.

Figs. 29A-29D are graphs characterizing the cytolysis of myeloid dendritic cells by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells. Fig. 29A is graph showing the allogenic lysis of immature and mature dendritic cells by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clone GW4 in chromium release assays. The haplotypes of the donors were: 1) Clone GW4, A2, A24, B8, B38, Cw7, DR3, DQ2; 2) DC donor M, A2, A68, B7, B45, Cw6, Cw15; 3) DC donor O, A2, A24, B46, B60, DR14, DRw52, DQ1; 5) Donor B, A1, A3, B7, B8, DRB1\*1501, DRB5\*0101, DQB1\*0601. Figs. 29B and 29C are graphs of the

WO 01/98357

PCT/US01/19670

autologous and allogenic cytolysis of dendritic cells by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones. Fig. 29D is a graph of the abrogation of cytolysis by calcium chelation and inhibition by addition of the anti-CD1d monoclonal antibody, 42.1. Clones BW3 and BW5 were co-cultured with subject BW DC in the presence or absence of EGTA and MgCl<sub>2</sub> (4mM each) or F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal antibody 42.1 or control IgG at 100  $\mu$ g/ml. Fig. 29E is a bar graph showing the secretion of IL-4 and IFN- $\gamma$  after co-culture of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones OY3 and BW5 with autologous DC.

Fig. 30 is a schematic illustration of a model demonstrating the interaction of CD1d-restricted T cells with myeloid dendritic cells. Activation of invariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells results in the secretion of cytokines and chemokines important for myeloid dendritic cell recruitment and activation. In addition, important cell surface co-stimulatory molecules are also expressed. During myeloid dendritic cell maturation, CD1d is upregulated and activates CD1d-restricted T cells. In addition to the secretion of cytokines and chemokines, activated V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells upregulate perforin, granzyme B, and Granulysin. The CD1d-dependent secretion of these molecules then results in the lysis of myeloid dendritic cells.

20

#### Detailed Description

We have developed methods to generate antibodies to the T cell antigen receptors (TCRs) of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells ( Fig. 1). The invention also provides purified antibodies to TCRs of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells which are useful for diagnostic, imaging, and therapeutic applications for diseases or conditions that are affected by the number and/or activity of T cells or specific subpopulations of T cells. Examples of such diseases or conditions

25

WO 01/98357

PCT/US01/19670

include autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, and cancer.

5 The *ex vivo* or *in vivo* expansion of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells using the antibodies of the invention may be performed alone or in conjunction with the administration of other therapeutics, such as cytokines or tumor vaccines.

The use of an anti-CDR3-loop monoclonal antibody for the  
10 expansion of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells instead of the use of an antigen, such as  $\alpha$ -GalCer, would eliminate the requirement for autologous APCs, removing them as potential sources of variability and greatly simplifying the procedure for clinical trials. In addition, the use of a monoclonal antibody (monoclonal antibody) would allow specific  
15 expansion of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells as opposed to nonspecific polyclonal T cell expansion from multiple cell types.

The antigen receptor of almost every individual clone of B and T lymphocytes is the product of a unique random somatic rearrangement.  
20 These rearrangements cause even identical twins to have millions of receptors that differ from one another. By contrast, the CD1d-selective and -reactive invariant TCR utilized by the invention represents a uniquely universal target. Because the sequence of the CDR3 loop of invariant TCR- $\alpha$  is identical in all individuals, this region is used to generate novel  
25 monoclonal and polyclonal antibodies that recognize the human invariant TCR- $\alpha$  chain. The monoclonal antibodies can preferentially identify and expand invariant T cells *ex vivo* from normal donors. Our methods of cell expansion using monoclonal antibodies of the present invention yield

WO 01/98357

PCT/US01/19670

population sizes of approximately  $>10^8$  invariant T cells in bulk cultures and  $>10^7$  cells for individual clones starting with 10-20 ml of peripheral blood. As few as tens of thousands of invariant T cells have been shown to be functional in cell transfer experiments performed on mice (Sonoda *et al., supra*). Thus, human phase I clinical trials can incorporate a dose escalation arm, such as starting with about  $10^6$  cells, and targeting a maximal dose of  $10^9$  cells. Infusions of this range of cells is expected to be well tolerated. For example, donor leukocyte infusions routinely employ on the order of  $10^{10}$  unpurified cells without significant side-effects.

In addition to their anti-tumor effect, NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells may contribute to the Th1 protective immune responses against intracellular pathogens. For example, we found that the immune response to an acute cytopathic virus (encephalomyocarditis virus, EMCV-D) is defective in CD1d knockout mice (Exley et al, J. Leuk Biol. 69:713, 2001). These results suggest that the antibodies of the present invention may also be used in the prevention or treatment of infectious disease, including diseases caused by viruses, bacteria, parasites, fungi, protozoa, or other eukaryotic pathogens.

Because NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells are capable of augmenting Th1, Th2, or immune deviation responses depending on stimulus conditions, the response of the NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells can be modulated by either the *in vivo* administration of a cytokine before, during, or after the infusion of the *ex vivo* expanded NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells or by conducting the *ex vivo* expansion of the cells in the presence of a cytokine, or a combination of both methods. Using a cytokine, such as IL-12, IL-15, or IL-18, which is known to bias T cells towards Th1 responses is

expected to increase the effectiveness of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells in the prevention or treatment of cancer, infectious disease, allergies, asthma, pregnancy, and inflammation. Alternatively, any other cytokine, such as IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, 5 IL-18, IFN- $\alpha$ / $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and GM-CSF, may be used to bias the T cells towards Th2 responses for the prevention or treatment of autoimmune diseases and graft versus host disease for which Th2 responses are protective. Alternatively, the cytokine may be used to bias the T cells away from Th1 and Th2 responses and towards immune deviation 10 responses which may contribute to the maintenance of pregnancy. Immune deviation responses include the suppression of an ongoing immune response, such as a response at an immune-privileged site. TGF- $\beta$  and IL-10 are examples of cytokines that may participate in immune deviation responses (Sonoda *et al.*, supra).

15 In addition to their use in expanding NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells *ex vivo*, the antibodies of the present invention may be administered to a mammal, such as a human, to increase the number of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells *in vivo* for the prevention or treatment of autoimmune diseases, infectious diseases, 20 allergies, asthma, inflammatory conditions, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, or cancer. For example, reduced levels of certain T cells such as invariant NK T cells were found in prostate cancer, multiple sclerosis, HIV, and type 1 diabetes patients (Examples 9, 11, and 12). Additionally, a 25 reduced number of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> T cells has been previously reported for melanoma patients (Kawano *et al.*, *Cancer Res.* 59:5102, 1999). Thus, the loss of invariant NK T cell function may be a general finding in advanced cancer. Alternatively, antibodies that bind and inhibit the expansion or an

WO 01/98357

PCT/US01/19670

activity of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells, such as cytokine production or cytotoxicity, may be used to inhibit T cell pathogenesis in a mammal. For example, an allergy may be caused or exacerbated by the Th2 response of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells, and thus, inhibiting the expansion or Th2 response of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells may be useful in the prevention or treatment of this condition. Similarly, reducing the Th1 response of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells may improve, stabilize, or prevent autoimmune diseases or prevent spontaneous abortions. The Th1 response induced by infectious agents, such as Hepatitis viruses, can also cause damage which may be minimized by the inhibition of these cells. Examples of some of the antibodies that may inhibit these cells include monovalent or Fab molecules or antibodies that are conjugated to a toxin or radiolabel that damages the cells upon binding of the antibody to the cells. The antibodies may also bind to an TCR expressed on the cells and prevent the binding of a ligand to the TCR.

The antibodies of the invention may also be used for imaging applications. In particular, the antibodies can be coupled to a fluorescent or radiolabel for use in visualizing NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells *in vivo* or in samples of biopsies, blood, and other bodily material or fluids. The antibodies may also be used to purify NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells from these samples. The antibodies of the present invention may also bind to other NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells that are not invariant T cells and that are more abundant than invariant T cells in some locations, such as the bone marrow and liver. Using an antibody of the present invention to purify invariant T cells from a peripheral blood sample, in which approximately 0.1% of the cells are invariant T cells, has enabled the isolation of cells

WO 01/98357

PCT/US01/19670

that are 90-95% invariant T cells. Even higher purity may be achieved by using multiple rounds of purification or using multiple antibodies per round.

5 Additionally, greater purity or greater cell numbers may be achieved by also contacting the T cells with an antigen and antigen presenting cells (APCs). Any antigen (*e.g.*, a protein, peptide, lipid, carbohydrate, nucleic acid, infectious agent, or small molecule) for the T cells of interest may be used. Examples of possible antigens for CD1d-reactive T cells include lipid or glycosyl-phosphatidylinositol antigens  
10 from an infectious pathogen and  $\alpha$ -GalCer. Other possible antigens include peptide and protein antigens, such as those presented by a class I or class II MHC molecule.

Additionally, an antigen may be presented to a T cell of interest in the absence of APCs. For example, a soluble, liposome-associated, or  
15 immobilized form of an antigen-presenting molecule (*e.g.*, CD1d, class I MHC, or class II MHC) may be used to present an antigen (*e.g.*, a lipid or a peptide) to a T cell or a sample containing a T cell of interest under conditions that allow the activation or expansion of the T cell without the presence of an APC. The antigen-presenting molecule that is used may be  
20 a naturally-occurring molecule or may be a chemically or genetically modified molecule. For example, the molecule may be expressed as a fusion protein, such as a GST, maltose-binding protein, hexa-histidine, or Fc region fusion protein. An antigen-presenting molecule expressed as a fusion protein containing a membrane-binding domain, transmembrane  
25 domain, or hydrophobic region may be mixed with lipid molecules to form a liposome or micelle containing the fusion protein. This liposome or micelle having an antigen-presenting cell on its surface mimics the ability of an APC to present an antigen to a T cell. Alternatively, an antigen-

WO 01/98357

PCT/US01/19670

presenting molecule may be immobilized on a solid support, such as any rigid or semi-rigid surface. The support can be any porous or non-porous water insoluble material, including, without limitation, membranes, filters, chips, slides, wafers, fibers, magnetic or nonmagnetic beads, gels, tubing, 5 strips, plates, rods, polymers, particles, microparticles, and capillaries. If desired, the support can have a variety of surface forms, such as wells, trenches, pins, channels and pores, to which the proteins are bound.

An antigen-presenting molecule that is either in solution, immobilized on a solid support, or contained in a liposome or micelle may 10 be contacted with an antigen for the T cell subpopulation of interest under conditions that allow the antigen-presenting molecule to bind the antigen. This antigen may then interact with T cells of interest, resulting in the expansion and/or activation of the T cells. These methods in which a T cell of interest is expanded or activated by an antigen in the absence of 15 APCs may be desirable in a clinical setting in which extra cells, such as APCs may be undesirable.

Using the antibodies of the invention for the quantitation of invariant T cells by flow cytometry has many advantages over the current methods. The current methods include either flow cytometry with less 20 specific antibodies or a PCR-based method, which involves synthesizing and amplifying cDNA corresponding to the mRNA encoding the TCR- $\alpha$  chain and comparing this amplified cDNA to that from an invariant T cell clone and a control T cell clone, as described in Example 6. The flow cytometry method has the advantage of determining the total number of 25 invariant T cells; while the PCR-based method only determines the relative frequency of invariant T cells in a sample. Moreover, flow cytometry allows the determination of which markers are expressed on the invariant T cells. The flow cytometry method is also a simpler and faster

WO 01/98357

PCT/US01/19670

method which may be performed in about an hour compared to about a day for the PCR method and which does not require skill in molecular biology techniques. Thus, the flow cytometry method using the antibodies of the present invention may be more desirable in a clinical setting.

5 Similar methods may also be used to quantitate other NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells using the antibodies of the present invention.

Additionally, the antibodies can be used in diagnosing a subject that has or is at risk for a disease. As described in Examples 6, 9, and 10, the  
10 antibodies can be used to quantitate the number of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells and to isolate these cells for the measurement of their cytokine production and cytotoxicity activities. These parameters can be compared between the subject and subjects who have and/or do not have the condition to diagnose the risk for, presence of,  
15 severity of, stage of, recovery from, or remission of a condition.

The following examples are to illustrate the invention. They are not meant to limit the invention in any way. It should be understood that the methods described in the following examples may be applied to NK T cells, CD1d-reactive T cells, J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells, and/or invariant T cells.

20

**Example 1: Generation of antibodies to a human NK T cell antigen receptor alpha chain**

Because all invariant TCR<sup>+</sup> T cells from all individuals have the same amino acid sequence in the CDR3 loop, this region was used in the  
25 design of peptides for the generation of anti-CDR3-loop antibodies.

Because the murine and human sequence of the CDR3 loop are nearly identical (CVVSDRGST and CVVGDRGSA; SEQ ID NOs 2 and 3, respectively), a peptide with the human CDR3 loop sequence that is

WO 01/98357

PCT/US01/19670

administered to mice might be recognized by the murine immune system as a self peptide and thus not induce the production of antibodies.

To overcome this potential problem, CD1d knockout mice (Sonoda *et al.*, supra) which lack invariant TCR<sup>+</sup> T cells were used as the host for  
5 the production of anti-CDR3-loop antibodies. Since these mice lack the invariant TCR- $\alpha$  chain they are able to recognize peptides containing the human CDR3 loop sequence as foreign, and thus, generate antibodies against this epitope.

For the production of antibodies and hybridomas, a peptide  
10 (CVVSDRGSTLGRLADCG, SEQ. ID No. 1) with an amino acid sequence corresponding to a portion of the CDR3 loop of the human invariant TCR- $\alpha$  chain was used. This peptide was cyclized by reaction of the N-terminal amino group with the C-terminal carboxyl group. The cyclic peptide was coupled to a keyhole limpet hemocyanin carrier and  
15 administered to CD1d KO mice, using standard techniques. The peptide coupled to bovine serum albumin was administered as booster injections. Invariant TCR<sup>+</sup> T cells were later administered to some mice to further stimulate the immune system. Serum from the mice was tested for antibodies that bound the peptide coupled to ovalbumin, using a standard  
20 ELISA assay. Hybridomas were generated from seropositive mice spleens using standard techniques. ELISA positive hybridoma wells were further tested by FACS to compare binding of the antibodies to V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q clones versus negative controls. Cells producing antibodies that bound the V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q clones but not the negative controls were cloned and fused to  
25 immune spleen cells using standard techniques. A group of hybridomas secreting monoclonal antibodies that specifically recognized the peptide were then identified using the ELISA assay. Subsequent selective screenings for clones that recognized the invariant TCR- $\alpha$  chain expressed

WO 01/98357

PCT/US01/19670

on intact NK T cells involved repetitive cloning of the hybridoma, assaying by FACS for binding to cells expressing the invariant TCR- $\alpha$  chain but not to negative controls, and confirmation of specific binding to the peptide by ELISA. These stable monoclonal antibody secreting  
5 hybridomas clones may be used by one skilled in the art for the production and purification of clinical trial quality and quantity of these monoclonal antibody reagents.

Two antibodies (3A6 and 6B11) were identified that preferentially recognize human invariant T cells ( Fig. 2). 6B11 is an IgG1, and 3A6 is  
10 an IgM. To demonstrate that 6B11 was not exclusively a V $\alpha$ 24 monoclonal antibody, PHA was used to expand bulk V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells purified by FACS. These cells were then analyzed with V $\alpha$ 24, V $\beta$ 11 and 6B11 monoclonal antibodies ( Fig. 3). The results demonstrate that 6B11 recognizes a small fraction of the V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells, similar to the V $\beta$ 11  
15 monoclonal antibody. Additionally, a single cell sorting from multiple donors was performed and resulted in the establishment of clones from 6B11<sup>+</sup> T cells. 6B11 was also shown to induce cytokine responses identical to CD1d<sup>+</sup> targets.

This method for the production of antibodies reactive with a CDR3  
20 loop may be also performed for any TCR of interest. The sequence of the CDR3 loop of a TCR- $\alpha$  chain or - $\beta$  chain of interest may be determined based on a sequence alignment with other TCR- $\alpha$  chains or - $\beta$  chains or based on a modeled or experimentally determined three-dimensional structure of the TCR- $\alpha$  chain or - $\beta$  chain of interest (Johnson and Wu, Nuc.  
25 Acid. Res. 29(1):205-206, 2001; <http://immuno.bme.nwu.edu>). A cyclic peptide containing the sequence of this CDR3 loop may be used as the antigenic peptide for the production of antibodies reactive with the CDR3 loop, as described above. This cyclic peptide may be administered to an

animal (e.g., a laboratory animal or an animal of veterinary interest) in one or more doses. To further enhance the production of antibodies, the T cells of interest may also be administered to the animal. Examples of mammals that may be used for the production of antibodies include mice, rats, rabbits, pigs, goats, sheep, horses, and cattle. Examples of birds that may be used include chickens and turkeys. The host animals may be wild-type animals, or they may be animals that have a reduced level or that lack the T cell subpopulation to which the antibody is being generated. Other animals that may be used include animals that naturally, through genetic modification, or depletion lack the T cells. Any other animal that is capable of producing antibodies may also be used for the production of antibodies of the invention.

The resulting antibodies may be used for diagnostic or clinical applications involving other animals of the same genus or species as the host animal used for antibody production. Additionally, the antibodies of the invention may be used in applications involving animals of a different genus as the host animal. For example, antibodies that are produced in chickens may be used for the treatment or prevention of disease in other chickens or in other birds.

To generate antibodies for the treatment, prevention, or diagnosis of a particular disease or condition, the CDR3 loop of a T cell subpopulation that is associated with that disease or condition may be used (see, for example, Table 1). For example, T cell subpopulations that are present at increased or decreased levels or that have increased or decreased activity in subjects with a disease or condition relative to the corresponding T cell subpopulation in control subjects without the disease or condition may be used for the generation of antibodies of the invention. Additionally, T cells may be isolated from a sample (such as a biopsy sample) obtained

WO 01/98357

PCT/US01/19670

from a subject with a disease or condition. The identity of T cell subpopulations in the sample may be determined using standard techniques, such as by FACS analysis using antibodies reactive with various T cell markers or by sequencing of the TCR- $\alpha$  chains or - $\beta$  chains.

5 The CDR3 loop from an isolated T cell subpopulation may be used for the production of antibodies. These antibodies may be administered to subjects with the disease or condition (including the original subject from whom the T cell subpopulation was isolated as well as other subjects with the condition) to modulate the number and/or activity of relevant T cells *in*

10 *vivo*. The antibodies may also be used for *ex vivo* expansion of the relevant T cells followed by readministration of the expanded T cells to the subject.

Antibodies of the invention may also be generated to any antigen-specific oligoclonally expanded T cell subpopulation encountered in

15 animals (*e.g.*, humans, other mammals, and birds) in response to given antigenic challenges. These T cell subsets include those T cells oligoclonally expanded in response to an immunodominant component of the antigen in multiple individuals. For example, an antigen of interest may be administered to an animal, and the oligoclonally expanded T cell

20 subsets that are generated by this administration may be isolated and used for the production of antibodies as described herein.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Table 1. Citations for T cell receptors that may be used to generate antibodies for clinical applications involving the indicated disease or condition

	Disease/Condition	Citation
5	Multiple Sclerosis	Wucherpfennig <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 175:993-1002 (1992).
	Environmental Pathogens/ Promotion of Oral Tolerance	Blumberg <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 150:5144-5153 (1993).
	Ulcerative Colitis	Chott <i>et al.</i> , <i>J. Immunol</i> 156:3024:3035, (1996).
10	Ulcerative Colitis	Shigematsu <i>et al.</i> , <i>J. Clin. Lab. Immunol.</i> 48:177-186 (1996).
	Chronic Inflammatory Bowel Disease	Probert <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 157:3183-3191 (1996).
	Antigens	Porcelli <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 178:1-16 (1993).
	Rheumatoid Arthritis	Fitzgerald <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 154:3538-3547 (1995).
15	Rheumatoid Arthritis	Sottini <i>et al.</i> , <i>J. Autoimmun.</i> 6:621-637 (1993).
	Rheumatoid Arthritis	Hingorani <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 156:852-858 (1996).
	Polymyositis	Bender <i>et al.</i> , <i>J. Exp. Med.</i> 181:1863-1868 (1995).
	Giant Cell Arteritis	Grunewald <i>et al.</i> , <i>Arthritis Rheum.</i> 37:1221-1227 (1994).

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Bone Marrow Transplantation	Gorochov <i>et al.</i> , <i>Blood</i> 83:587-595 (1994).
Systemic Sclerosis	Kuwana <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 158:485-491 (1997).
Human Leishmaniasis	Uyemura <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 151:7095-7104 (1993).
B Chronic Lymphocytic Leukemia	Farace <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> 153:4281-4290 (1994).
5 Multiple Myeloma and Paraproteinemia	Moss <i>et al.</i> , <i>Blood</i> 87:3297-3306 (1996).

**Example 2: Isolation and expansion of human invariant T cells with monoclonal antibody.**

10 Fig. 4 demonstrates that plate bound 6B11 monoclonal antibody can be used to achieve selective expansion of invariant T cells. Analysis of more than 20 clones and 15 lines derived from 15 healthy donors using 6B11 in this way has produced entirely consistent results: 100% of these were  $V\alpha 24^+$   $V\beta 11^+$   $CD161^+$ , highly CD1d-reactive, high IL-4 producers, 15 and modest IFN- $\gamma$  producers (Table 2). This result further demonstrate the specificity of these monoclonal antibodies and their use as a more definitive and single color alternative that does not require autologous APCs, which would be undesirable in the setting of a clinical trial.

20

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Table 2. Percentage of cell expressing invariant NK T cell markers and producing cytokines after expansion of T cell lines or T cell clones with the 6B11 antibody.

5 Donors	Cells	V $\alpha$ 24 <sup>+</sup>	V $\beta$ 11 <sup>+</sup>	CD161 <sup>+</sup>	CD1d-reactive	IL-4	IFN- $\gamma$
<i>T cell</i>							
lines	15	10-100	10-100	10-100	100	100	10-100
12							
<i>T cell</i>							
10 clones	20	100	100	100	100	100	65
3							

The monoclonal antibody 6B11<sup>+</sup> was also used alone (2 donors, 10 clones) or paired with the anti-V $\alpha$ 24 antibody (9 donors, 87 clones) to  
 15 clone additional invariant T cells by single cell sorting. All the clones were confirmed to be invariant CD1d-restricted T cells. All of these clones also contained the invariant TCR- $\alpha$  chain, based on sequence analysis of the TCR- $\alpha$  chain. Additionally, all of the clones were CD1d restricted (Exley *et al.*, J. Exp. Med. 186:109, 1997). In some donors  
 20 there are very small numbers of 6B11<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> T cells. The two donors for whom only the 6B11 antibody was used for T cell purification did not have this population. One of these donors had 0.01% V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> cells in their peripheral blood. The generation of 6/6 V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> CD1d-restricted T cells from this individual highlights the specificity of  
 25 6B11. The probability of 6/6 V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> clones based on chance is (10<sup>-4</sup>)<sup>6</sup>. As illustrated in Figs. 6A-6C, the 6B11 antibody also stimulates secretion of IL-4 from CD1d-restricted T cell lines.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Additionally, use of the 6B11 antibody in either a FACS sort or magnetic bead immunoaffinity purification step followed by expansion in the presence of a mitogen resulted in the isolation of invariant NK T cells (see, for example, Figs. 8, 9, 10A-10H, and 11A-11F). Starting with 5 PBMC in which approximately 0.05% of the lymphocytes in PBMC are invariant T cells, approximately 5 - 30% of the purified and expanded cells were invariant T cells.

The 6B11 antibody has recognized invariant NK T cell clones and lines from all the donors that have been tested, including over 100 subjects 10 from various ethnicities and age groups (see, for example, Figs. 8B-8I).

This antibody has also recognized invariant NK T cells in both male and female subjects, including subjects diagnosed with cancer and subjects not diagnosed with cancer. These results demonstrate that the ability of the 6B11 antibody to recognize invariant NK T cells is not limited to a 15 particular population of patients.

The ability of the 6B11 antibody to expand invariant NK T cells was compared to that of  $\alpha$ -GalCer pulsed autologous dendritic cells. For this comparison, V $\alpha$ 24 'MoFlo' sorted cells were expanded with  $\alpha$ -GalCer pulsed autologous dendritic cells, 6B11 monoclonal antibody, or mitogen 20 (PHA) for an approximately four weeks expansion in the presence of IL-2. As illustrated in Figs. 7A-7C, the expansion of invariant NK T cells using the 6B11 antibody was similar to that achieved using  $\alpha$ -GalCer. However, expansion using the 6B11 antibody has the advantage of not requiring APCs.

25

WO 01/98357

PCT/US01/19670

**Example 3: Exemplary methods for the isolation and expansion of T cells of interest**

For the purification of a T cell subpopulation of interest, a positive and/or negative selection step may be performed. Examples of antibodies  
5 that may be used in a positive selection step include the 6B11, 3A6, anti-V $\alpha$ 24, anti-V $\beta$ 11, and anti-CD161 antibodies.

T cells of interest may also be enriched using a negative selection step that removes some of the undesired T cells or that removes other  
contaminants from a sample. For example, an anti-CD8 antibody and/or  
10 an anti-CD4 antibody may be used to enrich a sample for invariant NK T cells. A negative selection step may be performed prior to, concurrent with, or subsequent to a positive selection step.

A positive and/or negative selection step may be performed prior to or after a T cell expansion step. In one possible method, the T cells of  
15 interest are purified first and then selectively expanded. In another possible method, expanded T cells are purified using a high capacity column (e.g.  $10^{10}$  expanded cancer patient peripheral blood mononuclear cells (PBMC) could yield  $10^6$  invariant NK T cells after large scale Miltenyi or other column purification steps).

20 Examples of possible positive purification steps are listed below. These methods may be used with antibodies of the invention that are reactive with any T cell subpopulation of interest.

*Exemplary FACS procedure*

25 PBMC or another tissue source is blocked with autologous serum at 4°C. An antibody reactive with invariant T cells (e.g., 6B11 or 3A6 antibody) is added at a ratio of about 1 - 10  $\mu$ g antibody /  $10^{7-8}$  PBMC and incubated for 20 minutes at 4°C. The antibody used in this method may

WO 01/98357

PCT/US01/19670

be directly labeled with a conjugate such as FITC or biotin, or the antibody may be indirectly labeled with second reagent (*e.g.*,

anti-IgG-Fluorochrome or streptavidin-Fluorochrome). One or more other antibodies labeled with different fluorophores may also be added (Figs.

5 7A-7C and 9). The solution of cells and antibodies is then washed using PBS or any other physiological buffer to remove unbound antibody.

If desired, the settings of the FACS cell sorter may be adjusted using either a positive (*e.g.*, general anti-T cell antibody) or negative control antibody. The sample of interest may be analyzed at a rate of

10 approximately 100 million cells per hour using a high speed FACS sorter (*e.g.*, 'MoFlo' FACS sorter). The purified T cells may be expanded in T cell media [*e.g.*, 10% Fetal Bovine or human autologous or AB pooled serum in RPMI-1640 or equivalent media supplemented with buffer (*e.g.* Hepes), glutamine, and antibiotic (*e.g.*, gentamicin)] in the presence of a  
15 mitogen such as PHA, an anti-CD3 antibody, the 6B11 antibody, the 3A6 antibody, and/or  $\alpha$ -GalCer antigenic stimulus CD3 monoclonal antibody (Exley *et al.* 1997 and 1998, *supra*; Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998). The antibody may be in solution or plate bound. Irradiated autologous feeders and IL-2 (10 - 100 U/ml) may also be added immediately or added  
20 at any time point during expansion. IL-7 (~1-10 ng/ml) and/or IL-15 (~1-10 ng/ml) may increase invariant NK T cells yields (*e.g.* Wilson *et al.* 1998, *supra*; van der Vliet *et al.* Journal of Immunological Methods 247:61-72, 2000). Dexamethasone or a related selective immune suppressive agent (~1 $\mu$ M) may preferentially enhance the growth of  
25 invariant NK T cells while inhibiting growth of conventional T cells (*e.g.* Milner *et al.*, J. Immunol. 163(5):2522-25229, 1999). The media is replaced about twice a week with fresh media. During or subsequent to expansion (*e.g.*, 2-4 weeks after expansion has begun), the T cells may be

WO 01/98357

PCT/US01/19670

phenotypically analyzed by FACS. This analysis may be performed by staining with 6B11, anti-V $\alpha$ 24, anti-V $\beta$ 11, anti-CD4, anti-CD8 $\alpha\beta$ , or anti-CD161 antibodies.

5 *Exemplary magnetic bead procedure*

- PBMC or another tissue source is blocked with 1 - 10% autologous serum by mixing at 4°C in PBS or other physiological buffer. One or more antibodies that are reactive with invariant T cells (*e.g.*, 6B11 or 3A6 antibody) is added at a ratio of about 1 - 10  $\mu$ g monoclonal antibody /  $10^{7-8}$
- 10 PBMC is incubated for 20 minutes at 4°C. The antibody used in this method may be directly labeled with a conjugate such as FITC or biotin or the antibody may be indirectly labeled with second reagent (*e.g.*, anti-IgG-Fluorochrome or streptavidin-Fluorochrome). One or more other antibodies labeled with different fluorophores may also be added (Figs.
- 15 7A-7C and 9). The solution of cells and antibodies is then washed using PBS or any other physiological buffer. Magnetic beads, such as ~ 10 - 100  $\mu$ l Miltenyi MACS Microbeads Anti-mouse IgG #484 or MACS Steptavidin Microbeads #481 per  $10^{7-8}$  PBMC;  $10^{5-7}$  Dynal Anti-IgG #M450 beads per  $10^{7-8}$  PBMC are added and the solution is mix at 4°C.
- 20 The beads are isolated using magnets and then washed according to the manufacturers' recommendations (*e.g.*, using Miltenyi MS type separation columns such as product number 130-042-201 and MACS multistand, or Dynal beads directly in tubes on Dynal or comparable magnets). The washed, purified cells are placed into multi-wells with T cell media [10%
- 25 Fetal Bovine or human autologous or AB pooled serum in RPMI-1640 or equivalent media supplemented with buffer (*e.g.* Hepes), glutamine, and antibiotic (*e.g.* gentamicin)]. The cells may be expanded using a monoclonal antibody that is directly bound to the beads or in solution.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Additionally or alternatively, the cells may be expanded using media that is supplemented with a mitogen such as PHA, an anti-CD3 antibody, the 6B11 antibody, the 3A6 antibody, or  $\alpha$ -GalCer antigenic stimulus CD3 monoclonal antibody. The antibody may be in solution or bound to a  
5 plate, bead, or other solid surface. As described above, various other reagents such as IL-7, IL-15, and dexamethasone may improve product yield and/or purity. The expanded T cells may be phenotypically analyzed as described above.

10 **Example 4: Magnetic bead purification of invariant T cells**

Figs. 10A-17 illustrate the ability of these magnetic bead purification methods to generate a large number of purified invariant T cells. In particular, the 6B11 antibody was bound to either (1) Dynal superparamagnetic, polystyrene beads with affinity purified goat anti-  
15 mouse IgG covalently bound to the surface (Dynabeads® M-450 goat anti-mouse IgG, Product Number 110.05) or (2) Milenyi MACS colloidal super-paramagnetic microbeads conjugated to goat anti-mouse IgG (Product Number 484-02, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions ( Dynabeads® M-450 goat anti-mouse IgG  
20 package insert; MACS goat anti-mouse IgG microbead instructions). PBMC cells were enriched for invariant T cells by purification using 6B11-Dynal or 6B11-Milenyi beads. The purified cells were then expanded for four to eight weeks under various conditions. For example, the T cells were expanded in the presence of one or more of the following  
25 as indicated in Figs. 12-17: PHA, the 6B11 antibody, IL-5, IL-7, allogenic APC, and autologous APC. The "PBMC" column represents PBMC cells that were not sorted prior to expansion. The "Dynal @ 40" column represents PBMC cells that were purified using 6B11-Dynal beads prior to

WO 01/98357

PCT/US01/19670

expansion. The "Milenyi @ 20" column represents PBMC cells that were sorted using 6B11-Milenyi beads prior to expansion.

In the experiments described in Figs. 12-17, the addition of IL-7 and IL-15 increased the yield of invariant T cells. At the concentrations tested, IL-7, IL-15, and dexamethasone did not increase the purity of invariant T cells. Expansion using  $\alpha$ -GalCer after expansion using 6B11 did not improve the purity of invariant T cells but did increase the number of invariant T cells. Neither limiting ( $6B11^+ CD161$ ) or ( $CD3^+ CD161$ ) increased the yield of invariant NK T cells (Figs. 12-17).

Invariant T cells were also purified using biotinylated 6B11. For this procedure, ficoll purified PBLs were incubated with 6B11-biotin. The cells were then washed to remove unbound antibody and incubated with streptavidin conjugated to Miltenyi microspheres. The  $6B11^+$  cells were isolated by magnetic bead selection according to the manufacturer's specifications. A total of 6 lines were generated using the 6B11 antibody in combination with IL-2 and IL-7. Three of the six lines were expanded and had a surface phenotype consistent with invariant  $V\alpha 24^+$  CD1d-restricted T cells. The lines varied from 76%- 99% invariant after expansion. A FACS profile of the pure line is shown in Fig. 18. This successful cloning and expansion of invariant T cells demonstrates that 6B11 can be used in combination with the MACS™ technology to isolate CD1d-restricted T cells directly from blood without the need for FACS-based cloning protocols and irradiated feeders.

25

**Example 5: *Ex vivo* or *in vivo* cytokine treatment to alter the Th1/Th2/immune deviation response ratio of NK T cells.**

While not meant to limit the invention to a particular theory, a working hypothesis is that NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells producing high levels of IL-4 (possibly in conjunction with other "Th2" cytokines) will bias toward Th2 immune responses, while high IL-12 (induced from APCs by activated CD1d-reactive T cells) and/or IFN- $\gamma$  (produced by the T cells themselves) relative to IL-4 will drive (or at least be a marker of invariant T cells that will drive) immune responses against tumors or infectious pathogens.

NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells may be biased towards Th1-like NK or lymphokine-activated killer (LAK)-like cytotoxicity of invariant T cells, as well as, IFN- $\gamma$  production to potentially augment their *in vivo* anti-tumor or anti-pathogen activity. Feasibility of this approach is demonstrated by the finding that initial IL-4 bias of invariant T cells can be altered by *ex vivo* expansion in IL-12, which results in markedly higher levels of IFN- $\gamma$  relative to IL-4, making this a promising straightforward method for the generation of Th1 biased invariant T cells (Table 3). Confirmatory results showing that culturing in IL-12 augments both IFN- $\gamma$  production and, significantly, NK / LAK-like cytotoxicity of invariant T cells have recently been published (van der Vliet *et al.*, Immunology 98:557-63, 1999).

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Table 3. Enhanced IFN- $\gamma$  production by invariant NK T cells incubated with IL-12.

		Proliferation	IL-4	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ /IL-4
5	line no IL-12	36239	1.4	60.4	43.1
	1 +IL-12	56593	4.8	>500	>100
	line no IL-12	21858	1.1	18.1	16.5
	2 +IL-12	42499	1.6	331.8	207

CD1d-reactive Va24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup> T cell lines were established with or without IL-12 and stimulated with limiting plate-bound anti-CD3 and excess CD161 antibody to specifically stimulate invariant NK T cells.

Thus, invariant T cells can be re-polarized to the Th1 phenotype by culturing in 0.3 nM IL-12 (Exley *et al.*, *supra* (1998)) during *ex vivo* expansion with an antibody of the present invention. IL-15, IL-18, and type 1 INFs are also known to enhance Th1 polarization of human T cells. Other cytokines or combinations of cytokines that may bias NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells towards Th1, Th2, or immune deviation responses include IL-2, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , and GM-CSF. The Th2 response may be desirable for the prevention or treatment of an autoimmune disease. Alternatively, for the maintenance of pregnancy, cytokines may be used to bias NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells towards immune deviation responses instead of Th1 or Th2 responses. Anti-IL-4 or anti-IL-12 antibodies which bind the cytokines produced by the T cells during expansion may also favor the immune deviation or Th2 response of these T cells. These cytokines may present during the entire time period for T

cell expansion or may be present for only a portion of the time period for T cell expansion, such as during the last few days of T cell expansion.

After expansion in the presence of one or more of these cytokines, the T cells may be functionally tested for secretion of L-4, IL-10, GM-CSF, and IFN- $\gamma$ . The regulation of cytotoxicity against CD1d<sup>+</sup> (CIR, CD1d), 'NK' targets (JY, K562, 721.221, and YAC-1), or LAK targets by cytokine supplementation may also be determined (Exley *et al.*, *supra* (1997); Exley *et al.*, *J. supra*, (1998)).

Alternatively, one or more of the cytokines may be administered *in vivo* to patients before, during, or after re-introduction of the *ex vivo* expanded NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells to bias the re-introduced cells towards Th1, Th2, or immune deviation responses.

**Example 6: Determination of the change in number or activity of invariant T cells induced by a therapy for the treatment or prevention of disease**

The monoclonal antibodies of the present invention may be used in a sensitive and specific method to determine whether a therapy for the treatment or prevention of a disease increases the number and/or preferentially binds or modulates the function of invariant T cells. In contrast, the previously used analysis to determine the effect of *in vivo* IL-12 anti-cancer treatment on invariant T cells has been performed with the relatively insensitive method of flow cytometry with V $\alpha$ 24 monoclonal antibody, in some cases in conjunction with V $\beta$ 11 monoclonal antibody, which has not detected an increase in invariant T cells (n= 10) (Fig. 5). Given the low numbers of invariant T cells in normal donors and the even lower numbers that have been found in advanced cancer patients, the method described below may be used to more accurately determine the

WO 01/98357

PCT/US01/19670

effect of IL-12 treatment, or other treatments, on invariant T cells. Effects of cumulative doses on invariant T cells may be determined by performing this analysis after each dose.

Patients can serve as their own controls in these experiments.

- 5 Approximately 20 ml of peripheral blood can be obtained from patients before treatment is initiated and subsequently during treatment. A small aliquot of these cells (approximately  $10^6$  cells) can be used for synthesis of cDNA, corresponding to mRNA encoding the TCR- $\alpha$  chain, and PCR amplification using V $\alpha$ 24 and C $\alpha$  primers to determine the frequency of
- 10 cells expressing the invariant TCR- $\alpha$  chain. The fraction of invariant TCR in total population may be determined by calibration with an invariant T cell clone diluted in series into a control T cell clone.

- As an alternative to the above PCR analysis, flow cytometry may be used to determine the frequency and number of invariant T cells. Because
- 15 of the low numbers involved, particularly in cancer patients, minimal numbers of conditions and large numbers of analyzed events (100,000) are used for each sample. The anti-CDR3-loop monoclonal antibodies 6B11 and/or 3A6, which have been successfully conjugated to fluorescein using standard methods, may be used in a simple 1- or 2-color FACS analysis.
- 20 Additionally, multi-color FACS may be used for simultaneous analysis of the invariant TCR- $\alpha$  chain using one or more monoclonal antibodies of the present invention and antibodies for other invariant T cell markers (V $\alpha$ 24, CD4, CD8, CD56, CD161, V $\beta$ 11). These results for patient samples before and after treatment may be compared to determine the effect of the
- 25 treatment on invariant T cell numbers. Cytokine production and cytotoxicity by the activated cells may be assessed, as described in Example 5. The results may be normalized for the number of invariant T cells, allowing direct comparisons for patients before and after treatment.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

Alternatively, one round of expansion may be required for quantitation. The patient sample may be directly subjected to monoclonal antibody expansion or the sample may be enriched for invariant T cells by high speed FACS sorting or magnetic bead immunoaffinity purification  
5 prior to expansion, using standard procedures. For enrichment by FACS sorting, one-color sorting using anti-V $\alpha$ 24, 6B11, or 3A6 or 2-color sorting using 6B11 or 3A6 and anti-V $\alpha$ 24, V $\beta$ 11, or CD161 may be performed. Alternatively, for enrichment by immunoaffinity purification, one or more negative or positive selections may be conducted. For  
10 example, a negative depletion may be used to remove monocytes and/or B cells. Then a positive selection could be performed using the V $\alpha$ 24 monoclonal antibody and/or an anti-CDR3-loop monoclonal antibody.

The cells may be cultured with a plate bound or soluble anti-CDR3-loop monoclonal antibody (6B11 or 3A6) or with antigen pulsed  
15 autologous or allogenic APCs. Although single round expansions of T cells are widely representative of initial proportions, the cells may alternatively be cultured for approximately one week prior to expansion to rest activated cells which may respond poorly to expansion compared to resting cells.

20 Approximately 3-4 weeks after primary stimulation, a portion of the cells may be analyzed by flow cytometry with V $\alpha$ 24, V $\beta$ 11, and 6B11 monoclonal antibodies to determine the fraction of invariant T cells. Cytokine production and cytotoxicity normalized for the number of invariant T cells may be compared for patients before and after treatment,  
25 as described above. Moreover, the PCR analysis or FACS analysis of the cells before the primary stimulation may be used to determine to what extent increased recovery of invariant T cells (after the primary

WO 01/98357

PCT/US01/19670

stimulation) reflects expansion *in vivo* due to the treatment versus increased response to *ex vivo* stimulation.

This analysis carried out on 8-10 patients (with on average two time points post treatment) should be adequate to determine whether the treatment has the potential to increase the number or modulate the activity of invariant T cells. If such positive effects on invariant T cells are demonstrated, then further studies correlating invariant T cell responses with dose, schedule, and other immunological functions may be performed. For example, changes in invariant T cell numbers and/or responses may be correlated to key immune parameters including serum IFN- $\gamma$ , TNFs, and IL-15; expression of IL-12 and other Th1 cytokine and chemokine receptors; and changes in T cell, myeloid, and other cell markers (Fas, FasL, Lymphotoxin- $\beta$ , CD3, CD4, CD8, LFA-1, CD80, CD86, CD161).

This method for determining the change in the number or activity of invariant T cells may also be applied to NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells. If a pre-enrichment step is required to quantitate these T cells, any antibody that binds these cells, including antibodies of the present invention, may be used in the initial purification step or a negative selection may be used to remove cells that are not T cells or cells that are not NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells.

**Example 7: Expansion and re-introduction of *ex vivo* expanded invariant T cells into mammals**

Invariant T cells from a peripheral blood sample (20 ml or from the product of leukopheresis) from a mammal may be enriched prior to *ex vivo* expansion using FACS sorting or immunoaffinity purification or expanded directly using an antibody of the present invention, as described in the

WO 01/98357

PCT/US01/19670

previous examples. As mentioned in Example 5, the cells may be expanded in the presence of a cytokine to bias them towards Th1, Th2, or immune deviation responses. Additionally, IL-2, IL-7, or a mitogen may be added to stimulate cell expansion. If necessary, a secondary *ex vivo* expansion, possibly after a second enrichment step, may be conducted under conditions used for the primary expansion to increase both cell number and purity. After stimulation, the cells may be assayed for purity and cytokine production and cytotoxicity as described above. It should be noted that we and others have been able to establish long term human invariant T cell lines and clones from normal donors by multiple rounds of stimulation; thus, similar results are expected from other patients. Desirably at least  $10^6$ , more desirably at least  $10^8$ , and most desirably at least  $10^9$  invariant T cells are obtained after expansion. Desirably, the invariant T cells are at least 60%, 80, or 90% pure, based on the presence of V $\alpha$ 24, V $\beta$ 11, and CD161 invariant T cell markers, and maintain the production of IFN $\gamma$  and cytotoxicity against CD1d<sup>+</sup> and 'NK' targets.

If secondary stimulations do not yield adequate cell numbers, then additional rounds of stimulation may be used. Alternatively, the number of starting cells may be increased by using larger blood samples or through leukopheresis. In this case, an initial enrichment of invariant T cells may be performed by positive selection using the V $\alpha$ 24 or 6B11 monoclonal antibody conjugated to beads, as described above. To increase purity, the invariant T cells may also be purified by FACS or antibody conjugated to beads prior to re-infusion. Additionally, the therapeutic potential of cellular reinfusion of expanded polyclonal invariant T cell lines may be compared to that of expanded invariant T cell clones, or pools thereof.

It is not intended that the administration of *ex vivo* expanded invariant T cells be limited to a particular mode of administration, dosage,

WO 01/98357

PCT/US01/19670

or frequency of dosing; the present mode contemplates all modes of administration, including intramuscular, intravenous, intraarticular, intralesional, subcutaneous, or any other route sufficient to provide a dose adequate to prevent or treat an autoimmune disease, viral infection, 5 bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, host versus graft disease, spontaneous abortion, pregnancy, or cancer. Desirably, the cells are re-introduced into the mammal from which the blood sample was taken. It is also contemplated that the cells may be administered to a different 10 mammal. The cells may be administered to the mammal in a single dose or multiple doses. When multiple doses are administered, the doses may be separated from one another by, for example, one week to one month. As mentioned in Example 5, one or more cytokines may also be administered before, during, or after administration of the cells to bias 15 them towards Th1, Th2, or immune deviation responses. It is to be understood that for any particular subject, specific dosage regimes should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgement of the person administering or supervising the administration of the compositions. Additionally, the T cells may be re-introduced as 20 resting or activated cells, depending on the application. Resting cells would require *in vivo* activation.

**Example 8: Expansion and re-introduction of *ex vivo* expanded NK T cells, CD1d-reactive T cells, or JαQ<sup>+</sup> T cells into mammals**

25 Other NK T cells, CD1d-reactive T cells, or JαQ<sup>+</sup> T cells may be expanded *ex vivo* as described in Example 7. This method may be modified by expanding NK T cells, CD1d-reactive T cells, or JαQ<sup>+</sup> T cells from bone marrow, liver, umbilical cord, or other samples. Desirably, the

WO 01/98357

PCT/US01/19670

sample contains a greater percentage of CD1d-reactive noninvariant T cells than peripheral blood. Additionally, costimulation (using CD1d, lipids, other antigens, or antibodies) or inhibition of costimulation may be used to expand a desired subpopulation of T cells. For example,

5 stimulation of CD28 may favor the expansion of CD1d reactive noninvariant T cells over invariant T cells. Soluble anti-CD161 antibodies that block CD161 stimulation may also favor the expansion of noninvariant T cells which are less dependent on CD161 stimulation than invariant T cells. The amount of plate bound antibody may also be

10 reduced which may increase the dependence on costimulation for expansion of the T cells.

Additionally, the presence of different cytokines or combinations of cytokines may be used to favor the expansion of a desired subpopulation of T cells. For example, the NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T

15 cells may be incubated with IL-4, IL-7, or IL-12 during expansion.

The expanded NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $J\alpha Q^+$  T cells may be re-introduced into mammals as described in Example 7.

**Example 9: Reduced number of invariant NK T cells in cancer patients**

20

As described further below, prostate cancer patients have fewer invariant NK T cells than healthy patients. Thus, the antibodies of the invention that increase the number or activity of invariant NK T cells may be used as therapeutics for the prevention, stabilization, or treatment of

25 prostate cancer. In addition, *ex vivo* expanded invariant NK T cells may be administered to subjects to prevent, stabilize, or treat prostate cancer.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

nvariant NK T cells may also be present at reduced levels in subjects with other types of cancer; thus, these methods may be used to treat other forms of cancer.

5 *Cancer patients analyzed in this study*

Cancer patients in this study had advanced androgen independent prostate cancer (Catalona, N.Engl.J.Med. 331:996, 1994; Bublely and Balk, Hematol.Oncol.Clin.North Am. 10:713, 1996). All patients were treated previously with androgen ablation therapy by orchiectomy or  
10 administration of a leutinizing hormone releasing hormone (LHRH) agonist. At the time of study, all patients had positive bone scans and rising levels of prostate specific antigen (PSA) (>50 ng/ml), indicative of progressive metastatic disease. All but one patient had not received cytotoxic chemotherapy. Prostate cancer patients in remission were  
15 similarly treated with androgen ablation therapy but had negative bone scans and stable, low (<10 ng/ml) levels of PSA.

*Methods used for ex vivo expansion of Va24 positive T cells*

Peripheral blood (10-20 ml) was drawn in heparin containing tubes  
20 from healthy donors and prostate cancer patients who had given their informed consent. PBMCs were isolated using Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Va24 positive T cells were stained with an anti-Va24 monoclonal antibody (C15) (Coulter, Miami, FL) followed by a goat anti-mouse IgG (H<sup>+</sup>L) FITC conjugate (KPL, Gaithersburg, MD) and  
25 were sorted by high speed FACS (Modular Flow FACS, Cytomation, Boulder, CO) (Dellabona *et al.*, J.Exp.Med. 180:1171, 1994). Autologous PBMCs were irradiated (5000 rads) and used as APCs. The FACS purified Va24<sup>+</sup> cells were initially co-cultured in 96 well flat bottomed

WO 01/98357

PCT/US01/19670

plates (approximately 20,000 per well) with equal numbers of autologous irradiated PBMCs in the presence of  $\alpha$ -GalCer (50 ng/ml, KRN7000, Kirin Brewery Co., Gunma, Japan) and recombinant IL-2 (100 U/ml) (National Cancer Institute, Bethesda, MD). Cultures were then gradually expanded  
5 into 24 well plates using the same medium. In some cultures, human recombinant IL-12 (1 ng/ml) (Genetics Institute, Cambridge, MA) was added during the last week of culture.

*Methods used for flow cytometry analysis of expanded T cells*

10 Phenotypic analysis of  $\alpha$ -GalCer expanded cells was performed by two or three color flow cytometry after three to four weeks in culture. Previous reports have shown that dual staining for V $\alpha$ 24 and V $\beta$ 11 is a marker of invariant NK T cells, as V $\alpha$ 24 and V $\beta$ 11 are used very infrequently by bulk T cells (Dellabona *et al.*, J.Exp.Med. 180:1171, 1994;  
15 Exley *et al.*, J.Exp.Med. 186:109, 1997; Prussin and Foster J.Immunol. 159:5862, 1997). Antibodies used were anti-V $\alpha$ 24 PE, anti-V $\beta$ 11 FITC, anti-CD8 $\beta$  PE (Immunotech), anti-CD3 Cychrome, anti-CD161 PE, and anti-CD4 Cychrome (PharMingen, La Jolla, CA). As described previously (Exley *et al.*, J.Exp.Med. 186:109, 1997; Exley *et al.*, J.Exp.Med. 188:867,  
20 1998), approximately  $1 \times 10^6$  cells were suspended in 50  $\mu$ l of FACS buffer (phosphate buffered saline with 1% fetal bovine serum and 0.1% NaN<sub>3</sub>) in single wells of 96 well plates (Exley *et al.*, J.Exp.Med. 186:109, 1997; Exley *et al.*, J.Exp.Med. 188:867, 1998). Non-specific antibody binding was blocked by pre-incubating cells with 10% human serum for 15  
25 minutes on ice. Antibodies were then added to cell suspensions and incubated for 20 minutes on ice. Cells were washed twice with FACS buffer and analyzed using a FACScan (Becton Dickinson) with Cell Quest Software.

The analysis of invariant NK T cells in freshly isolated PBMC from healthy donors and cancer patients also used the 6B11 monoclonal antibody. In these experiments, cells were stained with 6B11-FITC and anti-V $\alpha$ 24-PE (which did not cross-compete) to detect cells expressing the invariant TCR. Due to the low frequency of these cells in cancer patients, between  $10^5$  and  $10^6$  total cells were analyzed.

*Results showing decreased number of invariant NK T cells in cancer patients*

- 10 Invariant NK T cells in the peripheral blood of healthy donors and cancer patients were quantitated by 2-color flow cytometry with a V $\alpha$ 24 monoclonal antibody and a V $\beta$ 11 monoclonal antibody or the 6B11 monoclonal antibody against the invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q TCR. Invariant NK T cell lines, generated by  $\alpha$ -GalCer expansion of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells from
- 15 healthy donors, were reactive with V $\alpha$ 24, V $\beta$ 11, and 6B11 monoclonal antibodies (Figs. 19A and 19D). The observation that V $\beta$ 11 was expressed by virtually all of the  $\alpha$ -GalCer expanded V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells from this and multiple other healthy donors further indicated that this V $\beta$  was necessary to generate  $\alpha$ -GalCer reactive invariant NK T cells.
- 20 V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> double positive T cells were found in the peripheral blood of healthy donors in numbers that were comparable to V $\alpha$ 24<sup>+</sup> 6B11<sup>+</sup> cells, consistent with a large fraction of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> cells being invariant NK T cells (Figs. 19B and 19E). The average fraction of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> 6B11<sup>+</sup> cells in a series of healthy donors was 0.11%. Smaller numbers of V $\alpha$ 24<sup>+</sup>
- 25 V $\beta$ 11<sup>+</sup> T cells were found in the peripheral blood of advanced prostate cancer patients (Tables 4 and 5). Moreover, there were no detectable  $\alpha$ 24<sup>+</sup>

WO 01/98357

PCT/US01/19670

B11<sup>+</sup> cells in 5 of 6 patients examined (Figs. 19C and 19F). These results indicated that invariant NK T cells were decreased in advanced prostate cancer patients.

5 Table 4. Number of invariant NK T cells in PBMC based on staining with the 6B11 and anti-V $\alpha$ 24 antibodies

Donor		Va24 <sup>+</sup> 6B11 <sup>+</sup> (invariant)
10 Healthy (n = 3)	mean	41 x 10 <sup>5</sup>
	range	14 x 10 <sup>5</sup> to 90 x 10 <sup>5</sup>
Prostate Cancer (n = 7)	mean	4 x 10 <sup>5</sup>
	range	0 to 20 x 10 <sup>5</sup>

15

Table 5. Percentage of Va24<sup>+</sup> cells that are invariant T cells based on staining with the V $\alpha$ 24 antibody and either the anti-Vb11 or the 6B11 antibody

20 Donor		<u>Va24<sup>+</sup> Vb11<sup>+</sup></u>	<u>Va24<sup>+</sup> 6B11<sup>+</sup> (invariant)</u>
		Va24 <sup>+</sup>	Va24 <sup>+</sup>
Healthy n=3	mean (range)	4.8% (2 - 7%)	4.3% (1.4 - 6.5%)
25 Prostate Cancer n=6	mean (range)	2.3% (0 - 8.0%)	0.4% (0 - 2.3%)

WO 01/98357

PCT/US01/19670

*Results from expansion of invariant NK T cells from healthy donors*

Due to the small numbers of invariant NK T cells in peripheral blood, one round of *ex vivo* expansion was carried out to further assess the frequency and function of these cells. Invariant NK T cells from healthy donors and advanced prostate cancer patients were isolated from peripheral blood through an initial FACS purification with a V $\alpha$ 24 specific monoclonal antibody, followed by selective expansion *in vitro* for three to four weeks with  $\alpha$ -GalCer and autologous irradiated PBMCs as a source of APCs. T cells were then analyzed by dual staining with V $\alpha$ 24 and V $\beta$ 11 or 6B11 monoclonal antibodies.

FACS purified V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells stimulated *in vitro* with a T cell mitogen, PHA, yielded only a minor population of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> T cells that varied in number with different donors (Fig. 20A). In contrast, stimulation of the purified V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells from healthy donors with  $\alpha$ -GalCer and autologous irradiated PBMCs yielded a major V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> population (Fig. 20B, 94.4% of total cells). Additional phenotypic analysis of these  $\alpha$ -GalCer expanded V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> T cells from a series of healthy donors demonstrated major CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> populations and showed that the majority from each donor (>70%) expressed CD161.

The  $\alpha$ -GalCer expanded V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> T cells from healthy donors were assessed for CD1d recognition and cytokine production. Consistent with many of the cells being CD1d reactive invariant NK T cells, the cells produced substantial quantities of both IL-4 and IFN- $\gamma$  in response to CD1d transfected C1R cells, but not mock transfected C1R cells (Fig. 20C). The CD1d specificity of this recognition was further demonstrated by blocking with an anti-CD1d monoclonal antibody, 51.1, but not an isotype matched control Ab. The cytokine responses to CD1d were equivalent to those obtained after polyclonal stimulation of these T cells

WO 01/98357

PCT/US01/19670

with PHA, confirming that most of the cells were indeed CD1d-reactive T cells. These responses were all comparable to those obtained previously with invariant NK T cell clones from healthy donors (Exley *et al.*, J.Exp.Med. 186:109, 1997; Exley *et al.*, J.Exp.Med. 188:867, 1998),  
5 indicating that these latter *in vitro* established clones reflected the functional status of the cells *in vivo*.

*Decreased expansion of invariant NK T cells from advanced prostate cancer patients*

10 Invariant NK T cells from patients with advanced androgen independent prostate cancer were examined similarly. Relative to the healthy donors, there was a decrease in the total number of cultured cells recovered from patients with advanced androgen ablation refractory prostate cancer and a marked decrease in the fraction of expanded cells  
15 that were V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> invariant NK T cells (Figs. 21A and 21B, 98.5% versus 13.6% invariant NK T cells in a healthy donor and androgen ablation refractory prostate cancer patient, respectively). Also shown are  $\alpha$ -GalCer expanded V $\alpha$ 24<sup>+</sup> T cells from an androgen ablation treated prostate cancer patient in remission (75% invariant NK T cells), indicating  
20 that the androgen ablation therapy did not account for the decreased expansion of invariant NK T cells (Fig. 21C).

Data from a series of patients with advanced androgen independent prostate cancer, all with metastatic disease and rising levels of prostate specific antigen (PSA), confirmed the markedly diminished recovery of  
25 V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> invariant NK T cells (mean of 10 % from prostate cancer patients versus >80% from healthy donors) (Fig. 21D). These results were consistent with the decreased numbers of invariant NK T cells detected by V $\alpha$ 24 and V $\beta$ 11 or 6B11 staining in peripheral blood of the advanced

WO 01/98357

PCT/US01/19670

prostate cancer patients. Other factors including decreased proliferation or increased apoptosis during the *in vitro* stimulations could also have contributed to the lower recovery. In contrast, the recovery of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> invariant NK T cells from prostate cancer patients receiving androgen ablation therapy, but who were in remission, was closer to the healthy donors (Fig. 21D).

**Example 10: Reduced activity of invariant NK T cells in cancer patients**

10 In addition to being present at reduced levels, invariant NK T cells have reduced activity in prostate cancer patients. In particular, these invariant NK T cells produced less IFN- $\gamma$  (a Th1 effector). As described below, incubation with IL-12 increased the activity of these invariant NK T cells to produce IFN- $\gamma$ . These results support the ability of IL-12 to bias  
15 invariant NK T cells towards Th1 responses such as cytotoxic activity which is desirable for the treatment of cancer.

*Methods used for measurement of cytokine production and CD1d reactivity*

20 For cytokine production,  $1 \times 10^5$  cells/well in 96 well plates were co-cultured with an equal number of CD1d or mock transfected C1R cells in RPMI 1640 medium with 10% FBS, 20 U/ml IL-2, and 1 ng/ml PMA, as described previously (Exley *et al.*, J.Exp.Med. 186:109, 1997). Cellular responses to CD1d were blocked with an anti-CD1d antibody, 51.1 at 10  
25  $\mu$ g/ml (Exley *et al.*, J.Exp.Med. 186:109, 1997; Exley *et al.*, Immunology 100:37, 2000). Supernatants were collected at 48 hours and 72 hours for IL-4 and IFN- $\gamma$  measurements, respectively. Released cytokine levels were determined in triplicates by capture ELISA with matched antibody

WO 01/98357

PCT/US01/19670

pairs in relation to cytokine standards (Endogen, Inc. Cambridge, MA). The limit of detection range of these assays for both IFN- $\gamma$  and IL-4 was 10-50 pg/ml.

5 *Results demonstrating loss of IFN- $\gamma$  production by invariant NK T cells from cancer patients*

Prostate cancer patient derived invariant NK T cells proliferated and produced similar levels of IL-4 in response to CD1d transfected cells as invariant NK T cells from a health donor (Fig. 22A). However, their  
10 production of IFN- was markedly reduced relative to invariant NK T cells from the healthy donor (Fig. 22B). Analysis of IL-4 versus IFN- $\gamma$  production by  $\alpha$ -GalCer expanded invariant NK T cells from a series of advanced prostate cancer patients and healthy donors confirmed a striking loss of IFN- $\gamma$  production by the cells derived from prostate cancer patients  
15 (Fig. 22C log scale for IFN- $\gamma$ ). This loss of IFN- $\gamma$  relative to IL-4 was most evident when IFN- $\gamma$ / IL-4 production ratios were compared, with a difference of approximately 50-fold between the prostate cancer and healthy donor derived NK T cell lines (Fig. 22E).

To determine whether this loss of IFN- $\gamma$  production was common to  
20 other T cell populations, bulk peripheral blood T cells from advanced androgen independent prostate cancer patients and healthy donors were stimulated *in vitro* with PHA. The results showed that IFN- $\gamma$  production by bulk T cells from prostate cancer patients was intact (Fig. 22D), with similar IFN- $\gamma$ / IL-4 ratios observed in the cells from prostate cancer  
25 patients versus healthy donors (Fig. 22E). Taken together, these data demonstrated a selective loss of IFN- $\gamma$  production in the invariant NK T cell population from advanced prostate cancer patients.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

As invariant NK T cells may contribute to the anti-tumor effects of IL-12, it was next determined whether these cancer patient derived cells could respond to IL-12. Prostate cancer derived invariant NK T cells were treated with IL-12 (1 ng/ml) during the last week of culture to determine whether they could respond to this cytokine. The IL-12 treated cells showed a marked increase in IFN- $\gamma$  production, and had ratios of IFN- $\gamma$ /IL-4 production that were comparable to those in the healthy donors (Fig. 22E, Cancer + IL-12).

10 **Example 11: Reduced levels of NK T cells in multiple sclerosis patients**

Multiple sclerosis (MS), is an inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system (CNS) that likely involves an autoimmune response directed against self-myelin associated antigens. To determine whether MS patients have fewer NK T cells, the percentages of NK T cells (Va24JaQ<sup>+</sup>) in peripheral blood samples from MS patients with Primary Progressive (n=6) or Relapsing Remitting (n=8) disease were compared to normal donors (n=6). The percentage of NK T cells in normal donors was similar to previous reports ( $0.114 \pm 0.020$ ), whereas the percentage of NK T cells in MS patients with Primary Progressive ( $0.010 \pm 0.007$ ) or Relapsing Remitting ( $0.027 \pm 0.071$ ) disease was significantly less. This smaller number of NK T cells in MS patients suggests that increasing the number and/or activity of NK T cells may be useful for the treatment or prevention of MS, such as Relapsing Remitting, Primary Progressive, or Chronic Progressive MS. Additionally, samples from MS patients may be taken at various time points to determine whether the number of NK T cells in the periphery of these MS patients fluctuates over time and correlates with the status of their disease symptoms.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

**Example 12: Use of 6B11 as a diagnostic tool to study clinical cohorts**

CD1d-restricted T cells may play an immunoregulatory role in multiple immunologic disorders. To test the diagnostic utility of the 6B11 antibody to monitor the clinical status of high-risk prediabetics and HIV-  
5 infected patients, the 6B11-FITC antibody in combination with the V $\alpha$ 24-PE antibody were used to determine the frequency of circulating CD1d-restricted T cells in diabetic patients on the day of diagnosis and in the HIV MACS cohort followed at UCLA medical center. PBL were stained and analyzed by FACS as described above. In addition, dendritic  
10 cell (DC) subtypes were determined for the HIV MACS cohort. The results are summarized in Figs. 23 and 24.

**Example 13: Gene expression in invariant T cells from identical twins discordant for type 1 diabetes**

15 An identification of the pattern of genes activated in a particular T cell type may provide information predictive of the function of that T cell subpopulation. For example, changes in gene expression patterns in the cytokine/chemokine family are particularly relevant given the association of cytokine secretion and the *in vivo* function for T cells. As described  
20 below, the gene expression pattern for V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells was determined to better understand the role of these cells in autoimmunity and type 1 diabetes. These method may also be used to determine the role of any other T cells subpopulation of interest in the development and/or  
progression of any disease or condition.

25 To investigate the transcriptional consequences of T cell receptor activation in human V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones, DNA microarrays were used to quantitate changes in mRNA levels following anti-CD3 stimulation of clones derived from identical twins discordant for type 1 diabetes and IL-4

WO 01/98357

PCT/US01/19670

secretion (Wilson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(13):7411-7416, 200). Activation resulted in significant modulation of 226 transcripts in the IL-4 secreting clone and 86 in the IL-4-null clone. Only twenty eight of these genes were in common. The differences observed suggest both

5 ineffective differentiation of diabetic V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells and a role for invariant T cells in the recruitment and activation of cells from the myeloid lineage.

Because the defect in IL-4 secretion was likely the result of multiple differences, a representative clone pair was chosen for intensive

10 analysis utilizing DNA microarrays that monitor the expression of approximately 6800 genes (Unigene collection). The DNA microarrays provide a practical and reproducible approach for large scale study of complex differences in gene expression (Lockhart *et al.*, Nature Biotechnology 14, 1675-1680, 1996; Holstege *et al.*, Science 283, 83-87,

15 1999; Cho *et al.*, Molecular Cell 2, 65-73, 1998). Expression profiles were determined following four hours of stimulation with anti-CD3 or control IgG. This time point was selected because it was used in a previous analysis of cytokine secretion in clones derived from monozygotic twin pairs discordant for Type 1 diabetes. The number of

20 genes with detectable expression either before or after stimulation was nearly identical for the IL-4 null and IL-4 secreting clones (1523 and 1558, respectively). As expected, the frequency of the majority of transcripts was unchanged. Only about 2/3 of this set (988) were shared between the two clones. The number of genes whose expression after

25 anti-CD3 stimulation was found to increase or decrease by at least 2-fold relative to unstimulated were 86 (6%) and 226 (15%) in the IL-4-null and IL-4<sup>+</sup> clones, respectively. In order to more thoroughly analyze the differences in gene expression between the IL-4 null and IL-4 secreting

WO 01/98357

PCT/US01/19670

clones, genes were grouped into six distinct expression patterns, using the Self-Organizing Map algorithm (Tamayo *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96, 2907-2912, 1999).

When examined on the DNA microarrays, activation of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T  
5 cell clones by anti-CD3 resulted in significant changes in transcripts of the  
cytokine/chemokine family. Marked differences in the expression of  
genes in this category were found when comparing the IL-4<sup>+</sup> with the  
IL-4-null clone (Fig. 25A). The transcriptional changes noted in MIP-1 $\alpha$ ,  
MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-5, IL-13, and GM-CSF have each been  
10 verified at the protein level by ELISA. When comparing clones from the  
disease discordant twins, robust changes were detected in several  
transcripts in the IL-4-null clone including those in common with the IL-4  
secreting clone, and that a total of 1523 transcripts were present at  
significant levels, of which 535 were unique to the IL-4-null clone. In  
15 addition, the clone pairs secreted equivalent amounts of IFN- $\gamma$  in response  
to anti-CD3. Importantly, if a significant portion of the effector function  
of CD161<sup>+</sup> V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells occurs through cytokine secretion, then the  
IL-4 null clone has failed to engage the complete spectrum of  
differentiated function. Recently, defects in the ability to both respond to  
20 activation and subsequently secrete cytokines were also noted in the NK T  
cells of NOD mice (Falcone, *J. of Experimental Medicine* 190, 963-972,  
1999). In addition, this combination of cytokines/chemokines suggests  
that CD161<sup>+</sup> T cells may also recruit and regulate immature dendritic cells  
and monocytes.

25 When comparing the IL-4<sup>+</sup> and IL-4-null clones, significant  
differences in expression were noted in other genes important for cell  
survival, cytokine secretion, and calcium flux that are in part activated  
through PI 3-kinase signaling, such as BCLxL, IAP, PLC $\gamma$ 1 and the *tec*

WO 01/98357

PCT/US01/19670

family kinase, Itk. These transcripts were found at significantly greater abundance in the IL-4<sup>+</sup> clone. Differences were also noted in the expression mRNAs encoding transcription factors and signaling modulators important for cytokine secretion and Th-phenotype. These

5 included GATA3, STAT1, STAT4, JunB, JunD, and NFAT4. Notably, JunB and GATA3 were recently reported to be preferentially expressed in Th2 T cells. Transcriptional activation of GATA3, JunB, as well as JunD, was found selectively in the IL-4<sup>+</sup> clone. The transcripts for STAT1 (IFN- $\gamma$  signaling), STAT4 (IL-12 signaling) and CD161 (a co-activator of

10 V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell proliferation and IFN- $\gamma$  secretion) were overexpressed in the IL-4-null clone relative to the IL-4<sup>+</sup> clone. Importantly, the transcription factor NFAT4 thought to act in part as a suppressor of IL-4 transcription was overexpressed in the IL-4-null clone relative to the IL-4<sup>+</sup> clone. Based on this data, the discordant regulation of other genes such as

15 transcription factors might be predicted to be important for controlling Th-phenotype. A model for regulated genes whose expression concurs with multiple independent biological observations is presented in Fig. 25B.

The transcriptional profile of activated V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones

20 revealed that the defect in IL-4 secretion seen in the clone from a diabetic patient (compared to the identical non-diabetic twin) is only one of a large number of differences in gene expression. Importantly, differences were found in the expression of gene products whose activation is in part regulated by PI3-kinase and they appear to be necessary for the generation

25 of a fully differentiated V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

**Example 14: CD1d on myeloid dendritic cells stimulates cytokine secretion from and cytolytic activity of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells**

DC are a distinct population of bone marrow derived antigen presenting cells that play a key role in initiating T cell responses. In humans, three populations of DC are found at very low frequencies (0.03-0.3%) in peripheral blood. Human DC include two myeloid populations--Langerhans cell precursors (Lin<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>/CD1a<sup>+</sup>/IL-3R<sup>-</sup>) and tissue DC (Lin<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>/CD1a<sup>+</sup>/IL-3R<sup>-</sup>)--and a "plasmacytoid" DC (PDC) population (Lin<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>/CD1a<sup>-</sup>/IL-3R<sup>+</sup>). The PDC population also express CXCR3 and CD62L that facilitate homing to the high endothelial venule and movement into lymphoid tissues. PDC undergo activation in lymphoid through ligation of CD40 or by exposure to LPS and produce a variety of cytokines and upregulate T cell stimulatory capacity. The MDC occupy either the epidermis or dermal and other tissue sites, respectively. MDC reside in peripheral tissues in an immature state and readily take up antigens until such time that they receive a signal provided by infection or tissue damage. At this point they become activated and migrate to the draining lymph nodes where they readily produce cytokine such as IL-12p70 and activate naive T cells. Recent studies support a differential role for the MDC and PDC populations in directing the development of Th1 and Th2 responses. Studies in mice and humans also suggest that defective MDC maturation and function may play a role in type 1 diabetes pathogenesis.

The key role of myeloid dendritic cells in priming Th1 cellular immune responses raises the possibility that V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells may exert their immunomodulatory effects through interaction with these cells. To test this hypothesis, the expression patterns for CD1d found on DC *in vivo*

WO 01/98357

PCT/US01/19670

and *in vitro* were assessed, and the functional consequences of an interaction between V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones and DC cells were examined.

*V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones used for this study*

5 Derivation of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones has been previously described (Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998). Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from normal donors were single-cell sorted for V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11 double-positive cells, which were then grown with irradiated feeder PBMC (50,000 cells/well), irradiated 721.221 lymphoblastoid cells  
10 (500 cells/well), PHA-P (1  $\mu$ g/mL), IL-2 (10 U/ml), and IL-7 (10 U/mL) in RPMI 1640 (Sigma) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 10  $\mu$ g/ml streptomycin (R10). The resultant clones were then propagated with periodic restimulation by anti-CD3 antibody in the presence of  
15 irradiated allogenic feeder PBMC and anti-CD3 antibody. Clones were confirmed to be positive for V $\alpha$ 24 and NKR-P1A by flow cytometry and to have the V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q CDR3 TCR by sequencing.

*Methods used for transcriptional profiling of T cells*

20 Transcriptional analysis of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones was performed using high density oligonucleotide arrays developed by Affymetrix. Briefly, the cells were activated for four hours with 10  $\mu$ g/mL soluble anti-CD3 or control IgG, after which total RNA was isolated and reverse-transcribed. The resultant cDNA was used for *in vitro*  
25 transcription with biotinylated nucleotides to produced labeled antisense RNA which was then hybridized to DNA microarray chips (Genechips<sup>TM</sup>, Affymetrix, San Jose, CA). After staining with

WO 01/98357

PCT/US01/19670

PE-streptavidin, fluorescence of bound RNA was quantitated using a Genechip Reader (modified confocal microscope).

*Assays for cytokine secretion and proliferation*

- 5        Va24JaQ T cell clones were stimulated (25,000/well) with plate-bound anti-CD3 or control isotype antibody for 4, 8, or 24 hours. Supernatants were collected and assayed for IL-4, IFN- $\gamma$ , macrophage inflammatory protein-1- $\alpha$  (MIP-1- $\alpha$ ), MIP-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and GM-CSF by quantitative ELISA (Quantikine kits, R & D Systems, Minneapolis, MN, 10 USA). After 24 hours, 1 $\mu$  Ci/well of [<sup>3</sup>H]-thymidine (Dupont NEN, Boston, MA) was added and incorporation measured as described (Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998). Restriction experiments using CD1 isoforms (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d and pSR- $\alpha$ -neo vector alone) in transfected CIR cells were also performed as previously described 15 (Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998; Exley *et al.*, The Journal of Experimental Medicine 186:1, 1997).

*Preparation of myeloid dendritic cells*

- Monocyte-derived dendritic cells were generated from fresh PBMC 20 using an adaptation of previously published methods (O'Doherty *et al.*, Journal of Experimental Medicine 178:1067, 1993), or positively selected by anti-CD14 microsphere enrichment as described in the manufacturers protocols (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Briefly, freshly isolated PBMC prepared from allogenic or sygneic donors were enriched for 25 monocytes by adherence and washing. Immediately after washing, the remaining monocytes were cultured in R10 supplemented with recombinant human IL-4 (rhIL-4; Genzyme) and rhGM-CSF at 1000 U/ml

WO 01/98357

PCT/US01/19670

each for an additional 7 days, yielding a non-adherent population of cells that were at least 90% CD1a<sup>+</sup>/DR<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> by flow cytometric analysis.

5 *Cytolytic assays*

Cytolytic activity by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell clones was determined by measuring the specific release of <sup>51</sup>Cr at four hours. Target cells were labeled with 50 uCi Na<sub>2</sub> <sup>51</sup>Cr (New England Nuclear, North Billerica MA) for one hour and washed twice. Cytolytic activity was determined in  
10 standard chromium release assays with U-bottom 96-well microtiter plates containing 10<sup>4</sup> labeled target cells per well, with the indicated ratios of effector cells. After a 4 hour incubation at 37 °C, the supernatants were harvested and counted on a gamma counter (Cobra, Packard, Downer's Grove IL). Percent specific lysis was calculated as [(experimental release  
15 - spontaneous release)/(maximal release- spontaneous release)] x 100. For some experiments, cytolysis was tested under conditions of calcium chelation, in the presence of EGTA and MgCl<sub>2</sub> each at 4 mM.

*Antibodies used for this study*

20 The 42.1 anti-CD1d monoclonal antibody was a kind gift from Dr. Steven Porcelli (Brigham & Women's Hospital). F(ab')<sub>2</sub> fragments of 42.1 and IgG1 control antibodies were prepared with an Immunopure F(ab')<sub>2</sub> kit, Pierce (Rockford, IL). Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-mouse IgG-FITC, human adsorbed, was obtained from Caltag (Burlingame, CA, USA)  
25 FcR-Blocking reagent™ human IgG was obtained from Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA). NOR3.2 was obtained from Biosource International (Camarillo, CA, USA). Anti-V $\alpha$ 24, anti-V $\beta$ 11, anti- $\alpha$  $\beta$ TCR, and

WO 01/98357

PCT/US01/19670

anti-CD83 were obtained from Immunotech (Coulter/Beckman, Fullerton, CA, USA). Anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD40L, anti-CD80, anti-CD86, and HLA-DR were obtained from Pharmingen (San Diego, CA, USA). Anti-CD3, clone UCHT1, was obtained from Ancell (Bayport, MN, USA) and IgG1 control from Sigma (St. Louis, MO).

*Methods used for flow cytometry.*

Stained cells were analyzed on a FACScan cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), and single cell sorting was performed using a MoFlo cytometer (Cytomation, Fort Collins, NJ, USA). For CD1d expression of CD40L, T cell clones were activated with PMA and ionomycin as previously described (Wilson *et al.*, Nature 391:177, 1998; Exley *et al.*, Journal of Biological Chemistry 269:15140, 1994).

15 *Western blot analysis for CD1d*

Immunoprecipitates of CD1d from lysates of  $5 \times 10^5$  C1R/CD1d cells,  $4 \times 10^7$  dendritic cells, and  $4 \times 10^7$  control C1R/neo cells were prepared using monoclonal antibody 42.1 coupled to protein A beads. The immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE (5-15%), and probed with an affinity purified rabbit anti-CD1d polyclonal antibody (Exley *et al.*, Journal of Experimental Medicine 188:867, 1998). Bands were visualized by chemiluminescence.

*Immunohistochemistry methods*

25 The NOR3.2 monoclonal antibody was used to determine CD1d expression in fixed, paraffin-embedded tissue by immunoperoxidase staining (Vectastain ABC elite kit with visualization using NovaRed, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Staining was done as per

WO 01/98357

PCT/US01/19670

manufacturer's specifications with NOR3.2 used at 1:100 dilution. The specificity of the signal was confirmed by blocking experiments using a GST-CD1d fusion protein as compared to the GST protein alone.

5 *Results showing activation of CD1d-restricted Va24JaQ T cells by anti-CD3 treatment.*

A detailed analysis of the transcriptional profile of Va24JaQ T cells was performed using high-density oligonucleotide arrays. Activation of clones derived from normal donors resulted in the expression of numerous  
10 effector molecules believed to be important for the recruitment and differentiation of myeloid dendritic cells (Figs. 26A and 26B). Among these were four of sixteen chemokines examined and included MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ , which are thought to recruit macrophages and immature dendritic cells *in vivo*. Also produced were GM-CSF, IL-4, and TNF- $\alpha$ , cytokines  
15 involved in the differentiation and maturation of myeloid dendritic cells and their subsequent maturation. Activation also induced the expression of eight of twenty-six cytokines tested. These cytokines, as well as CD40 ligand and 4-1BB, were produced by each of the Va24JaQ T cell clones examined (Figs. 26A-26D, 27A, and 27B). In addition, activated  
20 Va24JaQ T cells expressed enhanced levels of perforin and granzyme B, proteins usually associated with classic cytotoxic T cells. Thus, their immunomodulatory functions might not be limited to cytokine release, but could involve cytolytic activities as well.

25 *Activation of both cytokine secretion and cytolytic activity of Va24JaQ T cells by CD1d expression on target cells*

In order to investigate Va24JaQ T cell/DC interactions in a completely autologous system, a new set of clones was generated. These

WO 01/98357

PCT/US01/19670

clones were tested for CD1d-specific responses against a panel of lymphoblastoid C1R cells transfected with various CD1 molecules. Cytokine release, as shown for IL-4 and IFN- $\gamma$ , and proliferation of these clones were specifically restricted by CD1d (Fig. 27A). Activation was induced by CD1d but not by CD1a, CD1b, or CD1e, in agreement with previously published results. Additionally, Va24JaQ T cell clones were found to specifically lyse C1R cells expressing CD1d, but not the other CD1 family molecules (Fig. 27B). Thus, CD1d-restricted triggering of the invariant TCR activates the secretion of cytokines and a concurrent cytolitic response, a situation similar to that observed for cytotoxic T cells triggered by MHC class I and peptide epitopes.

*CD1d is expressed on myeloid-lineage dendritic cells*

The combination of cytokines and cytolitic proteins produced by Va24JaQ T cell clones suggested an effector role beyond that of simple Th2 priming by IL-4 secretion, as previously proposed. Given these observations, immune regulation by Va24JaQ T cells might involve interaction with myeloid dendritic cells which are important for the generation of Th1-like responses. Immature dendritic cells were derived from peripheral blood monocytes differentiated *in vitro* with IL-4 and GM-CSF and subsequently matured with monocyte conditioned media (O'Doherty *et al.*, Journal of Experimental Medicine 178:1067, 1993). Peripheral blood monocytes are known to express low levels of CD1d, which is promptly lost on culture *in vitro*. Analysis of mature myeloid dendritic cells (DC1) derived from peripheral monocytes demonstrated the re-acquisition of CD1d expression on the cell surface (Figs. 28A and 28B), whereas activated B and T lymphocytes did not express CD1d. Immunohistochemical analysis confirmed that CD1d was preferentially

WO 01/98357

PCT/US01/19670

expressed *in vivo* on dendritic cells in the paracortical T cell zones of lymph nodes (Figs. 28C-28P). Immunostaining of serial sections confirmed that the CD1d is expressed on dendritic cells that also express CD1a and S100. CD1d was not found to be expressed by follicular dendritic cells or follicle tingle body macrophages, and was largely absent from sinus histiocytes, *i.e.* CD1d expression was targeted to T cell-dependent lymphoid regions. While surveying other histiocytic/monocytic populations in other forms of reactive lymph nodes processes, striking CD1d staining was found on epithelioid histiocytes in both caseating granulomas of *M. tuberculosis* infections and other non-mycobacterial granulomas. Murine V $\alpha$ 14Ja281 T cells have been shown to be required for granuloma formation after challenge with lipid extracts from *M. tuberculosis*. In addition, several tumors which closely resemble dendritic cells and may be their neoplastic counterparts, namely Langerhans cell histiocytosis and interdigitating dendritic cell tumors, also consistently express CD1d. Thus, the expression of CD1d on dendritic cells both *in vitro* and *in vivo* suggests their potential as a physiologic target for V $\alpha$ 24JaQ T cells.

20 *CD1d-restricted lysis of myeloid dendritic cells by V $\alpha$ 24JaQ T cells*

The ability of V $\alpha$ 24JaQ T cells to interact with dendritic cells was confirmed by testing several V $\alpha$ 24JaQ T cell clones for cytolysis of DC from multiple healthy donors of differing MHC haplotypes (Figs. 29A and 29B). Both allogenic and autologous dendritic cells were lysed by the clones, indicating that killing was neither MHC-restricted nor alloreactive. Furthermore, cytolysis was completely abrogated by calcium chelation and markedly inhibited by the anti-CD1d monoclonal antibody 42.1 (Fig. 29C). These data suggest that killing was mediated via the

WO 01/98357

PCT/US01/19670

perforin/granzyme pathway and required CD1d. Comparison of immature (CD83-) versus mature (CD83+) phenotype dendritic cells demonstrated no consistent difference in recognition by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells (Fig. 29A). Activation of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells by dendritic cells also resulted in secretion of both IL-4 and IFN- $\gamma$  (Fig. 29D). Thus, exposure of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells to dendritic cells expressing CD1d triggered both cytolytic functions and cytokine release.

*Feedback Mechanism for immune regulation*

10 After activation by anti-CD3, V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells were found to be capable of secreting a broad panel of cytokines, chemokines, and co-stimulatory proteins important for the recruitment and differentiation of myeloid dendritic cells including IL-4 and GM-CSF. Myeloid dendritic cells cultured in the presence of these gene products expressed CD1d and  
15 became specific targets for CD1d-restricted killing by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells. Furthermore, CD1d was preferentially expressed on myeloid dendritic cells in the paracortical T cell zones of lymph nodes corroborating the *in vitro* expression data.

Because human myeloid-derived dendritic cells (DC1) and  
20 lymphoid-derived dendritic cells (DC2) regulate CD4<sup>+</sup> T helper cell responses, the specific lysis of DC1 cells by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells suggests that their immunomodulatory function is not limited to Th2 bias induced by IL-4 secretion (Maldonado-Lopez *et al.*, J Exp Med 189:587, 1999; Rissoan *et al.*, Science 283:1183, 1999; Reid *et al.*, Curr Opin Immunol  
25 12:114, 2000). When co-cultured with T cells, DC1 cells secreted high levels of IL-12 and induced T cells with a Th1 phenotype. Co-culture with DC2 cells induced a marked Th2 response (Rissoan *et al.*, Science 283:1183, 1999). Thus, the specific lysis of myeloid dendritic (DC1) cells

WO 01/98357

PCT/US01/19670

by V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells may serve as a negative feedback mechanism for limiting Th1 T cell responses (Fig. 30).

Previous reports have shown similar lysis results for NK cells. Activated NK cells lysed dendritic cells suggesting a negative feedback mechanism similar to the one proposed for V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells. In addition, the *in vivo* activation of CD1d-restricted T cells by  $\alpha$ -GalCer treatment resulted in the marked activation of murine NK cells (Carnaud *et al.*, J Immunol 163:4647, 1999). While this mechanism for activation of NK cells may play a role in the regulation of dendritic cells *in vivo*, the direct interaction between CD1d-reactive T cells and DC's demonstrated here would make this step unnecessary.

The site of interaction between V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells and dendritic cells is presently unknown. The paucity of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells in a typical lymph node suggests it may occur extranodally and that the CD1d positive dendritic cells present within the lymph node may be those which escape peripheral destruction (Bendelac *et al.*, Annual Review of Immunology 15:535, 1997; Porcelli *et al.*, Annu Rev Immunol 17:297, 1999). The parallel tissue distributions of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells within the reticuloendothelial system and the *in vivo* expression pattern of CD1d are strong evidence for a key role for their interaction in regulating the generation of cellular immune responses. The CD1d-restricted T cells are distributed in the liver, gut, spleen, lymph nodes, and thymus (Bendelac *et al.*, Annual Review of Immunology 15:535, 1997; Porcelli *et al.*, Annu Rev Immunol 17:297, 1999), sites of active antigen sampling and presentation by professional antigen presenting cells. Unregulated dendritic cells have also been previously shown to be capable of initiating and maintaining autoimmunity by the presentation of tissue-specific self-antigens. Moreover, DCs 'lingered' in the T cell zones of lymph

WO 01/98357

PCT/US01/19670

nodes as a result of missense mutations in the caspase 10 gene of patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome type II (ALPS II), a primary finding in this autoimmune disorder. Dysfunction of CD1d-restricted T cells has been clearly correlated with the development of T cell-mediated autoimmune diseases in both rodents and humans. Furthermore, activation or direct transfer of CD1d-restricted T cells was shown to directly inhibit the development autoimmunity in these murine models of autoimmunity.

In summary, the present data suggest that V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells are activated by CD1d on myeloid dendritic cells (DC1) to secrete chemokines and cytokines important for the recruitment and differentiation of dendritic cells and thus play an important role in modulating dendritic cell function (Fig. 30). This interaction also activates the cytolytic functions of V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells resulting in negative regulation of Th1 cellular immune responses through cytolysis of dendritic cells. This system may be reciprocal to the negative regulation of lymphoid dendritic cells (DC2) by mature T cells which serves to limit Th2 cellular responses (Rissoan *et al.*, Science 283:1183, 1999).

One possible mechanism by which deficient DC maturation and function may contribute to autoimmune disease such as type 1 diabetes includes insufficient antigen presenting cell activity for the generation of regulatory cells (Th2 cells, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T cells) or for the induction of death in effector T cells. It is possible that intrinsic defects in the maturation of MDC may contribute to defects in NK T cell numbers or function. Likewise, defects in NK T cells may reciprocally limit DC maturation or lead to a failure to kill these antigen presenting cells, thus allowing a persistent and untoward immune response.

**Example 15: Methods for determining the effect of antibodies on the targeted T cell subpopulation *in vivo***

Any of the antibodies of the invention may be tested in an *in vivo* animal model to determine the pharmacological and pharmacokinetic properties of the antibodies. For example, the half-life, bio-distribution, and efficacy of the antibody may be determined.

One possible method involves the administration of human invariant T cells or any other T cell population of interest to a SCID or otherwise immune-deficient animal such as a mouse and administration of an anti-invariant T cell antibody or any other antibody of the invention to the animal to determine whether the antibody modulates the activity or number of the administered T cells *in vivo*.

In particular, a population of T cells that contains 1 - 10 million T cells of interest (*e.g.*, invariant T cells or any other subpopulation of T cells) is administered *i.v.* or to any site of interest. One or more antibodies are administered, prior to, concurrent with, or following administration of the T cells. For example, the antibody may be administered at any point during the lifetime of the administered T cells in the host animal. Approximately 1 - 100 ug of the antibody is administered in the same site or in a different site as the site of administration of the T cells. If detectably labeled antibodies are used, the location and amount of administered antibody and/or T cells may be monitored *in vivo* based on fluorescence or radioactivity. Additionally, histology, immunological, and/or biochemical measurements may be performed *ex vivo* on tissues from the animal. The biological activity of the antibody or T cell subpopulation may be measured by analyzing the amount or activity of cytokines in a serum or tissue sample. Moreover, the activation of other cells, such as other T cells, by the administered T cell subpopulation may

WO 01/98357

PCT/US01/19670

be measured. For example, the number of CD69<sup>+</sup> T cells may be measured by FACS sorting with an anti-CD69 antibody.

**Example 16: Administration of antibodies for *in vivo* expansion of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells or for imaging of these cells**

The antibodies of the present invention may be administered to a mammal, possibly in addition to the administration of a cytokine, for the *in vivo* expansion of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells for the treatment or prevention of an autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, or cancer. As described in Example 7, all modes of administration, dosing, and frequency are contemplated.

The pharmaceutical compositions containing one or more antibodies of the invention may be prepared as described previously in Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin. Pharmaceutical stabilizing compounds, delivery vehicles, or carrier vehicles may be used. For example, human serum albumin or other human or animal proteins may be used. Phospholipid vesicles or liposomal suspensions are possible pharmaceutically acceptable carriers or delivery vehicles. These compositions can be prepared according to methods known to those skilled in the art.

An antibody of the invention that is covalently linked to a fluorescent label or radiolabel may be used to visualize the *in vivo* distribution, quantity, or migration of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells. This imaging of NK T cells, CD1d-reactive T cells, or

WO 01/98357

PCT/US01/19670

$\text{J}\alpha\text{Q}^+$  T cells may be used to identify subjects who are at risk for or have an autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, or cancer. Alternatively, this method may be used to determine the effect of a therapy for one of the above diseases on NK T cells, CD1d-reactive T cells, or  $\text{J}\alpha\text{Q}^+$  T cells.

#### Other Embodiments

10 From the foregoing description, it will be apparent that variations and modifications may be made to the invention described herein to adopt it to various usages and conditions. Such embodiments are also within the scope of the following claims.

All publications mentioned in this specification are herein  
15 incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

What is claimed is:

1. A purified antibody that preferentially binds a T cell antigen receptor (TCR), wherein said antibody preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from  
5 the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells.
2. The purified antibody of claim 1, that preferentially binds and preferentially expands an invariant T cell.
- 10 3. The purified antibody of claim 1, that preferentially binds the antigen binding site of the TCR of said T cell subpopulation.
4. A combination of purified antibodies that preferentially binds a TCR, wherein said antibody combination preferentially binds a CDR3-  
15 loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells; wherein said antibody combination is selected from the group consisting of:  
20 (i) an anti-V $\alpha$ 24 antibody and an anti-CD161 antibody;  
(ii) an anti-V $\alpha$ 24 antibody and an anti-CD94 antibody;  
(iii) an anti-V $\beta$ 11 antibody and an anti-CD161 antibody; and  
(iv) an anti-V $\beta$ 11 antibody and an anti-CD94 antibody.

25

WO 01/98357

PCT/US01/19670

5. A fragment or derivative of an antibody, wherein said antibody preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells.

6. A bifunctional antibody comprising:

(a) a first antibody or fragment thereof that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells; wherein said first antibody or fragment binds a first epitope; and

(b) a second antibody or fragment thereof that binds a second epitope expressed on a T cell expressing said TCR or expressed on a NK T cell, CD1d-reactive T cell, or J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cell that is bound by said first antibody or fragment thereof.

7. A stable hybridoma that produces an antibody, wherein said antibody preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

8. A purified T cell subpopulation, wherein said T cells are specifically bound by an antibody or a combination of antibodies, wherein said antibody or said antibody combination preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or wherein said antibody preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells.

9. A method of generating an antibody that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells; said method comprising:

- (a) coupling a cyclic peptide to a carrier;
- (b) immunizing a mammal with said coupled peptide; and
- (c) isolating an antibody that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells.

10. A method of generating an antibody that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells; said method comprising:

- (a) immunizing a CD1 or invariant T cell deficient mammal with invariant T cells; and

WO 01/98357

PCT/US01/19670

(b) isolating an antibody that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells.

5

11. The method of claim 9 or 10, wherein said mammal is a CD1d knockout mouse, a mammal tolerized to NK T cells, a mammal tolerized to CD1d-reactive T cells, a mammal tolerized to J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cell, a mammal tolerized to the invariant TCR, a mammal in which invariant T cells have  
10 been removed, a mammal lacking part of the  $\alpha$  chain of said TCR  $\alpha$  chain, or a mammal lacking part of the  $\beta$  chain of said TCR.

12. A method of measuring the amount of NK TCRs or the amount of NK T cells in a sample, said method comprising contacting said sample  
15 with an antibody that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCRs.

13. A method of measuring the amount of CD1d-reactive TCRs or the amount of CD1d-reactive T cells in a sample, said method comprising  
20 contacting said sample with an antibody that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCRs.

14. A method of measuring the amount of J $\alpha$ Q<sup>+</sup> TCRs or the amount of J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells in a sample, said method comprising contacting  
25 said sample with an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCRs.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

15. A method of visualizing the NK TCRs or the NK T cells in a sample, said method comprising contacting said sample with an antibody that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCRs.

5

16. A method of visualizing the CD1d-reactive TCRs or the CD1d-reactive T cells in a sample, said method comprising contacting said sample with an antibody that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCRs.

10

17. A method of visualizing the  $J\alpha Q^+$  TCRs or the  $J\alpha Q^+$  T cells in a sample, said method comprising contacting said sample with an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCRs.

15

18. A method of diagnosing a subject with a condition or an increased risk for a condition selected from the group consisting of autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, and cancer; said method comprising the following:

(a) contacting a sample from said subject with an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or an antibody that preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells;

25

WO 01/98357

PCT/US01/19670

(b) quantitating the amount of said antibody or said antibody combination bound to said TCR or said T cells; thereby determining the amount of T cells of interest in said sample; and

(c) comparing the amount of said T cells of interest in said sample  
5 to the amount of said T cells of interest found in subjects diagnosed with said condition or subjects not diagnosed with said condition.

19. The method of claim 18, further comprising comparing the amount of another T cell type in said sample with the amount of said  
10 another T cell type found in subjects diagnosed with said condition or subjects not diagnosed with said condition.

20. A method of treating or preventing an autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a  
15 eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, or cancer in a mammal, said method comprising administering to said mammal an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or  
20 preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells.

21. A method of inhibiting T cell pathogenesis in a mammal, said  
25 method comprising administering to said mammal an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop, an antigen binding site, or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of said TCRs; or inhibits the expansion of at least one T cell subpopulation selected from the group of

WO 01/98357

PCT/US01/19670

NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells; said administering sufficient to inhibit a T cell expressing said TCR, a NK T cell, a CD1d-reactive T cell, or a J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cell.

5           22. The method of claim 21, wherein said antibody is covalently linked to a toxin or a radiolabel.

          23. A method of increasing the size of a subpopulation of T cells, said method comprising contacting a sample comprising said T cells with  
10 an antibody that preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells, and T cells expressing a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR that is preferentially bound by said antibody, wherein said contacting occurs under conditions that result  
15 in an increase in the number of said T cells.

          24. The method of claim 23, further comprising contacting said sample with an antigen and antigen presenting cells under conditions that allow said contacting to increase the number of said T cells; wherein said  
20 antigen is not  $\alpha$ -galactosylceramide.

          25. The method of claim 24, wherein said antigen is a lipid or glycosyl-phosphatidylinositol antigen from an infectious pathogen, an antigen from a cancerous cell, or a self-lipid.  
25

WO 01/98357

PCT/US01/19670

26. The method of claim 23, further comprising contacting said sample with an antigen and antigen presenting cells under conditions that allow said contacting to increase the number of said T cells; wherein said antigen is  $\alpha$ -galactosylceramide.

5

27. A method of increasing the size of a subpopulation of T cells, said method comprising:

(a) contacting a sample comprising said T cells with an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or an antibody that preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells; said contacting conducted under conditions that allow complex formation between said T cells and said antibody or said combination of antibodies;

15 (b) isolating said complex; and

(c) contacting said T cells in said complex or recovered from said complex with an antigen and antigen presenting cells under conditions that allow said contacting to increase the number of said T cells; wherein said antigen is not  $\alpha$ -galactosylceramide.

20

28. The method of claim 27, wherein said antigen is a lipid or glycosyl-phosphatidylinositol antigen from an infectious pathogen, an antigen from a cancerous cell, or a self-lipid.

25 29. A method of increasing the size of a subpopulation of T cells, said method comprising:

(a) contacting a sample comprising said T cells with an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ -

WO 01/98357

PCT/US01/19670

$\beta$  junction of a TCR; or an antibody that preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells; said contacting conducted under conditions that allow complex formation  
5 between said T cells and said antibody or said combination of antibodies;  
(b) isolating said complex; and  
(c) contacting said T cells in said complex or recovered from said complex with an antigen and antigen presenting cells under conditions that allow said contacting to increase the number of said T cells; wherein said  
10 antigen is wherein said antigen is  $\alpha$ -galactosylceramide.

30. The method of claim 27 or 29, further comprising contacting said sample or said complex with one or more cytokines.

15

31. A method of increasing the size of a subpopulation of T cells in a mammal, said method comprising:

(a) obtaining a sample comprising said T cells from said mammal;  
(b) contacting said T cells with an antibody or a combination of  
20 antibodies that preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells, and T cells expressing a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR that is preferentially bound by said antibody or said antibody combination; said contacting conducted  
25 under conditions that allow said contacting to increase the number of said T cells; and  
(c) administering said contacted T cells to said mammal.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

32. The method of claim 31, further comprising purifying said T cells prior to said contacting step or after said contacting step.

33. A method of increasing the size of a subpopulation of T cells in a mammal, said method comprising:

- (a) obtaining a sample comprising said T cells from said mammal;
- (b) contacting said T cells with an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or an antibody that preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells; said contacting conducted under conditions that allow complex formation between said T cells and said antibody or said combination of antibodies;
- (c) isolating said complex; and
- (d) contacting said T cells in said complex or recovered from said complex with an antigen and antigen presenting cells under conditions that allow said contacting to increase the number of said T cells; wherein said antigen is not  $\alpha$ -galactosylceramide; and
- (e) administering said contacted T cells to said mammal.

34. The method of claim 33, wherein said antigen is a lipid or glycosyl-phosphatidylinositol antigen from an infectious pathogen, an antigen from a cancerous cell, or a self-lipid.

35. A method of increasing the size of a subpopulation of T cells in a mammal, said method comprising:

- (a) obtaining a sample comprising said T cells from said mammal;
- (b) contacting said T cells with an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a

WO 01/98357

PCT/US01/19670

TCR; or an antibody that preferentially binds or modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and J $\alpha$ Q<sup>+</sup> T cells; said contacting conducted under conditions that allow complex formation between said T  
5 cells and said antibody or said combination of antibodies;

(c) isolating said complex; and

(d) contacting said T cells in said complex or recovered from said complex with an antigen and antigen presenting cells under conditions that allow said contacting to increase the number of said T cells; wherein said  
10 antigen is  $\alpha$ -galactosylceramide; and

(e) administering said contacted T cells to said mammal.

36. The method of claim 33 or 35, further comprising  
administering one or more cytokines to said mammal.

15

37. The method of claim 33 or 35, further comprising contacting said sample or said T cells with one or more cytokines, wherein said contacting alters the ratio of Th1/ Th2/ immune deviation response by said contacted T cells

20

38. The method of claim 33 or 35, wherein said method is used in the treatment or prevention of an autoimmune disease, viral infection, bacterial infection, parasitic infection, infection by a eukaryotic pathogen, allergy, asthma, inflammatory condition, graft versus host disease, graft  
25 rejection, immunodeficiency disease, spontaneous abortion, pregnancy, or cancer in said mammal.

WO 01/98357

PCT/US01/19670

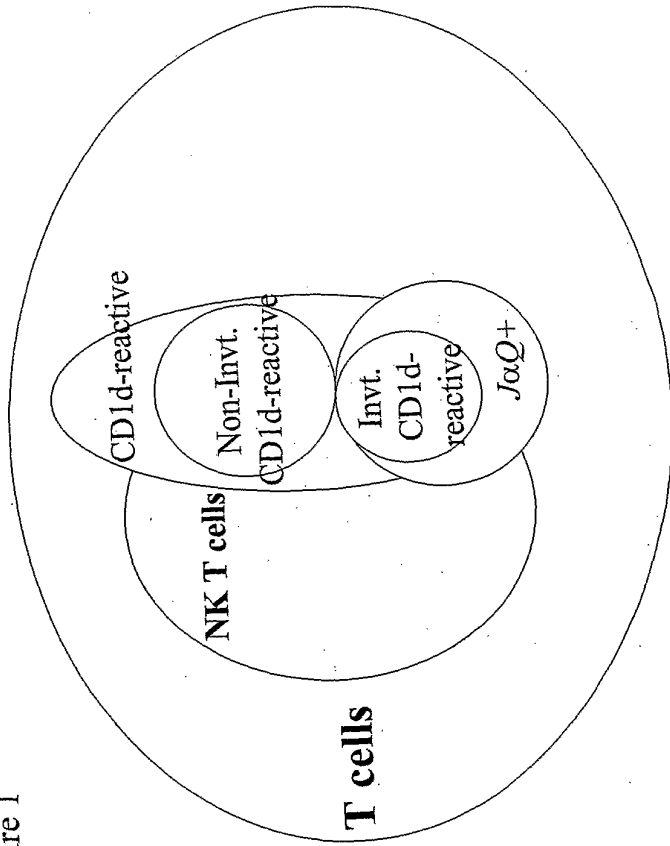
39. A method of purifying a subpopulation of T cells from a sample, said method comprising contacting said sample with an antibody or a combination of antibodies that preferentially binds a CDR3-loop or an  $\alpha$ - $\beta$  junction of a TCR; or an antibody that preferentially binds or  
5 modulates the expansion or activation of at least one T cell subpopulation selected from the group of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and  $J\alpha Q^+$  T cells.

40. The method of claim 39, further comprising contacting said  
10 sample with an anti-V $\alpha$ 24, CD4, CD8, CD56, CD161, or V $\beta$ 11 antibody.

41. The method of claim 39, wherein said antibody is covalently linked to a fluorescent label, wherein said complex is isolated based on the fluorescence signal of said complex.  
15

42. The method of claim 39, wherein said antibody is covalently linked to a magnetic label, wherein said complex is isolated based on the magnetism of said complex.  
20

Figure 1

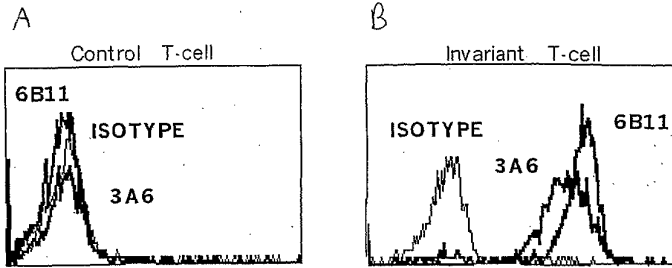


WO 01/98357

2/37

PCT/US01/19670

Figures 2A and 2B



WO 01/98357

3/37

PCT/US01/19670

FIGURES 3A and 3B

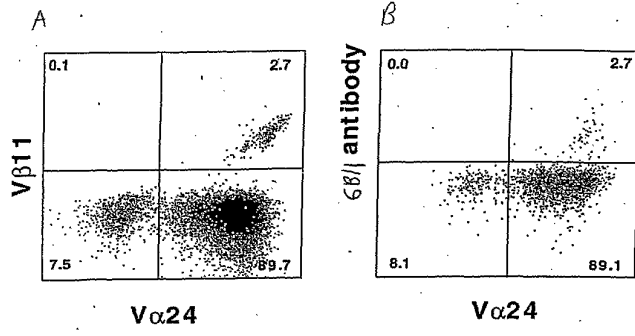
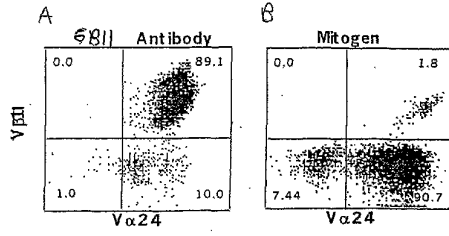


FIGURE 4A and 4B

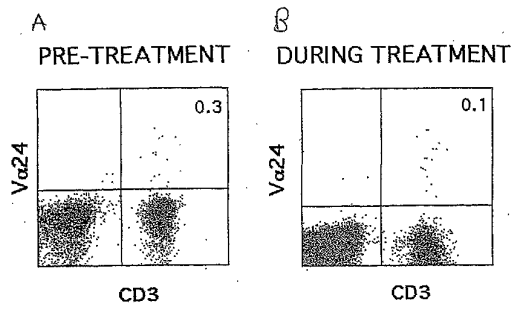


WO 01/98357

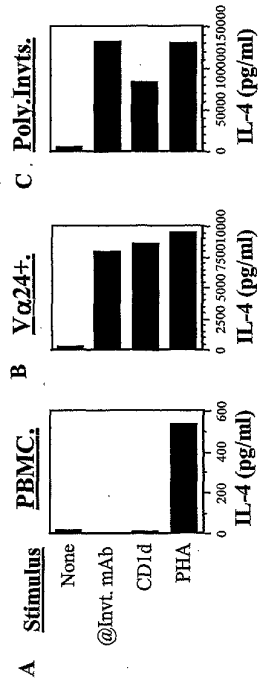
PCT/US01/19670

Figures 5A and 5B

5/37



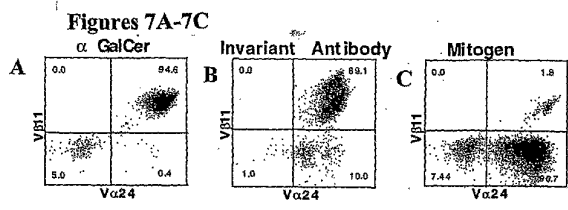
Figures 6A-6C



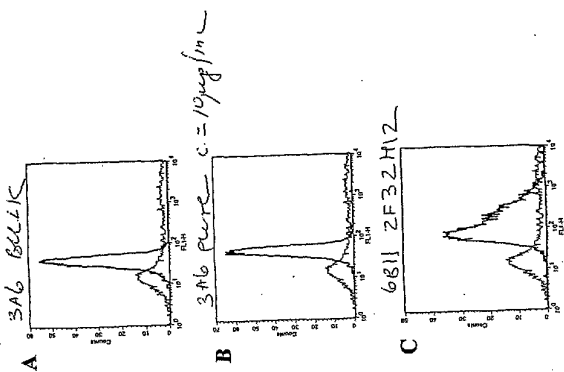
WO 01/98357

7/37

PCT/US01/19670



Figures 8A-8C

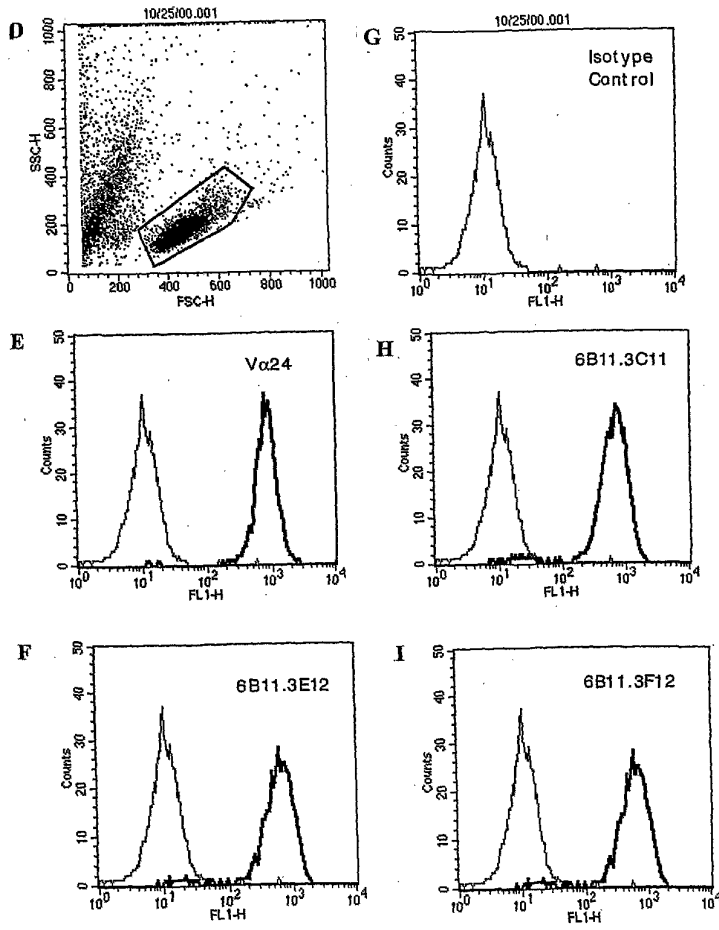


WO 01/98357

9/37

PCT/US01/19670

Figures 8D-8I

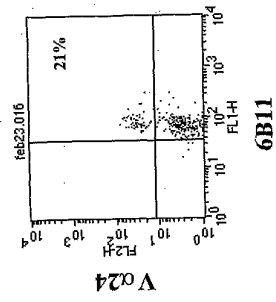


WO 01/98357

10/37

PCT/US01/19670

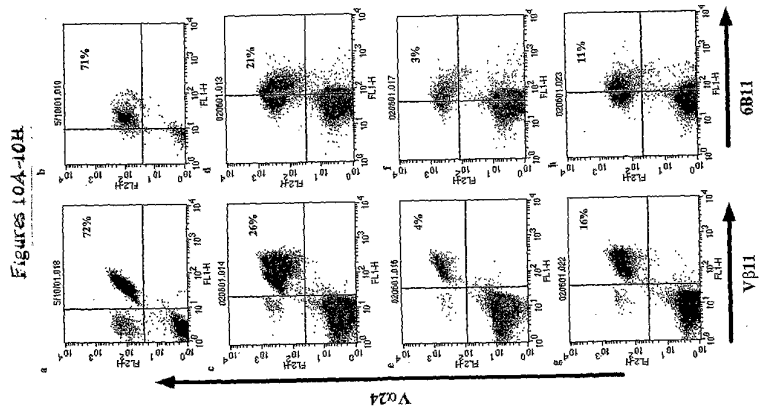
Figure 9



WO 01/98357

11/37

PCT/US01/19670



6B11-Milbana#2  
+TCM#0006

6B11-Milbana#2  
+TCM#0006

6B11-Milbana#2  
+TCM#Dexamethasone

6B11-Milbana#2  
+TCM#EFL#0145

WO 01/98357

12/37

PCT/US01/19670

Figures 11A-11F

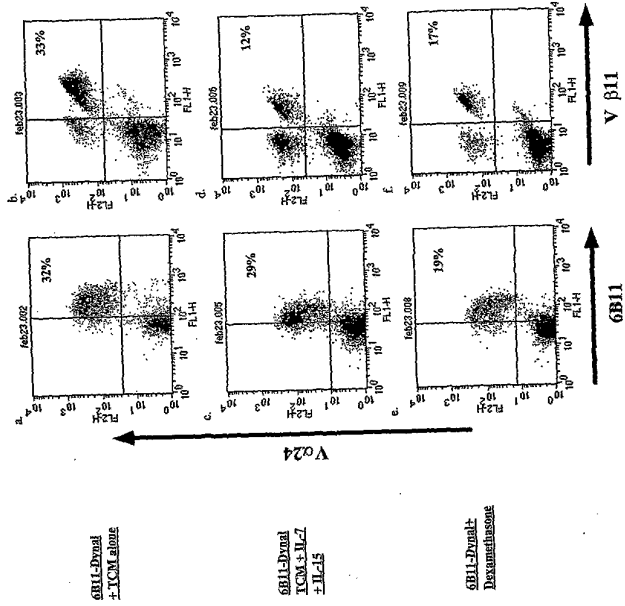


Figure 12

Miltenyi vs. Dynal 4/11/01			
	PBMC	Dynal @ 40	Miltenyi @ 20
<i>Dancer 1</i>			
Va24/6B11	0	8.46	4.53
Va24/Vβ11	0.01	4.85	4.71
Va24		3.9	
<i>Dancer 2</i>			
Va24/6B11	0.01	0.99	5.91
Va24/Vβ11	0.01	1.47	6.16
Va24		0.33	
<i>Dancer 3</i>			
Va24/6B11	0	N/A	71
Va24/Vβ11	0.03	N/A	72
Va24			5.96
LKP 21 unsorted control			
Va24/6B11	0.01		
Va24/Vβ11	0		

Figure 13

Dynal Bead 1/19/01			
LKP 10 on 40 ug/ml 6B11 on TCM			
	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	32.98	Fig. 11b
	V $\alpha$ 24/6B11	32	Fig. 11a
LKP 10 on TCM + IL15/IL7			
	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	12.46	Fig. 11d
	V $\alpha$ 24/6B11	29	Fig. 11c
LKP 10 on TCM + dex			
	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	17.08	Fig. 11f
	V $\alpha$ 24/6B11	19	Fig. 11e
LKP 10 on TCM + IL15/IL7+dex			
	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	4.93	Fig. 10b
	V $\alpha$ 24/6B11	13.81	Fig. 10a

Figure 14

Dyna1 6B11 Bead Prep 3/9/01		
LKP 14 unsorted control		
3/20/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	0.02%
	V $\alpha$ 24/6B11	0.01%
LKP 14 6B11 + PHA + auto APC		
3/20/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	0.09%
	V $\alpha$ 24/6B11	0%
4/20/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	0.13%
	V $\alpha$ 24/6B11	0.00%
	V $\alpha$ 24	0.01%
LKP 14 6B11 + auto APC		
3/20/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	0.68%
	V $\alpha$ 24/6B11	0.02%
4/20/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	0.15%
	V $\alpha$ 24/6B11	0.00%
	V $\alpha$ 24	0.73%
4/27/01	alpha Gal Cer stim	
5/10/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	2.73%
	V $\alpha$ 24/6B11	2.94%
unsorted control		
	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	0.01%
	V $\alpha$ 24/6B11	0.01%
6B11 + PHA + auto APC		
4/20/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	3.64%
	V $\alpha$ 24/6B11	3.75%
5/10/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	5.01%
	V $\alpha$ 24/6B11	4.92%



Figure 16

Miltenyi Prep #1 6B11		1/01
<b>LKP2 +auto APC on TCM</b>		
2/6/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	26.07%
	V $\alpha$ 24/6B11	21%
2/23/01	V $\alpha$ 24/6B11	10.79%
3/26/01	alpha Gal Cer stim	
4/20/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	73.40%
	V $\alpha$ 24/6B11	74.66%
4/27/01	alpha Gal Cer stim	
5/14/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	80.87%
	V $\alpha$ 24/6B11	79.98%
<b>LKP2 +auto APC on TCM + IL7/IL15</b>		
2/6/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	16%
	V $\alpha$ 24/6B11	11%
3/26/01	alpha Gal Cer stim	
4/20/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	54.28%
	V $\alpha$ 24/6B11	56.89%
4/27/01	alpha Gal Cer stim	
5/14/01	V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11	68.05%
	V $\alpha$ 24/6B11	68.65%
	V $\alpha$ 24	1.66%

Figure 17

Miltenyi Prep #2		1/01
LKP 11 on Vα24 + auto APC + PHA		
2/23/01	Vα24/βB11	63.75%
3/20/01	Vα24/βB11	1.43%
	Vα24/βB11	0.07%
4/27/01	alpha Gal Cer stim	
5/10/01	Vα24/βB11	24.78%
	Vα24/βB11	14.94%
LKP 11 on βB11 + auto APC + PHA		
2/23/01	Vα24/βB11	45.27%
LKP 12 on Vα24 + auto APC + PHA		
2/23/01	Vα24/βB11	33.51%
3/20/01	Vα24/βB11	0.25%
	Vα24/βB11	0.25%
4/27/01	alpha Gal Cer stim	
5/14/01	Vα24/βB11	0.00%
	Vα24/βB11	0.00%
	Vα24	55.00%

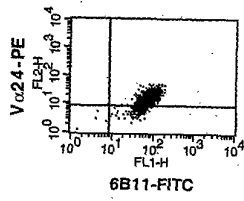
Fig. 10c

Fig. 10d

Fig. 10g

Fig. 10h

Figure 18

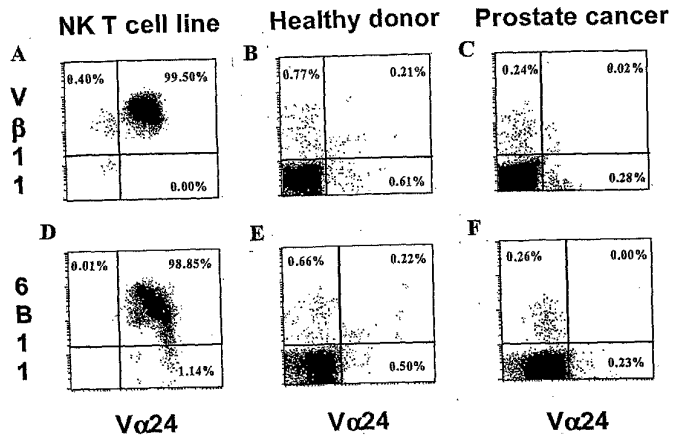


WO 01/98357

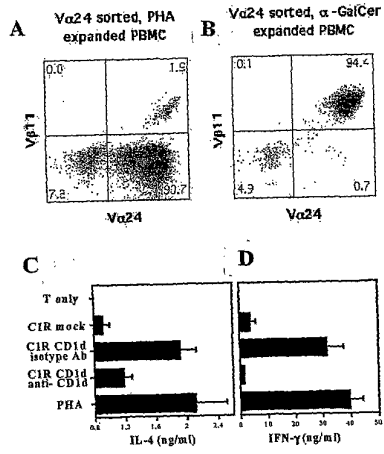
20/37

PCT/US01/19670

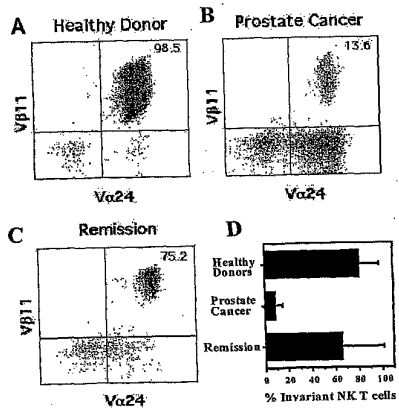
Figures 19A-19F



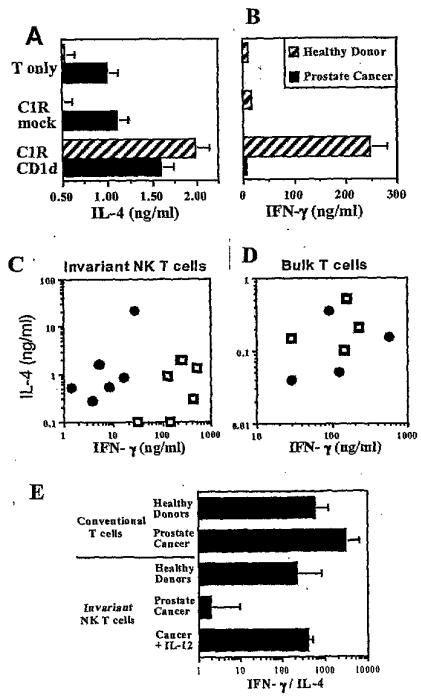
Figures 20A-20D



Figures 21A-21D



Figures 22A-22E



NK-T Dendritic Cell Study  
Sero-Negatives

Figure 23

Date	Patient ID	Name	Serostatus	CD4/ABS	HIV coplasmit.	Lymph Count	T-Cell Count	NK-T Count	% NK-T Lymph	ABS Lymph	% NK-T CD3	ABS NK-T	% CD22 <sup>+</sup> DC    Leuk	% CD71 <sup>+</sup> DC    Leuk	WBC	ABS CD123+DC	ABS CD115+DC
5/3/00	Young		0			44728	27593	44	0.084		0.0000	0.1800	***	***	***	***	***
5/6/00	51841		0	527		79173	64673	74	0.093	1762	1.0695	0.1144	***	***	5400	***	***
5/11/00	42983		0			67708	47628	1	0.0015		0.0000	0.0021	***	***	***	***	***
5/12/00	51821		0	767		47660	32443	4	0.0084	1749	0.1498	0.0123	***	***	5300	***	***
5/24/00	51890		0	621		33001	26842	168	0.5020	1150	5.7847	0.6161	***	***	5000	***	***
5/25/00	51890*		0	621		33895	27347	208	0.6085	1150	6.8975	0.7533	***	***	5000	***	***
5/26/00	52001		0	898		65330	46830	48	0.0735	1832	1.1991	0.1029	***	***	4800	***	***
6/6/00	52035		0	795		61812	50897	15	0.0243	1634	0.3985	0.0294	***	***	3800	***	***
6/14/00	52145		0	796		84897	85717	26	0.0306	1768	0.6415	0.0458	***	***	5200	***	***
6/24/00	52673		0	821		76892	51494	45	0.0688	2160	1.2662	0.0874	0.170	0.320	4000	8.80	12.80
9/6/00	40211		0	1040		96789	78779	65	0.0679	2840	1.1805	0.0711	0.057	0.027	5100	2.83	1.37
9/6/00	52800		0	957		82827	63397	31	0.0375	1740	0.6628	0.0469	0.043	0.084	5900	2.47	4.95
12/24/01	42959		0	0		153419	112395	19	0.0124		0.0000	0.0188	0.032	0.051		0.00	0.00
12/25/01	42945		0	653		79252	44670	15	0.0188	1452	0.2748	0.0334	0.135	0.358	3300	4.47	11.81
12/25/01	42934		0	593		44101	38543	1	0.0023	1122	0.0254	0.0027	0.050	0.086	5100	2.55	4.39
1/24/01	41214		0	***		***	***	***	***	***	***	***	0.069	0.084	0.00	0.00	0.00
1/24/01	42986		0	***		***	***	***	***	***	***	***	0.073	0.082	0.00	0.00	0.00
2/1/01	40986		0	650		76313	67231	42	0.0550	1700	0.6359	0.0625	0.086	0.240	5000	4.31	11.98
2/1/01	40126		0	689		51816	47823	22	0.0396	1377	0.4801	0.0469	0.030	0.043	5100	1.54	2.21
2/22/01	40959		0	0		11785	85872	5	0.0046		0.0000	0.0058	0.040	0.085		0.00	0.00
2/28/01	41842		0	0		82325	48169	12	0.0193		0.0000	0.0249	0.111	0.264		0.00	0.00

Serostatus: 0=seronegative, 1=HIV-1infected, 2=HIV-1 Seroconverter, 3=AIDS  
 >0.02% NK-Tcells || Lymphs considered positive  
 \*5/25/00 (51960) blood is 24 hrs. old

Figure 23 Continued NK-T Dendritic Cell Study Seropositives

Date	Patient ID /Name	Serostatus	CD4 ABS	HIV copies/ml	Lymph Count	T-Cell Count	NK-T Count	% NK-T Lymph	ABS Lymph	NK-T I.C.23	% NK-T DC I.Leuk	% CD123+ DC I.Leuk	% CD11c+ DC I.Leuk	WBC	ABS CD123+DC	ABS CD11c+DC
5/25/00	40253	1	535	2257	70350	50332	6	0.0076	1813	0.1371	0.0119	0.0719	3700	***	***	***
8/7/00	41869	1	699	0	81811	63903	250	0.3056	2254	6.8878	0.3837	0.3837	4600	***	***	***
6/14/00	40846	3	559	0	98796	74485	3	0.0030	2432	0.0739	0.0040	0.0040	7800	***	***	***
9/15/00	45555	1	588	30500	83116	55898	11	0.0116	2088	0.2487	0.0187	0.0187	7200	***	***	***
8/15/00	41400	3	199	167000	50249	43105	6	0.0119	1107	0.1322	0.0139	0.0139	4100	***	***	***
8/28/00	42946	1	768	212000	76925	63605	12	0.0156	2183	0.3421	0.0188	0.070	5100	3.57	13.29	1.37
9/8/00	20461	1	671	309	181054	117247	3	0.0017	3726	0.0617	0.0027	0.029	8100	1.92	1.37	4.58
9/8/00	40177	1	688	0	73001	54850	8	0.0110	1530	0.1877	0.0148	0.080	5100	1.37	1.37	15.98
1/24/01	41411	2	877		108212	88856	34	0.0314	2640	0.8285	0.0383	0.151	6000	9.03	15.98	0.00
1/28/01	40360	2	***	***	***	***	***	***	***	***	0.089	0.132	0.00	0.00	0.00	0.00
2/7/01	41286	1	364		48310	35496	1	0.0021	1219	0.0282	0.0028	0.040	5300	2.14	7.28	0.00
2/7/01	40846	2	0		55088	48321	2	0.0036	0.0000	0.0043	0.078	0.139	0.00	0.00	0.00	0.00
2/8/01	41329	1	0		86792	78696	5	0.0058	0.0000	0.0064	0.072	0.075	0.00	0.00	0.00	0.00
2/8/01	42884*	(unknown)	0		69896	52449	10	0.0159	0.0000	0.0191	0.031	0.038	0.00	0.00	0.00	0.00
2/14/01	42946	(unknown)	0		103913	83889	54	0.0520	0.0000	0.0544	0.039	0.124	0.00	0.00	0.00	0.00
2/22/01	41977	1			121798	95333	25	0.0205	0.0000	0.0263	0.022	0.029	0.00	0.00	0.00	0.00
3/7/01	40605	4			86319	71338	29	0.0338	0.0000	0.0407	0.088	0.062	0.00	0.00	0.00	0.00

Serostatus: 0=seronegative, 1=HIV-1infected, 2=HIV-1 Seroconverter, 3=AIDS  
 >0.02% NK-Tcells (lymphs considered positive  
 \*2/8/01 (22664) Blood is 24 hrs. old  
 \*\*1/28/01, V824 FITC used instead of V824PE

Figure 23 Continued

Date	Patent ID	Smearlets	CD4 ABS	HRV (copies/ml)	Lymph Count	T-Cell Count	LYC Count	% HIV T11 Lymph	% HIV T11 Lymph	% HIV T11 Lymph	CD4/CD8C [Leak]	CD4/CD8C [Leak]
	<b>SEROPOSITIVE</b>											
5/30/00		0			44728	27528	51	0.1140	0.1854			
5/30/00	91841	0			78175	64873	74	0.0695	0.1144			
5/11/00	42883	0			67709	47828	1	0.0019	0.0021			
5/18/00	91821	0			47660	32443	4	0.0084	0.0123			
5/24/00	91960	0			30011	26842	166	0.5630	0.6161			
5/30/00	92001	0			65350	46930	48	0.0726	0.1029			
6/6/00	92065	0			61812	50387	15	0.0243	0.0284			
5/14/00	92145	0			64687	56717	26	0.0308	0.0456			
5/20/00	92673	0		0	78562	51844	45	0.0568	0.0674		0.17	0.32
5/9/99	92800	0		0	82667	63390	31	0.0375	0.0489		0.04	0.08
9/6/99	40211	0	1040		96769	79174	56	0.0579	0.0711		0.06	0.03
	mean				67341.545	49760.079	47	0.09166695	0.119637		0.09	0.14333333
	SD				19580.286	16229.134	45.47397	0.140902923	0.17276109		0.07	0.15626919
	<b>SEROPOSITIVES (DETECTABLE)</b>											
9/9/99	20461	1	671	308	181054	111237	3	0.0017	0.0027		0.02	0.02
5/28/00	40283 Veril 330	1	635	2267	78340	50335	6	0.0076	0.0110			
6/15/00	45565 Veril 335	1	868	30300	93116	55686	11	0.0119	0.0197			
6/7/00	41400 Veril 330	3	189	167000	50249	43106	6	0.0119	0.0138			
8/28/00	42946	1	768		78025	63506	12	0.0146	0.0188		0.07	0.26
	mean				96138.8	64683.4	7.6	0.009714354	0.013399448		0.045	0.14
	SD				46941.568	27022.05	3.781534	0.055326865	0.068081		0.035655339	0.169769527
	<b>SEROPOSITIVES (UNDETECTABLE)</b>											
9/8/99	40177	1	656	0	73001	54946	8	0.0110	0.0146		0.03	0.09
6/7/00	41986 Veril 335	1	899	0	61811	65463	250	0.3996	0.3837			
6/14/00	40846 Veril 330	3	659	0	89789	74486	3	0.0030	0.0040			
8/28/00	42946	1	768		78925	63805	12	0.0166	0.0186		0.07	0.26
	mean				62255.75	64609.75	68.26	0.08224556	0.10776167		0.05	0.175
	SD				11347.896	7698.796	121.2226	0.477948462	0.19671446		0.02826271	0.12626163
	<b>ALL SEROPOSITIVES</b>											



Figure 24

Percent of cells expressing both markers out of the total number of cells collected										
Run	Control 6B11 FC	New Onset 6B11 FC	Control 6B11 FC	New Onset 6B11 FC	Control VB11 PE	New Onset 6B11 FC	Control VB11 PE	New Onset VB11 PE	Control VA24 FC	New Onset VB11 PE
1	0.02	0.07	0.03	0.08		0.28	0.04	0.05		0.08
2	0.10	0.17	0.13	0.28		0.23	0.05	0.08		0.22
3	0.05	0.17	0.00	0.32		0.04	0.09	0.26		0.00
4	0.06	0.33	0.03	0.00		0.00	0.03	0.00		0.23
5	0.03	0.03	0.02	0.00		0.21	0.09	0.00		0.12
6	0.06	0.23	0.08	0.14		0.18	0.06	0.14		0.10
7	0.05	0.09	0.08	0.18	Avg.	0.05	0.06	0.14	Avg.	0.03
	0.03	0.10	0.05	0.11	Std. Dev.	0.05	0.03	0.10	Std. Dev.	0.03
Percent of cells expressing both markers out of the gated population										
Run	Control 6B11 FC	New Onset 6B11 FC	Control 6B11 FC	New Onset 6B11 FC	Control VB11 PE	New Onset 6B11 FC	Control VB11 PE	New Onset VB11 PE	Control VA24 FC	New Onset VB11 PE
1	0.02	0.08	0.03	0.09		0.30	0.04	0.06		0.09
2	0.11	0.17	0.14	0.30		0.25	0.05	0.24		0.27
3	0.06	0.19	0.00	0.33		0.00	0.10	0.00		0.00
4	0.07	0.34	0.03	0.00		0.04	0.04	0.00		0.29
5	0.05	0.04	0.04	0.27		0.10	0.11	0.15		0.15
6	0.07	0.29	0.10	0.17		0.09	0.09	0.15		0.16
7	0.07	0.12	0.08	0.20	Avg.	0.08	0.07	0.16	Avg.	0.11
	0.06	0.18	0.05	0.12	Std. Dev.	0.05	0.03	0.11	Std. Dev.	0.03
	0.03	0.11	0.02	0.17						
	0.03508137									0.068943

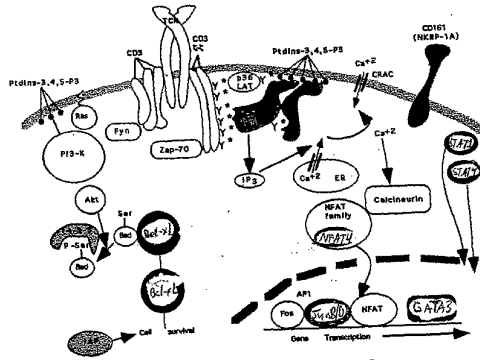


Figure 25A<sub>1</sub> (continued)

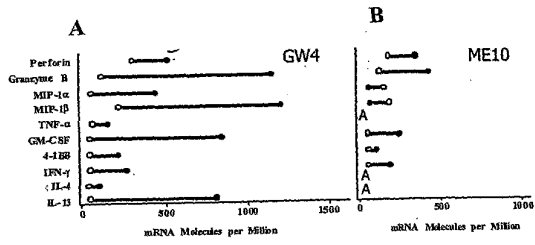
Functional category	Accession no.	Common name	Cluster (row, column)
	HT110	RNP A/B	(1,2)
	Z23064	RNP G	(1,2)
	HT3238	RNP K	(1,2)
	X52379	RNP SmB	(1,2)
	U15009	RNP SmD3	(1,2)
	X85372	RNP Sm F	(1,2)
	U90827	SF SRp40	(1,2)
	X70944	SF (PTP-associated)	(1,2)
	M60858	Nucleolin	(1,2)
	U10323	NF45	(1,2)
	U38846	Stimulator of TAR	(1,2)
	X39417	PROS-27	(1,2)
	X58932	IFN-independent $\gamma$ 2	(1,2)
	X66899	EWS	(1,2)
	X71428	fus	(1,2)
	X72727	Tunp	(1,2)
	X75755	PR264	(1,2)
	Z24724	Poly A site	(1,2)
	L28010	RNP F	(1,3)
	HT4789	RNP I	(1,3)
	U93532	M4	(1,3)
	U69546	RNA BP	(2,3)
Apoptosis	Z23115	Bcl-X <sub>L</sub>	(1,2)
	U45878	IAP-1	(1,2)
	U11621	Fas ligand	(1,2)
	S81914	IEX-1	(1,2)
	U37546	MHC	(1,2)
Chemokine	M23178	MIP-1 $\alpha$	(1,2)
	J04130	MIP-1 $\beta$	(1,2)
	M69203	MCP-1	(1,2)
	L19686	MIF	(1,3)
Protein metabolism	D28473	ILE-tRNA synthase	(1,2)
	U09510	GLY-tRNA synthase	(1,2)
	L25085	SecE1- $\beta$	(1,2)
	X74801	Chaperonin cctg	(1,2)
	X77584	Thioredoxin	(1,2)
	Y00281	Ribophorin I	(1,2)
	Y10807	ARG-methyltransferase	(1,3)
	D13748	EIF-4A1	(1,3)
	X55733	EIF-4B	(2,1)
	X76648	Glutaredoxin	(2,3)

Genes populating the six expression clusters for the 11 gene functional categories shown in Fig. 2 are listed. Each gene is identified by GenBank accession no., (or The Institute for Genomic Research (TIGR) identifier for HT designations), followed by a common name and the specific cluster into which it fell (row, column).

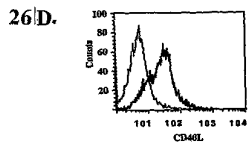
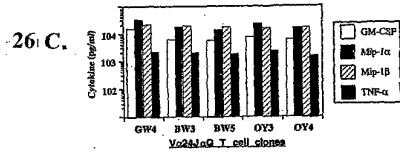
Figure 25B



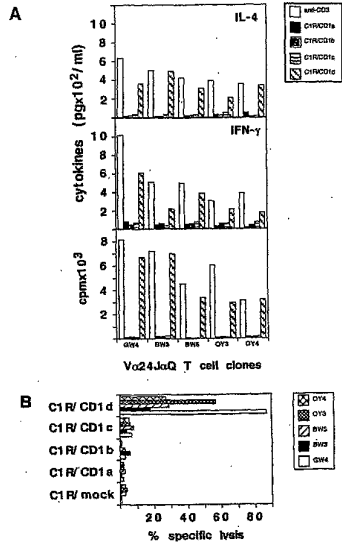
Figures 26A and 26B



Figures 26C and 26D



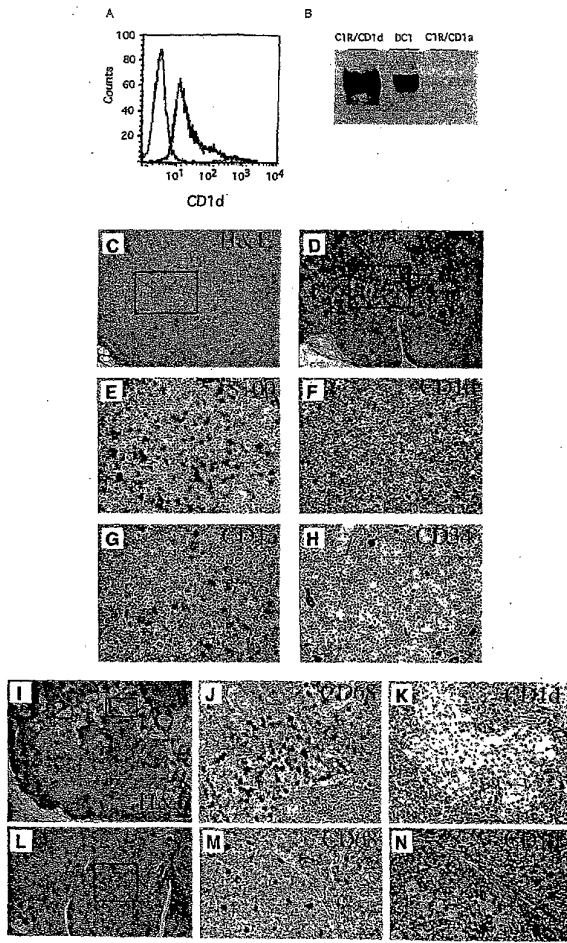
Figures 27A and 27B



WO 01/98357

PCT/US01/19670

35/37  
Figures 28A - 28N



WO 01/98357

36/37

PCT/US01/19670

Figures 29A-29E

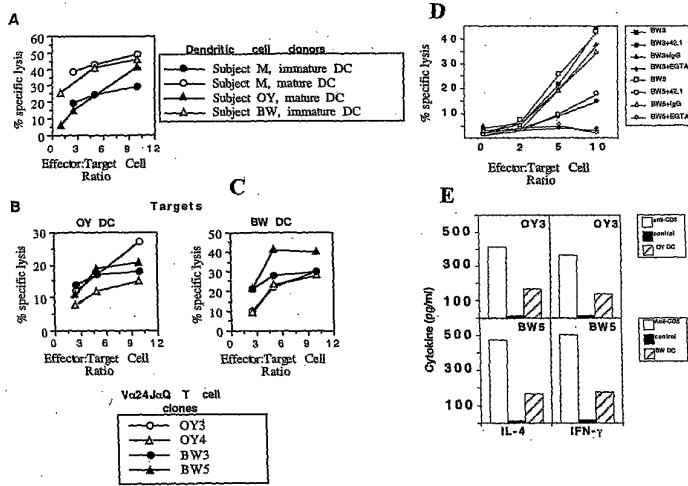
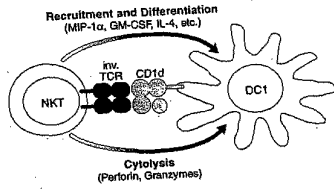


Figure 30



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/098357 A3

(51) International Patent Classification: C07K 16/28, C12N 5/08, C07K 16/46, C12N 5/20, G01N 33/53, 33/577, 33/68, A61K 39/395, 47/48, 51/10, 35/14, A61P 37/00, 31/00, 11/06, 35/00, 15/00

(US) DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. [US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/19670

(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): EXLEY, Mark, A. [GB/US]; 201 Reservoir Road, Chestnut Hill, MA 02467-1426 (US); WILSON, Samuel, B. [US/US]; 33 Homestead Road, Lexington, MA 02421-6530 (US); BALK, Steven, P. [US/US]; 3 Brentwood Circle, Needham, MA 02492 (US).

(22) International Filing Date: 19 June 2001 (19.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(74) Agent: BIEKER-BRADY, Kristina; Clark & Elbing LLP, 176 Federal Street, Boston, MA 02110-2214 (US).

(30) Priority Data: 60/212,466 19 June 2000 (19.06.2000) US

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

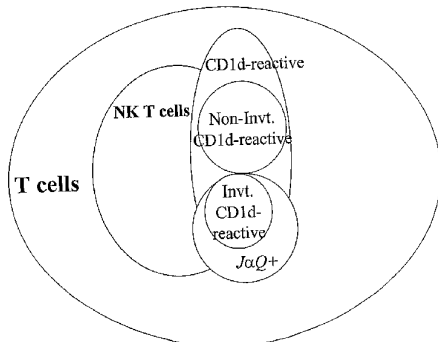
(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 60/212,466 (CIP) US Filed on 19 June 2000 (19.06.2000)

(71) Applicants (for all designated States except US): BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER [US/US]; 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS OF MONOCLONAL AND POLYCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR T CELL SUBPOPULATIONS



(57) Abstract: The invention provides compounds and methods for the ex vivo or in vivo expansion of NK T cells, CD1d-reactive T cells, and JαQ+ cells, and the modulation of their activities. These compounds and methods have diagnostic and therapeutic applications.



WO 01/098357 A3

**WO 01/098357 A3** 

patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(88) Date of publication of the international search report:**  
3 January 2003

**Published:**  
with international search report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Info	Application No
		PCT/US 01/19670	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 7	C07K16/28	C12N5/08	C07K16/46
	G01N33/577	G01N33/68	A61K39/395
	A61K35/14	A61P37/00	A61P31/00
			A61K47/48
			A61K51/10
			A61P35/00
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 bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
BIOSIS, EPO-Internal, MPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
X	WO 99 34209 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 8 July 1999 (1999-07-08)  page 6, line 5 -page 7, line 11 page 7, line 24-29 page 8, line 14 claims 8-10		1, 5-8, 14, 17-20, 31, 32, 39-42
<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		**I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		**II* 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		*A* 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		Date of mailing of the international search report	
6 September 2002		12/09/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 MV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 840-3016		Authorized officer  COVONE-VAN HEES, M	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inten. Application No. PCT/US 01/19670
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61P15/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EXLEY MARK ET AL.: "CD161 (NKR-PIA) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant Valpha24JalphaQ T cell receptor alpha chains." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 188, no. 5, pages 867-876, XP001074739 ISSN: 0022-1007 page 868, left-hand column, line 59 -right-hand column, line 14 table 1  ----- -/--	1, 2, 5, 7-17, 23, 39-42
<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:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 September 2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2240, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-2016		Authorized officer  COVONE-VAN HEES, M

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No  
PCT/US 01/19670

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NICOL A ET AL: "Human invariant Va1pha24+ natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells." IMMUNOLOGY., vol. 99, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 229-234, XP001073724 ISSN: 0019-2805 abstract page 229, left-hand column, paragraph 1 -right-hand column, paragraph 1 page 230, right-hand column, paragraphs 2,3	1,2,7,8, 12-17
X	EP 0 677 533 A (MILTENYI STEFAN) 18 October 1995 (1995-10-18) column 3, line 50 -column 4, line 6 claims	9-11
P,X	EP 1 025 854 A (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 9 August 2000 (2000-08-09) column 2, line 58 -column 3, line 6 example 1 figure 1	1,3,5,7, 20-23
T	WILSON S BRIAN ET AL: "Development of monoclonal antibodies to Va1pha24JalphaQ T cells detects alterations in cell frequency in new-onset type 1 diabetes patients." DIABETES, vol. 50, no. Supplement 2, June 2001 (2001-06), page A267 XP008004082 61st Scientific Sessions of the American Diabetes Association;Philadelphia, Pennsylvania, USA; June 22-26, 2001 ISSN: 0012-1797 abstract	1-42

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/19670
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 20-22,31-38 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.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 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:</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p>	
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Info of Application No  
PCT/US 01/19670

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9934209	A	08-07-1999	AU 2087799 A	19-07-1999
			WO 9934209 A1	08-07-1999
			US 6162609 A	19-12-2000
EP 0677533	A	18-10-1995	CA 2146693 A1	13-10-1995
			EP 0677533 A2	18-10-1995
			JP 8056692 A	05-03-1996
EP 1025854	A	09-08-2000	DE 19905048 A1	10-08-2000
			EP 1025854 A1	09-08-2000

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 15/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 15/06	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/06	
C 1 2 N 5/06	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 N 5/10	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/53	A 6 1 P 43/00	1 0 7
	G 0 1 N 33/53	K
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 5/00	E

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 エクスリー マーク エイ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チェストナット ヒル リザーバー ロード 2 0 1

(72) 発明者 ウィスルソン サミュエル ビー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン ホームステッド ロード 3 3

(72) 発明者 ボルク スティーブン ピー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニーダム プレントウッド サークル 3

F ターム(参考) 4B065 AA91X AA92X AB02 BA08 CA24 CA25 CA44

4C076 AA95 CC04 CC07 CC15 CC26 CC27 CC31 CC34 CC35 CC41

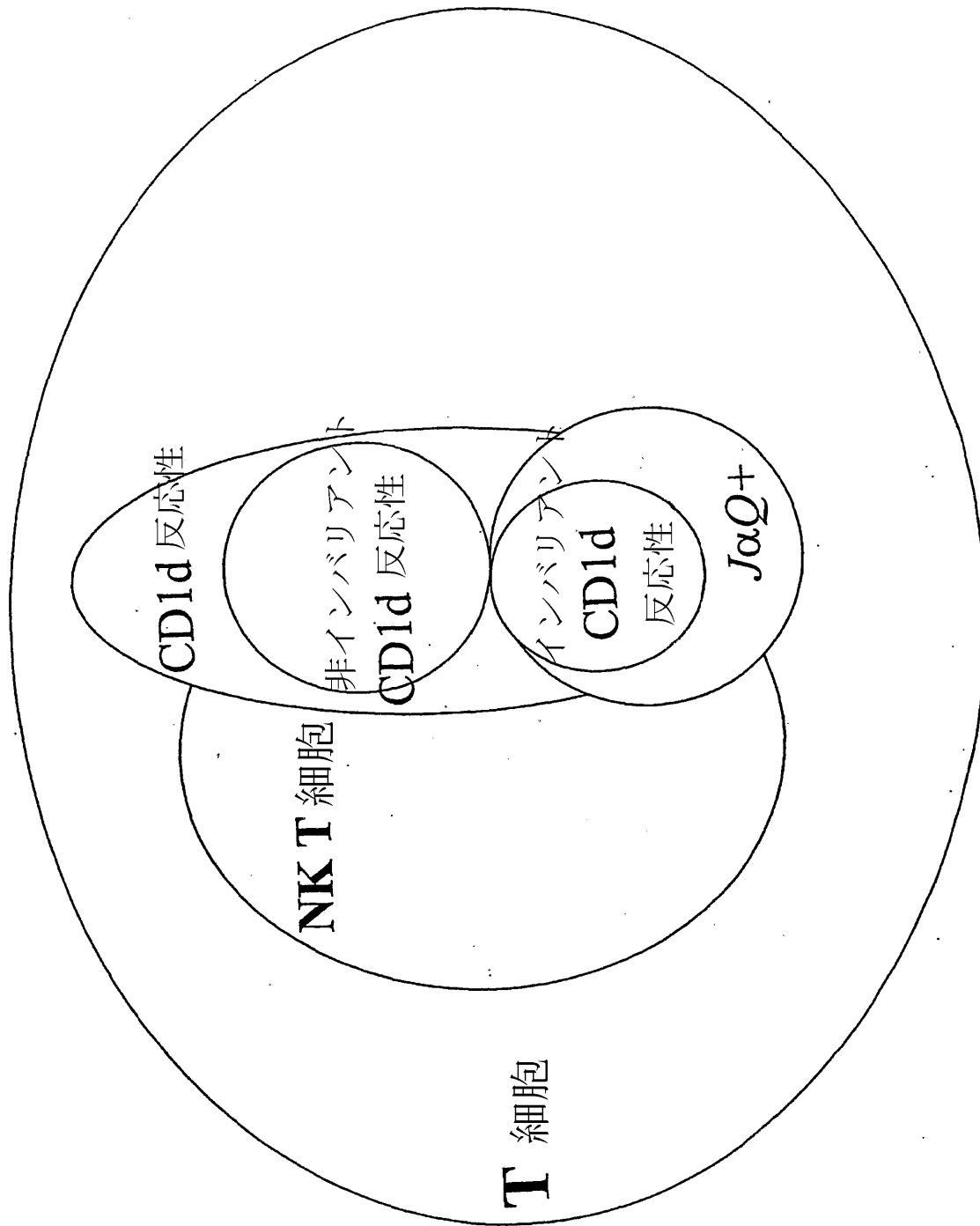
EE41 EE59 FF67

4C085 AA13 AA14 AA27 BB11 BB17 BB18 CC02 CC07 CC08 CC21

CC31 DD23 DD62 DD63 EE01

4H045 AA11 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

【要約の続き】



专利名称(译)	用于T细胞亚群特异性的单克隆和多克隆抗体的组合物和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004501165A</a>	公开(公告)日	2004-01-15
申请号	JP2002504312	申请日	2001-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	贝斯以色列女执事医疗中心 达纳 - 法伯癌症研究所的油墨.		
[标]发明人	エクスリーマークエイ ウイスルソンサミュエルピー ボルクステイーブンピー		
发明人	エクスリー マーク エイ. ウイスルソン サミュエル ピー. ボルク ステイーブン ピー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/12 A61K39/00 A61K39/395 A61K47/48 A61P11/06 A61P15/00 A61P15/04 A61P15/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/28 C12N5/0783 C12N5/10 C12N5/20 C12N5/06		
CPC分类号	A61K2035/124 A61K2039/505 A61K2039/5158 A61P11/06 A61P15/00 A61P15/04 A61P15/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 C07K16/2809 C07K16/2833 C07K16/2851 C07K16/2896 C07K2317/31 C07K2317/34 C07K2317/50 C07K2317/74 C12N5/0636 C12N5/0646 C12N2501/515 C12N2501/599 Y02A50/466 C07K2317/76		
FI分类号	C07K16/28 A61K39/395.C A61K39/395.G A61K39/395.U A61K47/48 A61P11/06 A61P15/04 A61P15/06 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P43/00.107 G01N33/53.K C12N5/00.B C12N5/00.E		
F-TERM分类号	4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/AA95 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC15 4C076/CC26 4C076/CC27 4C076/CC31 4C076/CC34 4C076/CC35 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF67 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA27 4C085/BB11 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085/CC02 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/212466 2000-06-19 US		
其他公开文献	JP5184732B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供用于离体或体内<扩增NK T细胞, CD1d反应性T细胞和JαQ+细胞的化合物和方法, 以及它们活性的调节。这些化合物和方法具有诊断和治疗应用。

