

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 535983

(P2002 - 535983A)

(43)公表日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 5/06		A 6 1 K 35/14	C 4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/14		39/00	H 4 C 0 8 5
39/00		A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/04		35/00	4 H 0 4 5
35/00		37/04	

審査請求 未請求 予備審査請求(全 60数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 597412(P2000 - 597412)

(86)(22)出願日 平成12年2月2日(2000.2.2)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月2日(2001.8.2)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/00240

(87)国際公開番号 W000/46352

(87)国際公開日 平成12年8月10日(2000.8.10)

(31)優先権主張番号 99/01187

(32)優先日 平成11年2月2日(1999.2.2)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 ピエール、ファール、メディカマン
フランス国ブローニュ、ピヤンクール、ブ
ラス、アベル、ガンズ、45

(72)発明者 ジーニン、パスカル
フランス国、エフ - 01220 ディヴォンヌ -
レ - ベン、シュマン ドゥ レヴェール
135

(72)発明者 デルネストゥ、イヴ
フランス国、エフ - 01220 ディヴォンヌ -
レ - ベン、シュマン ドゥ レヴェール
135

(74)代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 8 6 分子を発現するヒトエフェクターTリンパ球およびその治療的使用

(57)【要約】

本発明は、機能的なC D 8 6 分子を発現するT細胞、該
T細胞のほぼ均一な集団の調製方法、ならびに治療およ
び診断におけるその適用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 機能的なCD86分子を発現する、ヒトTリンパ球。

【請求項2】 共刺激性であり且つ細胞傷害性であることを特徴とする、請求項1に記載のヒトTリンパ球。

【請求項3】 以下の分子：CD54、CD25、CD80、CD30、CD40-LおよびCD70のうち少なくとも1つを発現することを特徴とする、請求項1または2のいずれかに記載のヒトTリンパ球。

【請求項4】 請求項1～3のうちの1項に記載された機能的なCD86分子を発現するヒトTリンパ球の実質的に均一な集団を製造する方法であって、ヒトTリンパ球を含むサンプルを用いて、該リンパ球の少なくとも2回の連続的な刺激を実施することを特徴とする方法。

【請求項5】 少なくとも1つのアクチベーター、およびヒトTリンパ球の増殖を刺激する少なくとも1つのサイトカインを用いて各刺激を実施することを特徴とする、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 アクチベーターが抗CD2、抗CD3および抗CD28抗体ならびにマイトジェンから選択され、ヒトTリンパ球の増殖を刺激するサイトカインがIL-2、IL-4およびIL-7から選択されることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 ヒトTリンパ球を含むサンプルが、血液単核細胞(MNC)のサンプルまたはMNC中に存在するTリンパ球の単離物であることを特徴とする、請求項4～6のうちの1項に記載の方法。

【請求項8】 以下の混合物：

- 抗CD3抗体およびIL-2、ならびに
- 抗CD3抗体、抗CD28抗体およびIL-2、

のうちの一方を用いて、刺激を実施することを特徴とする、請求項4～7のうちの1項に記載の方法。

【請求項9】 刺激の後、Tリンパ球の増殖を刺激するために、サイトカインを定期的に添加することを特徴とする、請求項4～8のうちの1項に記載の方法。

【請求項10】 2回の刺激の間隔が少なくとも4日、好ましくは7日であることを特徴とする、請求項4～9のうちの1項に記載の方法。

【請求項11】 第二の刺激後、好ましくは、4日より多くが経過した後に、実質的に均一な集団が産生され得ることを特徴とする、請求項4～10のうちの1項に記載の方法。

【請求項12】 機能的なCD86分子を発現するヒトTリンパ球の実質的に均一な集団であって、請求項4～11のうちの1項に記載される方法を用いて産生され得る集団。

【請求項13】 リンパ球が共刺激性、免疫刺激性、および細胞傷害性であることを特徴とする、請求項12に記載の集団。

【請求項14】 請求項12および13のいずれかに記載の集団であって、リンパ球が、以下の分子：

- CD54、CD25およびCD80、

のうちの1つをさらに発現することを特徴とする集団。

【請求項15】 請求項12～14のうちの1項に記載の集団であって、リンパ球が、以下の分子：

- CD30、CD40-LおよびCD70、

のうちの1つをさらに発現することを特徴とする集団。

【請求項16】 請求項12～15のうちの1項に記載される、機能的なCD86分子を発現するヒトTリンパ球の実質的に均一な集団であって、該集団が、生物学的な抽出物、または生物学的な誘導體もしくはペプチドもしくはリポペプチドでパルスされていることを特徴とする集団。

【請求項17】 請求項12～16のうちの1項に記載の、機能的なCD86分子を発現するヒトTリンパ球の実質的に均一な集団であって、該集団がDNAでトランスフェクトされているか、あるいは化学的分子または免疫学的分子に結合されていることを特徴とする集団。

【請求項18】 請求項12～17のうちの1項に記載のTリンパ球の集団によって産生されるリンフォカイン。

【請求項19】 請求項18に記載のリンフォカインから得られる精製リン

フォカイン。

【請求項20】 請求項1～3のうちの1項に記載のヒトTリンパ球、または請求項12～17のうちの1項に記載の集団、または請求項18および19のいずれかに記載のリンフォカインを少なくとも含むことを特徴とする治療的組成物。

【請求項21】 請求項1～3のうちの1項に記載のリンパ球、あるいは請求項12～17のうちの1項に記載の集団の使用であって、先天性、後天性、または病気に起因する免疫不全の治療を意図した医薬品を調製するための使用。

【請求項22】 請求項1～3のうちの1項に記載のリンパ球、あるいは請求項12～17のうちの1項に記載の集団の使用であって、微生物疾患の治療を意図した医薬品を調製するための使用。

【請求項23】 請求項1～3のうちの1項に記載のリンパ球、または請求項12～17のうちの1項に記載の集団の使用であって、癌の治療を意図した医薬品を調製するための使用。

【請求項24】 請求項1～3のうちの1項に記載のリンパ球、または請求項12～17のうちの1項に記載の集団の使用であって、敗血性ショックの治療を意図した医薬品を調製するための使用。

【請求項25】 請求項1～3のうちの1項に記載のリンパ球、または請求項12～17のうちの1項に記載の集団を少なくとも含むことを特徴とするワクチン。

【請求項26】 機能的なCD86分子を発現するTリンパ球を、血液または組織サンプル中で検出することによる免疫不全の診断方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、機能的なCD86分子を発現するリンパ球、これらのリンパ球の実質的に均一な集団を調製するための方法、ならびに治療および診断におけるその使用に関する。

【0002】

Tリンパ球は、免疫応答を調節するにあたり重要な役割を果たし、そしてまた、記憶免疫応答の維持においても重要な役割を果たす。Tリンパ球が産生する可溶性メディエーターならびにTリンパ球が発現する表面分子の特徴によって、それらは多くのエフェクター免疫細胞、例えば、Bリンパ球、単球、マクロファージ、および樹状細胞（イニシエーターおよびレギュレーターとしての役割）などの活性化状態を制御し、そして外的病原因子（例えば、ウイルスおよび細菌など）または腫瘍細胞（直接的なエフェクターの役割）の破壊に直接貢献する。Tリンパ球は、機能特性を獲得するために活性化される必要がある（Swain S Lら、Immunol Rev. (1996) 150, 143-67）。

【0003】

細胞免疫治療とは、自己細胞がインビボでは獲得できない特定の生理学的特性をそれらに与えるために、エキソビボ（ex vivo）で改変された自己細胞を患者に再注入することからなる治療である。例えば、癌または免疫抑制に罹患した個体は、効果的なエフェクター応答を示さない。従来の細胞免疫治療のアプローチは、リンパ球の増殖を誘発するため、ならびにTリンパ球に細胞傷害特性を与えるために、血液単核細胞（blood mononucleated cell）（MNC）の除去、ならびにインビトロでMNCを刺激することからなる。それらを再注入する前に、エキソビボでMNCを刺激する利点によって、Tリンパ球アクチベータの全身注入に関連した毒性を回避することが可能となる。

【0004】

細胞免疫治療に使用され得るエフェクターT細胞をエキソビボで作り出すための種々の方法が報告されている。この種のアプローチにおいて従来的に使用されるサイトカインの一つはインターロイキン2（IL-2）であり、これは、T

リンパ球の増殖を促進すること、およびTリンパ球に細胞傷害特性を獲得せしめることで作用する(Mule JJら、Science(1984)225, 1487-9および特許WO 91/4444)。他のTリンパ球刺激剤、例えば、サイトカイン類(例えば、IL-4またはIL-7)、または表面分子に向けられた活性化抗体(例えば、CD3分子(Landegren Uら、Eur J Immunol.(1984)14, 325-8)、CD2(Van Lier RAら、Eur J Immunol.(1988)18, 167-72および欧州特許40 96 55)および/またはCD28分子(Greenfield EAら、Crit Rev Immunol.(1998)18, 389-418)は、これらの細胞をつくり出すために、単独か、または組み合わせて使用される。

【0005】

しかし、インビトロでのMNCの活性化は、Tリンパ球の均一な集団(すべてが十分に決定された表現型および機能を有する)の拡大を生じるのではなく、活性化、表現型および機能特性の程度が異なる集団のセットを生じる。その産生に再現性があり、その表現型の特徴が公知であり、容易に同定可能であり、そして同時に幾つかのエフェクター機能(すなわち、細胞傷害特性以外の、免疫抑制という事象において有益な免疫学的特性)を有するであろう均一な集団をつくり出すことは、かなりの進歩を構成する。これによって、(i)エキソピボでの刺激手順を最適化し、(ii)調製物の組成を個体に対してエキソピボで評価し、(iii)目的の細胞のみを患者に注入し、そしてそれによって、(iv)治療の有効性を増大させることが可能となる。

【0006】

最近まで、Tリンパ球の分集団の機能特性と表現型との間の関係は、完全に解明されていなかった。CD4型Tリンパ球は、クラスIIの主要組織適合性複合体(MHC II)と一緒にあって抗原提示細胞(AgPC)により提示された抗原フラグメントを認識し、そして「ヘルパー」特性(すなわち、Bリンパ球および細胞傷害性Tリンパ球がその機能特性を獲得することを補助し得る特性)を有すると考えられる。CD8型リンパ球は、MHC Iと一緒にあってAgPC

により提示された抗原フラグメントを認識し、そして一般的に、細胞傷害特性を有すると考えられる。さらに、幾つかの分子、例えば、CD25およびCD54分子などの増加した発現が、活性化されたTリンパ球を特徴付けることが明確に立証されている (Swain SLら、Immunol. Rev (1996) 150、143-67)。抗原に遭遇していない、その抗原に対して特異的であるTリンパ球は、ナイーブTリンパ球と呼ばれ、そしてCD45RA分子の発現によって特徴付けられる。抗原とすでに遭遇した、その抗原に対して特異的であるTリンパ球は、記憶Tリンパ球と呼ばれ、そしてCD45RO分子を発現する (Swain SLら、Immunol. Rev. (1996) 150、143-67)。

【0007】

Tリンパ球を活性化するために必要なシグナルの強度および性質は、Tリンパ球がナイーブTリンパ球であるかまたは記憶Tリンパ球であるかによって変化する。正確に活性化され、そしてエフェクター細胞へと分化させるために、ナイーブTリンパ球は、記憶Tリンパ球よりも多くの共刺激シグナルを受容しなければならない。これらの共刺激シグナルはAgPCによって提供され、特に樹状細胞によって提供される。共刺激シグナルの非存在下でこのリンパ球が抗原と遭遇すると、リンパ球はアネルギー性もしくは寛容となるか、あるいはアポトーシスによって死滅する。つまり、(組換え可溶性リガンドまたはこのリガンドを発現する細胞トランスフェクタントを用いて) Tリンパ球が発現する共刺激分子を介してTリンパ球を活性化することに関する処置は、従って、例えば、癌において遭遇した寛容の現象および非認識 (ignorance) の現象を処置するため (Melerio Iら、Life Sci. (1997) 60、2035-41) だけでなく、外的病原因子に対する免疫応答の効果を増加させるため (Kaye PM、Immunol Today (1995) 16、423-7) の治療的アプローチとして提案されている。

【0008】

多くの公知の共刺激分子の中でも、CD86分子は非常に強力な共刺激特性を有する。CD86分子は、多くのAgPCの表面において構成的に発現される (

Lenschow DJら、Annu Rev Immunol (1996) 14、233-58)。CD86分子は、2つのリガンドを有する：(1)CD28分子、これはTリンパ球によって構成的に発現され、そしてCD86分子(またはCD80分子)にライゲーシオンした後、Tリンパ球に対して強力な活性化シグナルを発生する、ならびに(2)CTLA-4分子、これは活性化されたTリンパ球によってのみ発現され、そしてCD86分子(またはCD80分子)にライゲーシオンした後、阻害シグナルを発生する。従って、Tリンパ球の機能活性は、それぞれCD28およびCTLA-4分子により媒介される活性化シグナルならびに阻害シグナルによって部分的に調節される。最近、CD86分子の発現および役割がTリンパ球の表面において例証された。Tリンパ球でのその発現の調節はよく理解されていないままであり、そしてヒトおよびマウスにおいて異なるようである。ネズミTリンパ球は、自然発生的に機能型のCD86を発現する(Hakamada-Taguchi Rら、Eur J Immunol. (1998) 28、865-73)のに対して、血液から新たに単離したヒトTリンパ球はこれを発現しない。その生物学的活性は評価されていないが、CD86分子は、インビトロでのMNCの活性化の後のヒトTリンパ球において記載されている(Azuma Mら、Nature (1993) 366、76-9)。CD86分子の生物学的活性をヒトT細胞において評価した唯一の研究は、ヒトTリンパ球クローンが使用するものであり、そして、これらの細胞によって発現されたCD86分子が(AgPCによって発現されたCD86分子と比較して)低グリコシル化されていて、そして不活性であることが報告されている(Hollberg Pら、J. Immunol. (1997) 159、4799-805)。

【0009】

本発明は、機能的なCD86分子の発現によって、また、細胞傷害特性および免疫刺激特性ならびに特に共刺激特性によっても特徴付けられる、ポリクローナルヒトTリンパ球の新規で実質的に均一な集団に関する。

【0010】

共刺激特性は、CD86分子の発現によって部分的にのみ媒介され、多くの他

の共刺激分子は、これらの細胞上で非常に有意なレベルで、または選択的に発現される。

【0011】

現在、免疫治療において、特に、癌科学(cancerology)において、共刺激分子が担い得る必須な役割に次第に大きく関心が寄せられるようになっている。それ故、任意のトランスフェクションまたは改変の非存在下で、多くの共刺激分子、特に機能的なCD86分子を構成的に発現するこれらのTリンパ球の使用は、極めて重要な寄与であるようである。

【0012】

本質的に、インビトロでのMNCの刺激の後に共通して生じる細胞傷害特性に加えて、本発明において特許請求されるようなTリンパ球は、共刺激特性および免疫刺激特性をともに示し、これらは、AgPCによって一般的に導入されない特性である。これが、機能的なCD86分子によって部分的に媒介された共刺激特性を有するヒトTリンパ球が記載された最初である。

【0013】

この集団は、癌、感染疾患および免疫不全の治療において、ならびにワクチン学(vaccinology)の分野における細胞免疫治療で特に使用され得る。

【0014】

本発明はまた、免疫応答に関与する新規なリンパ球分子の供給源としての、CD86分子を発現するTリンパ球に関する。

【0015】

本発明はまた、血液または組織内で、特に抗CD86抗体を使用し、機能的なCD86分子を発現するTリンパ球を検出することによって免疫異常を診断するための方法に関する。この診断によって、例えば、先天的な原因の深刻な免疫不全(例えば、オーエン症候群(Owen's syndrome))、(関節炎型の)自己免疫疾患、ウイルス感染(CMVおよびHIV)または潜在的な細菌感染が明らかとなるであろう。

【0016】

本発明は、また、治療的組成物に関し、これらの組成物は、機能的なCD86分子を発現する、Tリンパ球、または実質的に均一なヒトTリンパ球の集団を少なくとも含むことを特徴とする。

【0017】

得られたリンパ球または細胞集団は、先天性、後天性、または病気に起因する免疫不全の治療を特に意図した医薬品を調製するために使用され得る。これは、例えば、腫瘍または病原体に対する免疫応答が存在しないか、あるいは欠失している患者の治療に特に関し得る。本発明において特許請求されるような産物は、特に、以下の治療を意図した医薬品を調製するために使用され得る：

- 微生物疾患（移植に関する特定の問題を含むウイルス、細菌、寄生生物、酵母）および、
- 癌、特に、HIV-陽性および/または、骨髄腫、リンパ腫、白血病、黒色腫あるいは例えば、腎臓、脳、前立腺、直腸、すい臓、卵巣、または肺の癌に罹患した個体。

【0018】

本発明において特許請求されるようなCD86+ Tリンパ球、およびCD86+ Tリンパ球の集団はまた、ワクチン学においてアジュバントまたは免疫賦活剤としても使用され得、これは治療ワクチンを製造するために、免疫抗原および/または、例えば、細菌型、ウイルス型またはDNA型の他の化合物と組み合わせられる。

【0019】

本発明において特許請求されるような、CD86+ リンパ球、およびCD86+ Tリンパ球を含む集団は、さらに、敗血症性ショックを治療する場合に使用され得る。

【0020】

本発明において特許請求されるような方法を使用し、CD86+ Tリンパ球のこれらの集団が自己注入において使用され得ることに注目することは重要である。すなわち、患者からの細胞、MNCまたはリンパ球単離物から出発し、本方法を実施し、次いで、それらを刺激後に再注入することが可能である。これは、

勿論、あり得る汚染および抗原性の任意の現象に関連したいかなる危険をも除外するという非常に大きな利点を示す。

【0021】

勿論、本発明で特許請求されるような治療的組成物は、特定の病状を治療する際に有用な他の要素を包含し得る：これらは、例えば、化学的分子、医薬品、あるいは生物学的分子、細菌またはウイルスの遺伝的に改変された生物であっても良く、その遺伝子または抗原の使用が所望され得る。

【0022】

本発明において特許請求されるようなTリンパ球またはTリンパ球の集団を使用することもまた可能であり、それらが生物学的抽出物または生物学的誘導体によってパルスされていることを特徴とする：この場合、これは、細胞または微生物、あるいは、例えば、ペプチド、タンパク質、糖脂質、グリコペプチドおよびリポペプチド型の誘導体、ならびに、特に、混合物、抗原の混合物もまた含み得；この場合、抗原提示プロセスの間に必要とされる共刺激特性を有する、本発明において特許請求されるようなリンパ球の特性が特に使用される。

【0023】

最後に、本発明において特許請求されるようなTリンパ球の集団は、例えば、幾つかのこれらの産物の発現および/またはスクリーニングを促進するために、DNAあるいは化学的または免疫学的な分子とともに、あるいはそれに結合させてトランスフェクトされ得る。

【0024】

本発明において特許請求されるような集団の特性は、本明細書中で以下、実施例の前に分析されるであろう。

【0025】

(1. 産生方法)

本発明は、また、機能的なCD86分子を発現するヒトTリンパ球の実質的に均一な集団を産生するための方法に関し、ヒトTリンパ球を含むサンプルを用いて、上記リンパ球の少なくとも2回の連続的な刺激が実施されることを特徴とする。「機能的なCD86分子を発現するヒトTリンパ球の実質的に均一な集団」

との表現は、70%より多く、好ましくは90%より多くのCD86+ T細胞を含む集団を意味することを意図する。

【0026】

確実にTリンパ球を増殖するアクチベーターおよび化合物を使用し、刺激を実施する。アクチベーターは、抗CD2、抗CD3および抗CD28活性化抗体およびマイトジェンまたはこれらの化合物の混合物から好ましくは選択され；また、Tリンパ球増殖を刺激する化合物、特に、例えば、インターロイキンIL-2 (Mier JWら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 6134-6138) ; Northoffら、J. Immunol. (1980) 125, 1823-1828 ; Mier JWら、J. Immunol. (1982) 128, 1122-7)、IL-4、IL-7が使用される。

【0027】

好ましい刺激混合物において以下のものが挙げられる：

- 抗CD3抗体およびIL-2の混合物、ならびに
- 抗CD28抗体、抗CD3抗体、およびIL-2の混合物。

【0028】

「連続的な刺激」という用語は、少なくとも4日間、そして好ましくは少なくとも7日間の間隔を空けて、新たな培地中で細胞培養物に与えられる2回の刺激を意味することを意図する；一般に、この間隔は約1~3週間であり、そしてこれは、特に、刺激の強度に依存する。

【0029】

本発明は、従って、2回の刺激の間隔が少なくとも4日間、好ましくは7日間であることを特徴とする方法に関する。

【0030】

各刺激の後、Tリンパ球増殖を刺激するサイトカインを、好ましくは、定期的に、例えば、2日毎に添加する。

【0031】

同様に、第二の刺激の後、好ましくは、数日間（例えば4日より長く、一般的

には7日より長く)を経て、CD86分子を発現するTリンパ球の実質的に均一な集団が産生されるであろう。

【0032】

Tリンパ球は、当業者に公知の任意の適切な培地を用いて培養され得る；このような培地の例であるRPMI1640タイプを、特に、実施例で用いる。仔ウシ血清を、自己ヒト血清、または動物もしくはヒト起源のタンパク質を含まない適切な培地と交換しても良い。

【0033】

使用される刺激剤の量は、使用される薬剤に依存して変化する；例えば、抗体は、10~1000ng/ml、好ましくは、10~500ng/mlの濃度で好ましく使用されるであろうし、；サイトカインに関しては、これらは10~1000U/ml、特に、100~500U/mlのオーダーの濃度で使用される。

【0034】

本発明において特許請求されるような方法では、Tリンパ球を含むサンプルは、好ましくは、血液単核細胞(MNC)サンプルまたはMNC由来のTリンパ球単離物のいずれかである。

【0035】

CD-86陽性Tリンパ球の実質的に均一な集団をすみやかに作り出すために、以下の2つのプロトコールのうち1つが使用されるであろう：

- 血球を白血球搬出法によって末梢血から移出し、そしてMNCをFicoll-Hypaque勾配上の遠心分離によって単離する(実施例1に詳述される通り)。MNC(10⁶細胞/ml)を実施例1に記載される培養培地(仔ウシ血清が自己ヒト血清あるいは動物またはヒト起源のタンパク質を含まない適切な培地と交換され得ることが知られている)中で、例えば、200ng/mlの抗ヒトCD3モノクローナル抗体OKT3(Kung Pら、Science(1979)206,347-349;Tax,WMJMら、Nature(1983)304,445-447)+200U/mlの組換えヒトIL-2の量で刺激する。2日毎に、組換えヒトIL2を例えば200U/ml添加する

。7日目から（実施例1に記載されるように、21日目においても）、例えば、 200 ng/ml 抗ヒトCD3モノクローナル抗体OKT3 + 200 U/ml IL-2の量で第二の刺激を実施する。2日毎に、組換えヒトIL-2を例えば 200 U/ml 添加する。

【0036】

- 血球を白血球搬出法によって末梢血から移出し、そしてMNCをFicoll-Hypaque勾配上の遠心分離によって単離する（実施例1に詳述される通り）。Tリンパ球をMNCから、ヒツジ赤血球とのロゼティング（rosetting）の技術を使用して単離する（実施例3に詳述される通り）。Tリンパ球（ 10^6 細胞/ml）を、例えば、 200 ng/ml の量のOKT3抗体 + 200 U/ml の量の組換えヒトIL-2の存在下で、抗ヒトCD28モノクローナル抗体（ $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度で培養表面上に予め吸着させておく）（Martin PJら、J. Immunol. (1986) 136, 3282-7; Nunes Jら、Int. Immunol. (1993) 5, 311-5）を含む、実施例1に記載される培養培地（仔ウシ血清は自己ヒト血清、あるいは動物またはヒト起源のタンパク質を含まない適切な培地で置換し得るとの知見により）中で刺激する。2日毎に、組換えヒトIL-2を、例えば 200 U/ml 添加する。7日目から、例えば、 200 ng/ml の量のOKT3抗体 + 200 U/ml の量のIL-2を用いて第二の刺激を実施する。2日毎に、組換えヒトIL-2を、例えば 200 U/ml 添加する。

【0037】

一般的に、第二の刺激がCD86+ Tリンパ球を本質的に含む均一な集団を得るために常に必要であることに留意すべきである。詳細には、CD86+ Tリンパ球の割合は、経時的に変化する：第一の刺激の後、これらの細胞が出現し、増殖し、次いで、再刺激の非存在下では消滅する。実施例1に示されるデータは、IL-2の存在下で活性化抗CD3抗体を用いてMNCを刺激した後、Tリンパ球上のCD86分子の発生、およびCD86分子の発現の動態（kinetics）を示す（図1）。

【0038】

プロトコール1または2のいずれを使用しても、本発明において特許請求されるような生物学的特性を有するCD86+ T細胞を単離するための2つのアプローチが、提案され得る。

【0039】

従って、上記のようなプロトコール1および2を実施することが可能である。大多数の個体で、全てのリンパ球が第二の刺激の1週間後にCD86分子を発現する。もしそうでなければ、細胞を、例えば、200U/mlのIL-2とともにさらに2~4日間培養してCD86分子を完全に発現するT細胞の集団を得る。

【0040】

本発明は、一般的に、CD86+ Tリンパ球に関し、このCD86+ Tリンパ球が、特に、不完全な方法でプロトコール1および2を実施することによって、すなわち、(抗CD28抗体の存在下または非存在下で)抗CD3抗体 + IL-2を用いた第一の刺激のみを実施することによって、得られ得ることを想起すべきである。この場合、少なくとも7日間培養した後に、全ての細胞がCD86分子を発現しているわけではないので、CD86+ 細胞は、細胞選別フローサイトメーター (cell-sorting flow cytometer) を使用して精製され得る。CD86陰性細胞およびCD86陽性細胞は、HLA-Dr分子の発現レベルに基づいて単離される。HLA-Dr分子の発現レベルは、CD86+細胞上よりも、CD86-細胞上の方が低い(実施例3、表Iおよび図3を参照のこと)。この過程の場合、CD86+ Tリンパ球の均一な集団の産生は、より労力を要するであろうが、達成され得る。

【0041】

使用されるプロトコールは、例えば、抗CD3抗体およびインターロイキン2(実施例1および図1)または抗CD28抗体、抗CD3抗体およびインターロイキン2などの性質の異なる少なくとも2つの刺激剤を共同して用いる少なくとも2回の一連の刺激の後にのみ、ヒトCD86+ Tリンパ球からなる実質的に均一な集団が作り出されることを示す。

【0042】

本発明はまた、ヒトCD86+ Tリンパ球の実質的に均一な集団に関し、例えば、これらは特に上記の方法を使用して得られ得るが、他の方法を使用しても、特に単回刺激および細胞選別後に得られ得る。

【0043】

(2. CD86+ Tリンパ球によって発現される表面分子)

本発明において特許請求されるようなリンパ球は、以下の分子のうち少なくとも一つ：CD25、CD54およびCD80を安定な様式で発現し、以下の分子のうち少なくとも一つ：CD30、CD40-LおよびCD70を一時的な様式で発現する。CD86分子は、記憶ヒトTリンパ球およびエフェクターヒトTリンパ球のこの新規な集団を特徴付けるための参照マーカーを構成する。

【0044】

発生したTリンパ球の集団のフローサイトメトリーによる表現型の分析は、これらの細胞が記憶エフェクター細胞の表現型を有することを示す(Swain SLら、Immunol Rev(1996)150, 143-67)(実施例2および図2)。本発明において特許請求されるようなTリンパ球は、CD2、CD3、CD4またはCD8分子、ならびに、特筆すべきは、CD86分子を発現する。これらは、特に、以下の膜結合分子を発現する：CD25(インターロイキン2レセプターの鎖)、CD45RO(記憶Tリンパ球によって選択的に発現される分子)(実施例2および図2)、クラスIの主要な組織適合性複合体(MHC I)、MHC II、CD54およびCD80(実施例3および表I)。これらは、一時的にはあるが、選択的に、CD30分子、CD40分子に対するリガンド(CD40-L)およびCD70分子を発現する(実施例3および図3)。

【0045】

多くの膜結合分子の発現は、(一回のみの刺激後に生ずる(実施例1を参照のこと))同じ不均一な集団に含まれるCD86+ Tリンパ球上とCD86-Tリンパ球上とで異なる。

【0046】

- CD86分子は、CD45RO分子を発現するTリンパ球上にもみ出現

し(実施例2、図2を参照のこと); CD45RO分子は、記憶細胞を特徴付ける(Swain SLら、Immunol.Rev.(1996)150,143-67)。

【0047】

- CD25、CD54、CD80およびHLA-Dr分子は、CD86-Tリンパ球上よりも、CD86+ Tリンパ球上で常により多く発現され(実施例3、図3および表Iを参照のこと); CD86+ 細胞上のCD25、CD54およびHLA-Dr分子の増大した発現は、それらがかなりの活性化状態にあることを示す(Swain SLら、Immunol.Rev.(1996)150,143-67)。

【0048】

- CD30、CD40-LおよびCD70分子の膜結合した発現は、実質的に、CD86+ Tリンパ球に制限される(実施例3、図3および表I)。

【0049】

(2.1. CD86+ Tリンパ球に共刺激特性を与える表面分子。)

CD54、CD70、CD80およびCD86共刺激分子は、CD86+ Tリンパ球上で増加した量で発現される。

【0050】

共刺激分子の使用は、現在、一般に好まれる新規な治療アプローチであるらしく、そして特に、(i) 抗癌免疫治療における使用(Liebowitz DNら、Curr Opin Oncol(1998)10,533-41); (ii) 外因性微生物病原体に対する有効なTリンパ球応答の確立を促進するための使用(Kaye PM, Immunol Today(1995)16,423-7); そして(iii) ワクチン学におけるアジュバントとしての使用(Chamberlain RSら、Cancer Res.(1996)56,2832-6)が提案されている。

【0051】

これらの分子は、一般的に、AgPCによって構成的に且つ高いレベルで発現される。これらの主な役割は、AgPC-Tリンパ球の相互作用中に活性化共シ

グナル (c o s i g n a l) を T リンパ球に提供することである。これらの相互作用は、抗原提示中の T リンパ球の教育および活性化に必要である。

【 0 0 5 2 】

- C D 5 4 分子は、強力な共刺激シグナルを T リンパ球に形質導入する L F A - 1 分子と結合する (V a n S e v e n t e r G A ら、 J . I m m u n o l (1 9 9 0) 1 4 4 , 4 5 7 9 - 8 6) 。

【 0 0 5 3 】

- 同様に、 C D 8 0 および C D 8 6 分子が、 T リンパ球によって発現されたそれらのリガンド C D 2 8 に結合すると、 C D 2 8 - 媒介共刺激シグナルによって、 T リンパ球の効果的な活性化 (増殖における増加によって具現化される) および I L - 2 産生が可能となる。

【 0 0 5 4 】

- C D 2 7 分子 (これは不活性 T リンパ球によって発現される) のそのリガンド (これは C D 7 0 分子である) による結合は、リンフォカイン産生および細胞増殖を促進する共刺激シグナルの発生を誘発する (K o b a t a T、ら、 J . I m m u n o l . (1 9 9 4) 1 5 3 , 5 4 2 2 - 3 2) 。

【 0 0 5 5 】

(2 . 2 . C D 8 6 + T リンパ球に細胞傷害特性を与える表面分子)

C D 4 0 - L、 C D 7 0、 C D 8 0 および C D 8 6 分子は、 C D 8 6 + 細胞によって発現される。これらによって、 C D 8 6 + T リンパ球が細胞傷害特性を獲得することが可能となる。詳細には、

- C D 2 7 (そのリガンドは、 C D 7 0 分子である) を介したナチュラルキラー (N K) 細胞の活性化は、それらの細胞傷害活性を増加させる (Y a n g F C ら、 I m m u n o l o g y (1 9 9 6) 8 8 , 2 8 9 - 9 3) 。

- C D 4 0 - L 分子もまた、細胞傷害応答の発達を促進し、これは、以下の2つの機構を経由する：

a . A g P C によって発現される C D 4 0 分子に結合すると、 C D 4 0 - L 分子は、 A g P C (特に、樹状細胞に対して) を非常に強力に活性化するので、これらの細胞は、ヘルパー T リンパ球の非存在下で、ナイーブ T リンパ球に細胞傷

害活性を与え得る (Bennet SRら、Nature (1988) 393, 478-83)、

b. ある特定の腫瘍細胞の表面に存在するCD40分子に結合すると、CD40-L分子は、アポトーシス死に対する腫瘍細胞の感受性を増大させることによって、および/または腫瘍細胞が特異的な細胞傷害性応答の発生を促進する共刺激分子を発現するのを促進することによって、細胞傷害性リンパ球によるこれらの細胞の拒絶を促進する (Dillioo Dら、Blood (1997) 80, 1927-33)。

【0056】

CD80およびCD86分子は、細胞傷害性の抗ウイルス応答および抗腫瘍応答を生じさせるのに不可欠である。この特定の活性は文献に何回も報告されており、特に、免疫感作モデル - これらは特定の細胞傷害性Tリンパ球応答の誘発を促進するので - において報告されている。CD80分子は、NK細胞の細胞傷害特性を増加させ (Yeh KYら、Cell Immunol (1995) 165, 217-24)、さらに、記憶細胞傷害性Tリンパ球の発生を増加させる (Flynn KおよびMullbacher A, Eur J Immunol (1997) 27, 456-62)。CD80分子をコードする遺伝子で細胞をトランスフェクトすると、細胞傷害性Tリンパ球を生じる頻度が増加し、そしてまた、ウイルスに感染した細胞に対する (He XSら、Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93, 7274-8; Rao JBら、J Immunol (1996) 156, 3357-65; Tsuji Tら、Eur J Immunol (1997) 27, 782-7)、あるいは腫瘍細胞に対する (Puetzer BMら、Proc Natl Acad Sci USA (1997) 94, 10889-94; Imuro MAら、Hum Gene Ther (1998) 9, 1335-44; Leong CCら、Eur J Immunol (1997) 71, 476-82) それらの機能活性も増加する。同様にして、CD80および/またはCD86分子との間の相互作用の後、CD28分子を介するシグナルが、細胞傷害性Tリンパ球を生じさせるために必要である (Azuma Mら、J Immunol (1993) 150

, 2091-101); Lanier LLら、J Immunol (1995) 154, 97-105。CD80および/またはCD86分子と、そのリガンドCD28との相互作用はまた、トキソプラズマ ゴンディ (Toxoplasma gondii) 寄生生物に対する有効な応答を生じるのにも関与している (Hunter CAら、J Immunol (1997) 158, 2285-93)。

【0057】

(2.3. CD86+ Tリンパ球に免疫刺激特性を与える表面分子。)

CD40-L分子は、それを発現する細胞に免疫刺激特性を与える。CD40分子に結合した後、CD40-L分子は、単球の活性化を誘発し (Laman JDら、Crit Rev Immunol. (1996) 16, 59-108)、また、樹状細胞の成熟 (CD83分子の発現の誘発) および樹状細胞の活性化 (IL-12産生) をも誘発する。CD40-L分子をコードするDNAを注入すると、免疫 (体液性および細胞性) 応答の有効性が増加し、そして感染性の病原体に対して、または腫瘍チャレンジに対して防御免疫を誘導する (Gurunathanら、J Immunol. (1998) 161, 4563-71)。CD40-LおよびCD70分子は、それらを発現する細胞にBリンパ球を刺激する能力 (Bリンパ球についての「ヘルパー」特性) を与える。CD40-Lは、そのリガンド、CD40分子に結合すると、アイソタイプ交換 (isotypic commutation) のプロセス、免疫グロブリン産生のプロセス、ならびにBリンパ球の生存および増殖のプロセスに寄与する (Laman JDら、Crit Rev Immunol. (1996) 16, 59-108)。同様のやり方で、CD70分子は、B細胞の増殖、IgGおよびIgM産生ならびに形質細胞への分化の調節に関与する (Agematsu Kら、Eur J Immunol. (1995) 25, 2825-29)。

【0058】

(3. CD86+ Tリンパ球によって産生される分子)

本発明は、サイトカイン、ならびに、特に、上記のCD86+ Tリンパ球の集団によって産生されるリンフォカインに関し、ならびに本発明において特許請

求されるようなリンフォカインから得られた精製リンフォカインにも関する。

【0059】

CD86+ T細胞によって産生されるサイトカインのプロファイルは、CD86- T細胞のプロファイルとは異なる（実施例4、図4aおよび4b）：
- インターフェロン（IFN）などの幾つかのサイトカインは、CD86- Tリンパ球によってよりも、CD86+ Tリンパ球によって、かなり多くの量で産生される（図4a）。IFNを産生する細胞の頻度は、CD86- Tリンパ球においてよりも、CD86+ Tリンパ球において高い（図4b）；
- TNFなどの他のサイトカインは、（10～100ng/mlのオーダーの）CD86+ Tリンパ球だけでなく、CD86- 細胞によっても非常に多量に産生される（図4b）。

【0060】

これら2つのサイトカインは、CD86+ Tリンパ球の細胞傷害、免疫刺激、および共刺激の活性に寄与する。

【0061】

IFNは、病原体に対する抵抗性において、および抗腫瘍応答においてきわめて重要な役割を果たす。さらに、これは、強力な抗ウイルス特性を有し、マクロファージの殺菌活性を増大させ、そしてMHC IおよびMHC II分子の発現、従って、抗菌および抗腫瘍免疫応答の発達を促進する（Boehm U, Ann Rev Immunol (1997) 15, 749-95）。IFNは、癌（例えば、腎臓癌）の治療において臨床的に使用されている。

【0062】

TNFは、そのレセプターの一つを発現する腫瘍細胞の死を誘発する（Hieber UおよびHeim ME, Oncology (1994) 51, 142-53）。これはまた、多くの細胞パートナー、例えば、内皮細胞、上皮細胞および炎症反応のエフェクター細胞（例えば、単球、好中球および好酸球）などを活性化することで、炎症フェーズを開始する際に重要な役割を果たす。これらの細胞を活性化すると、TNFは、また、抗菌応答のエフェクターフェーズにも寄与する（Camussi Gら、Eur J Biochem (1991

) 202, 3 - 14)。

【0063】

顕著に、CD86+ Tリンパ球が、エフェクター細胞（例えば、細胞傷害性細胞）だけでなく、AgPCによっても発現される一連の表面分子またはサイトカインを付随的に提示することに注目することは重要である。このことがCD86+ Tリンパ球に、免疫応答を開始し、実施し（エフェクターフェーズ）、そして制御する能力を与える。これらの特性を以下に例示する。

【0064】

(4. CD86分子を発現するTリンパ球の機能特性)

本発明は、CD86分子を発現し、そして同時に以下の効果または機能を有するヒトTリンパ球の実質的に均一な集団の創製を特許請求する：共刺激（すなわち、このTリンパ球は、ナイーブリンパ球応答の発生を促進する）、細胞傷害性（すなわち、このTリンパ球は、腫瘍細胞および/または病原性微生物の破壊を確実にする）ならびに免疫刺激。CD86+ Tリンパ球のエフェクター特性を、CD86- T細胞の特性と比較した。

【0065】

(4.1. CD86+ Tリンパ球は強力な共刺激特性を有する。)

(CD45RA分子を発現する)ナイーブTリンパ球の活性化（増殖およびサイトカイン産生）には、少なくとも2つのシグナル：抗CD3抗体で擬態され得る、Tレセプターを介する第一のシグナル、ならびに、CD28分子などの共刺激分子を介した第二のシグナルが必要である。2種類の実験を用いて、CD86+ Tリンパ球の共刺激特性を具現化した。これらの2種類の実験において、ナイーブTリンパ球を応答細胞として使用した。なぜなら、Tリンパ球が活性化されるために最も多くの共刺激シグナルを受容する必要があるのは、活性化のこの状態においてだからである。使用されるアッセイは以下の通りである：

- 準最適用量の抗CD3活性化抗体（OKT3）で刺激したナイーブTリンパ球の活性化。ナイーブTリンパ球の活性化は、増殖の誘発（実施例5、図5a）およびIFNの産生の誘発（実施例5、図5b）によって具現化される。
- 異種CD86+ Tリンパ球の存在下でのナイーブTリンパ球の活性化。こ

のアッセイ（混合リンパ球反応）においては、ナイーブTリンパ球の増殖を測定する（実施例5、図5c）。

【0066】

これらの結果は、CD86+ Tリンパ球がナイーブTリンパ球を活性化し得ることを示す。抗CD86中和抗体を使用することにより、ヒトTリンパ球によって発現されるCD86分子が生物学的に活性であり、そして、少なくとも部分的に、共刺激活性に寄与することが明らかとなる。一方、CD86- Tリンパ球、あるいはまた、新たに単離したTリンパ球は、共刺激活性を殆ど示さないか、または全く示さない（実施例5、図5a、5bおよび5c）。

【0067】

ヒトTリンパ球によって発現されたCD86分子の機能活性についてのこの実証は、Tリンパ球によって発現されたCD86分子が、(i)文献に報告されたヌクレオチド配列と等しいヌクレオチド配列（GenBankデータベースにおける登録番号U04343）を有し、さらに(ii)AgPCによって発現されるCD86分子のグリコシル化と同程度のグリコシル化をも有すること（Azuma Mら、Nature（1993）366、76-9）を示す、相補的な実験によって支持される（実施例6、図6）。

【0068】

（4.2. CD86+ Tリンパ球は細胞傷害特性を有する。）

IL-2でT-リンパ球を刺激すると、強力な細胞傷害特性を自発的に有するキラーTリンパ球（「リンフォカイン活性化キラー細胞」またはLAKとも呼ばれる）が生じる。細胞傷害性細胞をつくり出すための技術の大半は、インビトロでTリンパ球を刺激し、その後それらを患者に再注入することにその本位がある。～これらのプロトコールは、刺激がTリンパ球の増殖を誘発するだけでなく、それらに細胞傷害特性を与えるという事実を利用する。実際、活性化しなければ、ナイーブTリンパ球、あるいはまた記憶リンパ球は、殆どまたは全く細胞傷害特性を有さない。

【0069】

我々は、CD86+ Tリンパ球が、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を自発的

に有することを報告する(実施例7、図7)。この細胞傷害活性は、CD86+リンパ球およびCD86-リンパ球を含む混合集団によっても、また、CD86-Tリンパ球によっても生じる。一方、新たに単離された、活性化されていないTリンパ球は、腫瘍細胞を死滅させない。

【0070】

K562腫瘍株を標的細胞として使用した例を実施例7に示す(図7)。

【0071】

(図の説明)

図1：IL-2の存在下に抗CD3抗体で末梢血由来のMNCを刺激することによる、CD86分子を発現するTリンパ球の集団のインビトロでの発生。末梢血由来のヒトMNCを、(実施例1に記載される通り)抗CD3抗体OKT3およびIL-2で刺激し(D0)、(実施例1に記載される通り)D21に抗CD3抗体OKT3およびインターロイキン2で二回目の刺激を行った()か、または行わなかった()。インターロイキン2を、2日毎に培養液に添加する。CD3+Tリンパ球上におけるCD86分子の発現を、キネティックフローサイトメトリーを用い、二重標識によって、6週間かけて評価する。その結果を、CD86分子を発現するT細胞の割合として表す。これらは、10回の実験のうちの1つを表す。

【0072】

図2：ヒトCD86+Tリンパ球はCD45RO分子を発現する。ヒトMNCを、実施例1に記載したように抗CD3抗体OKT3およびインターロイキン2で刺激した。15日間培養後、CD86+およびCD86-Tリンパ球によるCD45RO分子の発現を、フローサイトメトリーを使用して二重標識によって評価した。結果は、10回の実験うちの1つを示す。

【0073】

図3：CD86+Tリンパ球上におけるCD30、CD40リガンドおよびCD70分子の優先的発現。実施例1に記載したように、ヒトMNCをOKT3抗体およびインターロイキン2で刺激した。15日間の培養後、CD86+およびCD86-Tリンパ球上におけるHLA-Dr、CD30、CD40-Lお

よびCD70分子の発現を、フローサイトメトリーを用いて、二重標識によって評価した。結果は、10回の実験のうちの一つを示す。

【0074】

図4aおよび4b：CD86+およびCD86- Tリンパ球による、IFN産生の比較。

図4a：実施例1に記載したようにMNCを刺激した。2週間培養した後、CD86+およびCD86- Tリンパ球を細胞選別フローサイトメーター使用して選別し、そしてPMA + イオノマイシンで6時間刺激した。また、抗CD86中和抗体(IT2.2)と共にインキュベートした後またはインキュベートせずに、全集団を「同様の方法で処理した」。上清中のIFNをELISAによってアッセイした。結果は、pg/ml(平均±SD)で表し、3回の実験のうちの一つを示している。

【0075】

図4b：MNCを実施例1に記載されるとおりに刺激した。3週間の培養の後、細胞をプレフェルジンAの存在下PMA + イオノマイシンで6時間刺激した。次いで、細胞を抗CD86抗体で標識し、固定し、膜透過し、次いで、抗IFN抗体で標識した。結果は、3回の実験のうち、1回の実験を示す。

【0076】

図5a、5bおよび5c：CD86+ Tリンパ球は、ナイーブTリンパ球を活性化するために必要な共刺激シグナルを提供する。

【0077】

図5aおよび5b：抗CD3抗体の存在下でのナイーブT細胞の共刺激に関するアッセイ。実施例1に記載したようにして作出し、精製したCD86+ T細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、次いで、抗CD86中和抗体(IT2.2またはFUN-1クローン)もしくはコントロールアイソトープモノクローナル抗体の存在下または非存在下に、抗CD3抗体で刺激したナイーブTリンパ球と共に培養した。Tリンパ球の活性化を増殖の誘発(n=5)(図5a)およびIFNの産生(n=3)(図5b)によって具現化した。結果を平均±SD、n=3として示す。

【0078】

図5c：混合リンパ球反応アッセイ。CD86⁺およびCD86⁻ Tリンパ球を実施例1に記載したようにして作出し、精製した。細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、次いで、抗CD86中和抗体（IT2.2またはFUN-1クローン）、あるいはコントロールアソタイプモノクローナル抗体の存在下に、同種ナイーブTリンパ球と共に培養した。5日間インキュベーションした後、ナイーブTリンパ球の増殖を³H-Thyの取り込みによって測定した。実験を5回1組で実施し、そして結果を平均±SD、n=3として示す。

【0079】

図6：ヒトのBリンパ球およびTリンパ球によって発現されたCD86分子は、70kDaの類似の分子量を有する。還元条件下でのSDS-PAGEにより、DauidiヒトB株由来、CD86⁺ T細胞（実施例1に記載したように得られる）由来およびJurkat T株由来の膜結合タンパク質および可溶性タンパク質の抽出物をその分子量に従って分離した。抗ヒトCD86ポリクローナル抗体を使用したウエスタンブロット法によってCD86分子の発現を評価した。

【0080】

図7：CD86⁺ Tリンパ球は、K562腫瘍株に対する自発的な細胞傷害活性を有する。CD86⁺ Tリンパ球の実質的に均一な集団を産生させた。実施例1に記載される通り、MNCによる第一刺激の15日後にCD86⁺ T細胞およびCD86⁻ T細胞を含む細胞の集団を得た。CD86⁻ T細胞およびCD86⁺細胞を、実施例4に記載したように、セルソーターを使用して精製した。活性化されていないT細胞を実施例3に記載されるようなロゼティング技術を使用して得た。⁵¹Crで標識したK562標的細胞を以下のエフェクター細胞と共にインキュベートした（50：1のエフェクター細胞：標的細胞の比により）：新たに単離された刺激されていないTリンパ球、CD86⁺細胞およびCD86⁻ T細胞を含む細胞の集団、精製したCD86⁺ Tリンパ球および精製したCD86⁻ Tリンパ球。細胞毒性活性を⁵¹Cr放出によって3回1組で測定し、実施例7に規定されるような細胞傷害率として表す（平均±SD、

n = 3)。

【0081】

(実施例1：IL-2の存在下に抗CD3抗体で末梢血から単離したヒト単核細胞を刺激した後の、CD86分子を発現するヒトTリンパ球の均一な集団の発生。)

本実施例では、我々は、CD86陽性Tリンパ球の作出方法、さらにTリンパ球上でのCD86分子出現の動態研究(kinetic study)を例示する(図1を参照のこと)。

【0082】

a. 方法論：CD86分子を発現するヒトTリンパ球の作出。

CD86陽性(CD86+)Tリンパ球をヒト末梢血から作出する。この血液を(例えば、リチウムヘパリネートなどの抗凝固剤の存在下)白血球搬出によって除去する。単核細胞(MNC)(Tリンパ球、Bリンパ球および単球を含む)をFicoll-Hypaque勾配(密度=1.077)(Pharmacia、Uppsala、Sweden)上の遠心分離によって単離する。手短に言えば、血球を室温、1500rpmで30分間遠心分離する。Ficoll-血漿界面に位置するMNCを回収し、RPMI 1640培地(Life technologies)の存在下で2回洗浄する。次いで、MNCを以下の培地(本明細書では以下、完全培養培地という)中、 1×10^6 細胞/mlの濃度で培養する：10% 非働化(56で30分間加熱)胎仔ウシ血清および2mM L-グルタミンを補充したRPMI 1640。200U/mlの濃度の組換えヒトインターロイキン2(IL-2)の存在下、最小濃度である200ng/mlの抗ヒトCD3モノクローナル抗体クローンOKT3を用いてMNCを活性化する。ヒトIL-2を2日毎に培養液に添加する。21日目に細胞に第二の刺激を与えることによって、全てがCD86分子を発現するヒトTリンパ球の均一な集団を生じさせることが可能となる。手短に言うと、リンパ球をD21に回収し、RPMI 1640培地中で2回洗浄し、次いで、 1×10^6 細胞/mlの濃度で完全培養培地の培養液に詰め戻す。細胞を200ng/mlの抗CD3抗体および200U/mlの組換えIL-2を用いて活性化する。IL-2(200

U/ml)を2日毎に添加する。

【0083】

抗ヒトCD3抗体(クローン OKT3)はAmerican Type Culture Collection(ATCC、Manassas、VA)から入手したCRL-8001 骨髄腫によって産生される。この骨髄腫を、20% 非働化胎仔ウシ血清、2mM L-グルタミン、100U/ml ペニシリンおよび100µg/ml ストレプトマイシンを補充した、イスコフの改変ダルベッコ培地(Life technologies)中で培養する。抗体をセファロース結合プロテインAカラム(Pierce)に結合させて精製する。次いで、これを、10mM Tris-HCl溶液、pH4の存在下で樹脂から分離する。次いで、溶出したフラクションのpHをpH7.0に戻す。溶出したフラクションを濃縮し、次いで、定量する(BCAタンパク質比色定量試薬、Pierce)。抗CD3抗体の純度を、還元条件下および非還元条件下でポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、硝酸銀で染色することによって確認する。純度は、>95%である。抗CD3抗体溶液を0.22µmのフィルターを通して無菌化する。

【0084】

(原核生物の系で産生された)組換えヒトインターロイキン2をR&D Systems(Abingdon、United Kingdom)から入手する。

【0085】

b. 方法論: Tリンパ球上のCD86分子の発現の二重標識によるフローサイトメトリー分析。

【0086】

フローサイトメトリー(FACS Vantage型のフローサイトメトリー; Becton Dickinson、Erembodegem、Belgium)を用い、二重標識によってTリンパ球上でのCD86分子の発現を分析するために、様々な時間に細胞培養液からサンプルを移す。FACS緩衝液(1%のウシ血清アルブミンおよび0.01%アジ化ナトリウムを含む、10mMリン酸

緩衝液、pH 7.4) 中で細胞を洗浄した後、50 µl 容量のFACS緩衝液中に 2×10^5 個の細胞の割合で、コーン底型の96-ウェル培養プレート(Nunc、Roskilde、Denmark)のウェルに分配する。フィコエリトリンで標識した抗ヒトCD3抗体(抗CD3 PE)(Becton Dickinson)またはフィコエリトリンで標識したコントロールアイソタイプ抗体(Becton Dickinson)のいずれかを各ウェルに添加する。これらの各条件に、ビオチンで標識した抗ヒトCD86抗体(IT2.2 クローン; Pharmingen)またはコントロール抗体のいずれかを添加する。4 で20分間インキュベーションした後、細胞を200 µlのFACS緩衝液で2回洗浄し、その後、抗CD86抗体を検出するために、CyChromeで標識したストレプトアビジン(streptavidin)(Pharmingen)の存在下、10 µgの濃度でインキュベートする。4 で20分間インキュベーションした後、200 µlのFACS緩衝液で細胞を3回洗浄し、次いで、これと同一の緩衝液200 µl中に再懸濁する。Tリンパ球(CD3+)の表面でのCD86の発現を、FACSによって分析する。

【0087】

c. 結果：図1に示される結果から以下のことが分かる：

- CD86分子は、末梢血から新たに単離したヒトTリンパ球によっては発現されない。
- CD86+ T細胞は、第一の刺激の3日後すぐに検出される。
- CD86+ Tリンパ球の割合は経時的に変化する。
- 刺激から2~3週間後、培養液は、通常、 $50 \pm 10\%$ のCD86+ Tリンパ球を含む(20回に渡る実験によって得られた結果)。
- CD86+細胞の割合は、再び刺激しない場合、4~5週間後に減少する。
- D21での第二の刺激に応答して、CD86+ Tリンパ球の割合は、その全てがCD86分子を発現するリンパ球の均一な集団が産生されるまで、増加し続ける。

【0088】

(実施例2：CD86分子の発現は、CD45RO分子を発現するTリンパ球(記憶リンパ球)に制限される。)

CD86分子の発現が記憶Tリンパ球(CD45RO分子を発現する)に制限されることが示される(図2を参照のこと)。

【0089】

a. 方法論：実施例1に記載したように、抗CD3抗体OKT3およびIL-2でヒトMNCを刺激した。15日間の培養後、CD86+およびCD86-Tリンパ球上でのCD45RO分子の発現を、フローサイトメトリーを使用し、二重標識によって評価した。詳細には、我々は、7日間の培養後に集団の細胞の全てがCD3+ Tリンパ球からなることを観測した。2×10⁵個の細胞をFACS緩衝液中で洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁し、そして50μl/ウェルの割合で、コーン底型の96-ウェル培養プレート中に分配する。各ウェルに、FITC抗ヒトCD45RO抗体(Becton Dickinson)またはコントロールアイソタイプ抗体(Becton Dickinson)のいずれかを添加する。CD86の発現を、ビオチンで標識した抗ヒトCD86抗体を使用して評価する。4でインキュベーションした後、細胞を200μlのFACS緩衝液で2回洗浄し、その後、抗CD86抗体を検出するために、10μg/mlの濃度のCychrome標識ストレプトアビジンの存在下でインキュベートする。4で20分間インキュベーションした後、細胞を200μlのFACS緩衝液で3回洗浄し、次いで、これと同一の緩衝液200μl中に再懸濁する。

【0090】

b. 結果：図2に示された結果から、CD86+ Tリンパ球の全てがCD45RO分子を発現するので、それらの全てが記憶細胞表現型を有することが分かる。

【0091】

(実施例3：CD86-Tリンパ球と比較して、CD86+ Tリンパ球は、より高いレベルの共刺激分子および活性化分子を発現し、そして免疫応答において極めて重要な役割を果たすある特定の分子を選択的に発現する。)

第一の刺激の2週間後に得た同一の不均一の集団から誘導されたCD86+およびCD86- Tリンパ球上に存在する表面分子の発現を比較する。結果を表Iに示し、若干の例を図3に詳述する。

【0092】

a. 方法論：実施例1に記載したように、抗CD3抗体OKT3およびIL-2で15日間MNCを刺激した。CD86+およびCD86- Tリンパ球の表現型を、FACSを用いて、二重標識によって分析した。その表現型を、ヒツジ赤血球とのロゼティングの技術を使用して、精製された血液から新たに単離したTリンパ球の表現型と比較する。手短に言うと、MNCを 200×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁し、そして50%ヒツジ赤血球溶液(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)1mlと混合する。細胞の懸濁液を4で一晩インキュベートする。緩やかに再懸濁した後、T細胞をFicoll-Hypaque勾配上での遠心分離(1500rpm、室温で30分間)によって単離する。ヒツジ赤血球-Tリンパ球複合体をチューブの底に集める。赤血球を連続した2回の浸透圧ショックで溶解する。このように単離されたT細胞の純度は、FITC抗CD3抗体で標識することによって評価され、>95%である。

【0093】

抗体による細胞標識を、実施例1に記載したように実施する：細胞をFACS緩衝液中で洗浄した後、 2×10^6 細胞/mlの割合でFACS緩衝液中に再懸濁する。次いで、細胞をコーン底型の96-ウェル培養プレートのウェルに50 μ l/ウェルの割合で分配する。各条件に、FITC抗CD54抗体、FITC抗CD80抗体、FITC抗HLA-Dr抗体(全てBecton Dickinsonから)、FITC抗CD70抗体(Pharmingen, San Diego, CA)、FITC抗CD30抗体(Dako, Glostrup, Denmark)、FITC抗CD40-L抗体(Ancell, Bayport, MN)、または各アイソタイプに対応するコントロール抗体(Becton Dickinson)のいずれかを添加する。CD86分子の発現をビオチン標識抗ヒトCD86抗体(IT2.2クローン)(Pharmingen)を使用

して評価する。4 で20分間インキュベーションした後、細胞を200 μ lのFACS緩衝液で3回洗浄し、その後、抗CD86抗体を検出するために、10 μ g/mlの濃度のCychrome標識ストレプトアビジン(Pharmin gen)の存在下、インキュベートする。4 で20分間インキュベーションした後、細胞を200 μ lのFACS緩衝液で3回洗浄し、その後、フローサイトメトリー分析のためにこれと同一の緩衝液200 μ l中に再懸濁する。CD54、CD80、HLA-Dr、CD70、CD30およびCD40-L分子の発現を、新たに単離したTリンパ球、CD86-Tリンパ球およびCD86+ Tリンパ球において比較する。

【0094】

b. 結果：表Iおよび図3に示されるように、結果から以下のことが分かる：

- 新たに単離したTリンパ球は、弱く検出可能なレベルで活性化分子を発現するが、CD80およびCD86共刺激分子を発現しない。

- CD86+ Tリンパ球は、CD86-Tリンパ球よりも高レベルのCD25およびHLA-Dr活性化マーカーを発現する。

- CD86+ Tリンパ球は、CD86-Tリンパ球よりも高レベルのCD54およびCD80共刺激分子を発現する。

- CD30分子は、新たに精製したTリンパ球によって発現されない。

- CD30分子はCD86+ リンパ球によってのみ発現される。

- CD40-LおよびCD70分子などのTNFファミリーの分子は、新たに精製したTリンパ球によって発現されず、CD86-細胞上でわずかに発現されるが、CD80+ リンパ球によって本質的に発現される。

【0095】

本明細書の下記の表Iは、ヒトCD86+ Tリンパ球およびCD86-Tリンパ球によって発現された表面分子を比較して得られた結果を示す。実施例1に記載したように、抗CD3抗体OKT3およびIL-2を用いてヒトMNCを刺激した。2週間の培養の後、CD86+およびCD86-Tリンパ球上における様々な表面分子の発現の分析を、フローサイトメトリー(FACScan、Becton Dickinson)を使用し、二重標識によって実施する。示

された結果は、5つの異なる個体由来の細胞を用いて得たデータをまとめている。符号*は、陽性細胞の割合（平均 \pm SD、 $n=5$ ）を示す。

【0096】

【表1】

表I. CD86分子を発現するTリンパ球、およびCD86分子を発現しないTリンパ球の表現型の特徴付け（括弧内の値は、分子を発現する細胞の割合に対応する）。

	新たに単離した T細胞	CD86-	CD86+
HLA-Dr	+/- (5% \pm 1)	+	+++
CD25	-	++	+++
CD30	-	-	++ (40% \pm 12)
CD40-L	-	-	+ (10% \pm 3)
CD54	+/-	+	++
CD70	-	-	++ (39% \pm 8)
CD80	-	+	++

【0097】

実施例4：CD86陽性Tリンパ球は、CD86陰性Tリンパ球よりも多量のIFNを産生する。

ヒトCD86+ Tリンパ球が、ヒトCD86- Tリンパ球よりも多くのIFNを産生したという事実をここに例証する。これは、2つの異なるアプローチを使用して具体化された。

【0098】

a. 方法論：ELISAによるIFNの産生の測定。

MNCを実施例1に記載したように刺激した。2週間の培養後、細胞選別フローサイトメーター（FACSVantage、Becton Dickinson）を使用して、CD86+ 細胞をCD86- 細胞から分離した。手短に言うと、FITC抗CD86抗体（IT2.2クローン、Pharmingen）（ 5×10^6 細胞/500 μ lに対して5 μ gの抗体）と共に、細胞を4で20分間インキュベートした。完全培養培地で3回洗浄した後、CD86+ 細胞

を、CD86分子の発現に基づいてCD86⁺細胞から分離する。フローサイトメトリーで分析された2つのTリンパ球集団の純度は、>98%である。コントロールとして、抗CD86中和抗体(IT2.2、10 μ g/mlとして使用される)と共にインキュベートされた、またはインキュベートされていない、非分離集団もまた、使用した。

【0099】

細胞を、 2×10^6 細胞/mlの濃度で、完全培養培地中に再懸濁し、10ng/mlホルボールミリステートアセテート(Sigma, Saint Louis, MO) + 1 μ Mイオノマイシン(Calbiochem, San Diego, CA)で6時間活性化するか、または活性化しない。培養上清を回収し、4℃で15分間2500rpmで遠心分離する。上清中のIFN γ レベルを市販のELISAキット(R&D Systems, Abingdon, United Kingdom)を使用して定量する。結果を、ng/ml(平均 \pm SD、n=3)で表し、図4aに示す。

【0100】

b. 方法論: CD86⁺およびCD86⁻Tリンパ球の中のIFN γ -産生Tリンパ球の頻度の測定。

この場合、2.5 μ g/mlのブレフェルジンA(Molecular Probes, Eugene, OR)の存在下でTリンパ球を刺激する。洗浄後、細胞を、ビオチンで標識した抗CD86抗体と共に、コーン底型の96-ウェル培養プレート中でインキュベートする。4℃で20分間インキュベートした後、細胞を200 μ lのFACS緩衝液で3回洗浄し、その後、実施例1に記載したようにCychromeで標識したストレプトアビジンの存在下でインキュベートする。4℃で20分間インキュベートした後、細胞を200 μ lのFACS緩衝液で3回洗浄し、その後、市販のキット(Cytowash/cytopermキット、Pharmingen)を使用し、記載の手順に従って固定し、そして膜透過する。細胞(2×10^5)を、50 μ lの容量で、4℃、20分間、FITC抗IFN γ 抗体と共に、コーン底型の96-ウェル培養プレート中でインキュベートする。FACS緩衝液中で2回洗浄した後、細胞をフローサイトメトリ

一で分析する。結果を図4bに示す。

【0101】

c. 結果：図4aおよび図4bに記載した結果から、以下のことが分かる：

- 刺激後、IFN-産生細胞の頻度は、CD86⁻ Tリンパ球の集団においてよりも、CD86⁺ Tリンパ球の集団において高い(図4a)。

- CD86⁺ Tリンパ球は、活性化後、CD86⁻ Tリンパ球よりも多くのIFNを産生する(図4b)。

【0102】

(実施例5：ヒトCD86陽性Tリンパ球は、ナイーブTリンパ球の増殖および活性化に必要な共刺激シグナルを提供する。)

ヒトのCD86⁺ Tリンパ球は、ナイーブTリンパ球の効果的な活性化を誘発するために必要な共刺激シグナル(IFNの増殖および/または産生の誘発によって測定される)を提供するが、CD86⁻ Tリンパ球はしないという事実をここに例証する(図5a、5bおよび5c)。

【0103】

a. 方法論：抗CD3を用いた共刺激実験。

CD86⁺ Tリンパ球を実施例1に記載したようにして作出し、第二の刺激の1週間後に使用した(実施例1、図1)。CD86⁻ Tリンパ球を、刺激(実施例1に記載される通り)の2週間後に細胞選別フローサイトメーターを使用して単離した(実施例4aに記載される通り)。次いで、10mMのリン酸緩衝液(pH7.4)中に調製した1%のパラホルムアルデヒド溶液を用い、4で10分間、細胞を固定する。リン酸緩衝液中で3回洗浄した後、細胞を中和溶液(200mM L-リシン、Sigma)と共にインキュベートする。リン酸緩衝液中で3回洗浄した後、細胞を 2×10^6 細胞/mlの濃度で完全培養培地中に再懸濁する。

【0104】

ナイーブTリンパ球(CD45RA陽性)を抹消血から単離する。手短に言うと、MNCを、実施例1に記載したように、Ficoll-Hypaque勾配上で遠心分離によって単離し、そしてTリンパ球を実施例3に記載したように、

ロゼティング技術を用いて精製する。洗浄後、細胞を完全培養培地中に再懸濁し、抗CD45RO抗体 (5×10^6 細胞 / 1 ml の細胞懸濁液に対して $5 \mu\text{g}$ の抗体) と共に、4 で20分間インキュベートする。洗浄後、細胞を、抗マウス免疫グロブリン抗体を担持する磁気ビーズと共にインキュベートする (Dyna beads system、Dyna1)。CD45RO⁺ Tリンパ球を磁場の作用によって細胞懸濁液から除去する。洗浄後、CD45RA⁺、CD45RO⁻ T細胞の集団を 2×10^6 細胞 / ml の濃度で完全培養培地中に再懸濁する。純度は > 95% であり、これは、コントロールアイソタイプ抗体と比較したFITC抗CD45RA抗体を用いたフローサイトメトリーによって決定される。

【0105】

CD45RA陽性Tリンパ球 (2×10^5 細胞 / ml、 $100 \mu\text{l}$ / ウェル) を丸底96-ウェル培養プレート (Nunc) 中で培養し、そしてCD86⁺ Tリンパ球またはCD86⁻ Tリンパ球のいずれかの存在下または非存在下に、 $10 \text{ ng} / \text{ml}$ の抗CD3抗体OKT3で刺激する (最終濃度 2×10^5 細胞 / ウェル)。実験を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗ヒトCD86中和抗体 (IT2.2クローン、PharmingenまたはFUN-1クローン、Ancell) の存在下または非存在下で実施する。様々な実験条件を3回実施する。

【0106】

CD45RA⁺ T細胞の活性化を以下の2つの基準を使用して測定する：

- 3日間の培養後に細胞の増殖を、トリチウム化したチミジン (^3H -Thy、Amersham、United Kingdom) の取り込みを測定することによって評価する。手短にいうと、 $0.25 \mu\text{Ci}$ の ^3H -Thy を各ウェルに添加する。 ^3H -Thy の取り込みをシンチレーションカウンター (Packard、Australia) を使用して測定する。図5aに記載の結果は、cpm (平均 \pm sd、 $n = 5$) で表している。

- 2日間の培養後、実施例4に記載したように、培養上清中のIFNの産生を測定する。図5bに記載された結果は、 ng / ml (平均 \pm sd、 $n = 3$) で表している。

【0107】

b. 方法論：混合リンパ球反応

2つの異なるドナー由来のCD86⁺およびCD86⁻細胞の集団を上記のようにして作出する。CD45RA⁺ Tリンパ球(2×10⁶細胞/ml、100μl/ウェル)を、CD86⁺ Tリンパ球もしくはCD86⁻ Tリンパ球の存在下または非存在下で、丸底96-ウェル培養プレート(Nunc)中、最終濃度2×10⁵細胞/ウェルで培養する。実験を10μg/mlの抗CD86中和抗体(IT2.2クローンまたはFUN-1クローン)の存在下または非存在下で実施する。種々の実験条件を3回実施する。5日間の培養後、細胞の増殖を、上記のように³H-Thyの取り込みを測定することによって評価する。結果を図5cに示す(平均±SD、n=5)。

【0108】

c. 結果：図5a、5bおよび5cに記載したように、これらの結果から以下のことが分かる：

- ヒトCD86⁺ Tリンパ球は、準最適用量の抗CD3抗体で刺激されたヒトナイーブTリンパ球(CD45RA)による増殖(図5a)およびIFNの産生(図5b)に必要な共刺激シグナルを提供する。

- CD86⁺ Tリンパ球によって生じるこの共刺激効果は、2つの異なる抗CD86中和抗体(IT2.2およびFUN-1クローン)によって部分的に阻害され、Tリンパ球によって発現されるCD86分子が機能的であることを例証する(図5aおよび5b)。

- CD86⁻ Tリンパ球は、この共刺激活性を支持することができない(図5aおよび5b)。

- CD86⁺ 細胞は、混合リンパ球反応を誘発することができるが、CD86⁻ 細胞はできない(図5c)。

- CD86⁺ Tリンパ球によって生じる共刺激の役割は、2つの異なる抗CD86中和抗体(IT2.2およびFUN-1クローン)によって阻害され、Tリンパ球によって発現されるCD86分子が機能的であることを例証する(図5c)。

- CD86 - Tリンパ球は、この共刺激活性を支持することができない (図5c)。

- 抗CD86抗体がCD86 + Tリンパ球の共刺激特性を部分的にしか中和しないという事実は、(やはりCD86 + Tリンパ球によって発現される)他の共刺激分子がこれらの細胞によって生じる共刺激活性に寄与することを示唆する。

【0109】

結論として、これらの結果は、ヒトTリンパ球によって発現されるCD86分子が機能的であることを示す。抗CD86抗体がCD86 + Tリンパ球の共刺激特性を部分的にしか中和しないという事実は、(やはりCD86 + Tリンパ球によって発現される)他の共刺激分子がこれらの細胞によって生じる共刺激活性に寄与することを示唆する。

【0110】

(実施例6:ヒトTリンパ球によって発現されたCD86分子は、70kDaの見かけ分子量を有する。)

ヒトTリンパ球によって発現されたCD86分子が、AgPCによって発現されたCD86分子と同様に、70kDaの見かけ分子量を有するという事実をここに例証する。

【0111】

a. 方法論: CD86分子を発現するTリンパ球の集団を、実施例1に記載したように、2回の連続的な刺激によって作出した。DauidiヒトBリンパ系株およびJurkatヒトTリンパ系株をAmerican Type Culture Collectionから入手した。これらの細胞を完全培地(2mM L-グルタミンおよび10% 非働化胎仔ウシ血清を補充したRPMI培地)中で培養する。これらの細胞を回収し、そしてRPMI培地で3回洗浄し、次いで、0.5%のNonidet P40、およびプロテアーゼインヒビターのカクテル(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を含む、10mM リン酸緩衝液(pH7.4)中、4 で20分間、溶解する。次いで、核を除去するために細胞溶解液を、4 で10分間、12

000 rpmで遠心分離する。その上清を、0.1% プロモフェノールブルー、5% グリセロールおよび0.1% -メルカプトエタノールを含む、10 mM リン酸緩衝液(1当量)中にとる。次いで、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(5%のスタッキングゲル-10%の分離ゲル)により、タンパク質をその分子量に従って分離する。5 × 10⁶個の細胞に相当する量のタンパク質を各レーンに充填する。移動後、タンパク質をニトロセルロース膜上にウエスタンブロット法によって転写する。10%の脱脂粉乳を含むリン酸溶液中で飽和させた後、膜を、10 μg/mlの濃度の抗CD86抗体(IT2.2クローン、Pharminogen)と共に、4℃で一晩、振盪しながらインキュベートする。10%の脱脂粉乳を含むリン酸緩衝液で洗浄した後、膜を、ペルオキシダーゼで標識したヤギの抗マウス免疫グロブリン抗体(Dako)と共に、室温で2時間、振盪しながらインキュベートする。膜をリン酸緩衝液中で洗浄する。結合した抗体をAmershamからのECLシステムを使用した化学発光によって検出する。

【0112】

b. 結果：ウエスタンブロット(図6)は、ヒトTリンパ球によって発現されたCD86分子が70 kDaの見かけ分子量を有することを示す(レーン2)。この分子量は、ヒトB細胞(Daudi株)によって示された分子量(レーン1)と同一である。CD86分子は、Jurkat細胞によって発現されない(レーン3)。我々は、CD86-細胞がいかなるCD86分子も発現しないことを確認した(結果は示さない)。

【0113】

(実施例7：CD86+ Tリンパ球は、K562腫瘍細胞株に対する自発的な細胞傷害活性を有する。)

CD86分子を発現するヒトTリンパ球がインビトロで腫瘍細胞を自発的に殺し得るという事実をここに例証する(図7)。

【0114】

a. 方法論：CD86分子を発現するTリンパ球または発現しないTリンパ球の混合集団を、実施例1に記載したように、刺激の14日後に作出した。CD86-リンパ球およびCD86+ Tリンパ球を、実施例4に記載したように、

細胞選別フローサイトメーターを使用して単離した。末梢血由来のヒトTリンパ球を実施例3に記載したように単離した。

【0115】

標的細胞は、American Type Culture Collectionから入手したK562株である。これらの細胞を完全培地(2mM L-グルタミンおよび10%非働化胎仔ウシ血清を補充したRPMI培地)中で培養する。これらの細胞を回収し、そしてRPMI培地で2回洗浄する。次いで、これらの細胞を、37℃で90分間、 ^{51}Cr の溶液(100 μCi /10⁶細胞)と共にインキュベートする。次いで、細胞を遠心分離し、そして完全培養培地で3回洗浄する。次いで、標的細胞を丸底96-ウェル培養プレート(Nunc)に、1 \times 10⁵細胞/ウェルの割合で分配する。エフェクター細胞(末梢血から新たに単離したTリンパ球、CD86+ Tリンパ球、CD86- Tリンパ球、または、CD86+ Tリンパ球/CD86- Tリンパ球の混合集団(50/50))を、1個の標的細胞につき50個のエフェクター細胞の割合で添加し、最終容量を200 μl とする。次いで、培養プレートを、37℃、5% CO₂の湿気のインキュベーター中で4時間インキュベートする。100 μl の上清を除去し、そして、 ^{51}Cr 放出を放射カウンター(Packard、Australia)を使用して測定する。標的細胞のみからの自発的な放出を上清中で測定する。 ^{51}Cr の全放出を、標的細胞のみを含み、10mM リン酸緩衝液(pH7.4)中、1% Tween20溶液で処理した培養ウェル中で測定する。

【0116】

エフェクター細胞の細胞傷害活性を、以下のようにして計算される標的細胞の溶解率として、評価する：

(エフェクター細胞の存在下での ^{51}Cr 放出 - 自発放出 / 全放出 - 自発放出)

【0117】

結果：細胞傷害アッセイは、CD86+ Tリンパ球が自発的にK562標的細胞を殺すことを示した(図7)。また、この細胞傷害活性は、CD86- 細

胞によっても、さらにCD86+ 細胞およびCD86- 細胞を含む細胞の集団によっても生じる。他方、新たに単離したTリンパ球はK562細胞を殺すことは不可能である。

【0118】

(参考文献一覧)

【0119】

Agematsu, K., Kobata, T., Yang, F.C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Kitahara, M., Mori, T., Sugita, K., Morimoto, C. および Komiyama, A., CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. *Eur. J. Immunol.* (1995) 25, 2825-29.

【0120】

Azuma, M., Cayabyab, M., Phillips, J. H. および Lanier, L. L. Requirements for CD28-dependent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* (1993) 150, 2091-101.

【0121】

Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L. および Somoza, C., B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* (1993) 366, 76-9.

【0122】

Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., Heath, W.R. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998 Jun 4; 393 (6684), 478-80.

【0123】

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. および Howard, J.C., Cellular responses to interferon-gamma. *Ann. Rev. Immunol.* (1997) 15, 749-95.

【0124】

Camussi, G., Albano, E., Tetta, C. および Bussolino, F., The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Biochem.* (1991) 202, 3-14.

【0125】

Chamberlain, R.S., Carroll, M.W., Bronte, V., Hwu, P., Warren, S., Yang, J.C., Nishimura, M., Moss, B., Rosenberg, S.A. および Restifo, N.P., Costimulation enhances the active immunotherapy effect of recombinant anticancer vaccines. *Cancer Res.* (1996) 56, 2832-6.

【0126】

Dilloo, D., Brown, M., Roskrow, M., Zhong, W., Holladay, M., Holden, W. および Brenner, M. CD40 ligand induces an antileukemia immune response in vivo. *Blood* 1997 Sep 1; 90(5), 1927-33.

【0127】

Flynn, K. および Mullbacher, A., The generation of memory antigen-specific cytotoxic T cell responses by CD28/CD80 interactions in the absence of antigen. *Eur. J. Immunol.* (1997) 27, 456-62.

【0128】

Greenfield, E.A., Nguyen, K.A. および Kuchroo, V.K. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol.* (1998) 18, 389-418.

【0129】

Gurunathan, S., Irvine, K.R., Wu, C.Y., Cohen, J.I., Thomas, E., Prussin, C., Restifo, N.P. および Seder, R.A. CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge. *J. Immunol.* (1998) Nov 1; 161(9), 4563-71.

【0130】

Hakamada-Taguchi, R., Kato, T., Ushijima, H., Murakami, M., Uede, T., Nariuchi, H., Expression and co-stimulatory function of B7-2 on murine CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* (1998) 28, 865-73.

【0131】

He, X.S., Chen, H.S., Chu, K., Rivkina, M. および Robinson, W.S. Costimulatory protein B7-1 enhances the cytotoxic T cell response and antibody

y response to hepatitis B surface antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996 Jul 9; 93(14), 7274-8.

【 0 1 3 2 】

Hieber, U. および Heim, M.E., Tumor necrosis factor for the treatment of malignancies. Oncology (1994) 51, 142-53.

【 0 1 3 3 】

Hollisberg, P., Scholz, C., Anderson, D.E., Greenfield, E.A., Kuchroo, V.K., Freeman, G.J. および Hafler, D.A., Expression of a hypoglycosylated form of CD86 (B7-2) on human T cells with altered binding properties to CD28 and CTLA-4. J. Immunol. (1997) 159, 4799-805.

【 0 1 3 4 】

Hunter, C.A., Ellis-Neyer, L., Gabriel, K.E., Kennedy, M.K., Grabstein, K.H., Linsley, P.S. および Remington, J.S., The role of the CD28/B7 interaction in the regulation of NK cell responses during infection with *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. (1997) 158, 2285-93.

【 0 1 3 5 】

Imro, M.A., Dellabona, P., Manici, S., Heltai, S., Consogno, G., Bellone, M., Rugarli, C. および Protti, M.P. Human melanoma cells transfected with the B7-2 costimulatory molecule induce tumor-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes in vitro. Hum. Gene Ther. (1998) 9, 1335-44.

【 0 1 3 6 】

Kaye, P. Costimulation and the regulation of antimicrobial immunity. Immunol Today (1995) 16, 423-7.

【 0 1 3 7 】

Kobata, T., Agematsu, K., Kameoka, J., Schlossman, S.F., Morimoto, C., CD27 is a signal-transducing molecule involved in CD45RA+ naive T cell costimulation. J. Immunol. (1994) 153, 5422-32.

【 0 1 3 8 】

Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L. および Schlossman, S.F., Monoc

lonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens
. Science (1979) 206, 347-9.

【 0 1 3 9 】

Laman, J.D., Claassen, E., Noelle, R.J., Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). Crit. Rev. Immunol. (1996) 16, 59-108.

【 0 1 4 0 】

Landegren, U., Andersson, J. および Wigzell, H. Mechanism of T lymphocyte activation by OKT3 antibodies. A general model for T cell induction. Eur J Immunol. (1984) 14, 325-8.

【 0 1 4 1 】

Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J.H., Linsley, P.S., Okumura, K., Ito, D. および Azuma, M., CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. J. Immunol. (1995) 154, 97-105.

【 0 1 4 2 】

Lenschow, D.J. および Walunas, T.L., Bluestone, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu. Rev. Immunol. (1996) 14, 233-58.

【 0 1 4 3 】

Leong, C.C., Marley, J.V., Loh, S., Milech, N., Robinson, B.W. および Garlepp, M.J., Transfection of the gene for B7-1 but not B7-2 can induce immunity to murine malignant mesothelioma. Int. J. Cancer 1997 May 2; 71(3), 476-82.

【 0 1 4 4 】

Liebowitz, D.N., Lee, K.P., June, C.H., Costimulatory approaches to adoptive immunotherapy Curr. Opin. Oncol. (1998) 10, 533-41.

【 0 1 4 5 】

Martin, P.J., Ledbetter, J.A., Morishita, Y., June, C.H., Beatty, P.G. および Hansen, J.A., A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. J. Immunol.

(1986) 136, 3282-7.

【 0 1 4 6 】

Melero, I., Bach, N., Chen, L., Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T lymphocytes in immune responses to tumor antigens. Life Sci. (1997) 60, 2035-41.

【 0 1 4 7 】

Mier, J.W. および Gallo, R.C., Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media. Proc Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 6134-8.

【 0 1 4 8 】

Mier, J.W., Gallo, R.C., The purification and properties of human T cell growth factor. J. Immunol. 1982, 128, 1122-7.

【 0 1 4 9 】

Mule, J.J., Shu, S., Schwarz, S.L. および Rosenberg, S.A., Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. Science (1984) 225, 1487-9 & brevet WO 91/4444).

【 0 1 5 0 】

Northoff, H., Carter, C., Oppenheim, J.J., Inhibition of concanavalin A-induced human lymphocyte mitogenic factor (Interleukin-2) production by suppressor T lymphocytes. J. Immunol. 1980 125, 1823-8.

【 0 1 5 1 】

Nunes, J., Klasen, S., Ragueneau, M., Pavon, C., Couez, D., Mawas, C., Bagnasco, M. および Olive, D., CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events. Int. Immunol. 1993, 5, 311-5.

【 0 1 5 2 】

Puetzer, B.M., Hitt, M., Muller, W.J., Emtage, P., Gauldie, J. および Graham, F.L., Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression

n. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94, 10889-94.

【 0 1 5 3 】

Rao, J.B., Chamberlain, R.S., Bronte, V., Carroll, M.W., Irvine, K.R., Moss, B., Rosenberg, S.A. および Restifo, N.P., II-12 is an effective a djuvant to recombinant vaccinia virus-based tumor vaccines: enhancement by simultaneous B7-1 expression. J. Immunol. (1996) 156, 3357-65.

【 0 1 5 4 】

Swain, S.L., Croft, M., Dubey, C., Haynes, L., Rogers, P., Zhang, X. および Bradley, L.M., From naive to memory T cells. Immunol Rev. (1996) 150, 143-67.

【 0 1 5 5 】

Tax, W.J., Willems, H.W., Reekers, P.P., Capel, P.J. および Koene, R.A. Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells. Nature (1983) Aug 4-10, 304 (5925), 445-7.

【 0 1 5 6 】

Tsuji, T., Hamajima, K., Ishii, N., Aoki, I., Fukushima, J., Xin, K.Q., Kawamoto, S., Sasaki, S., Matsunaga, K., Ishigatsubo, Y., Tani, K., Okubo, T. および Okuda, K. Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen. Eur. J. Immunol. (1997) 27, 782-7.

【 0 1 5 7 】

Van Lier, R.A., Brouwer, M. および Aarden, L.A. Signals involved in T cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD28 and anti-CD2 monoclonal antibodies. Eur J. Immunol. (1988) 18, 167-72 & Brevet Europeen 40 96 55.

【 0 1 5 8 】

Van Seventer, G.A., Shimizu, Y., Horgan, K.J., Shaw, S., The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor

r-mediated activation of resting T cells. J. Immunol. (1990) 144, 4579-86.

【0159】

Yang, F.C., Agematsu, K., Nakazawa, T., Mori, T., Ito, S., Kobata, T., Morimoton, C. および Komiyama, A. CD27/CD70 interaction directly induces natural killer cell killing activity. Immunology (1996) 88(2) 289-93.

【0160】

Yeh, K.Y., Pulaski, B.A., Woods, M.L., McAdam, A.J., Gaspari, A.A., Frelinger, J.G. および Lord, E.M., B7-1 enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity and inhibits tumor growth of a poorly immunogenic murine carcinoma. Cell Immunol. (1995) 165, 217-24.

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1：IL-2の存在下に抗CD3抗体で末梢血由来のMNCを刺激することによる、CD86分子を発現するTリンパ球の集団のインビトロでの発生。

【図2】

図2：ヒトCD86+ Tリンパ球はCD45RO分子を発現する。ヒトMNCを実施例1に記載したように、抗体OKT3およびインターロイキン2を用いて刺激した。

【図3】

図3：CD86+ Tリンパ球上におけるCD30、CD40リガンドおよびCD70分子の優先的発現。

【図4】

図4aおよび4b：CD86+およびCD86- Tリンパ球による、IFN産生の比較。

【図5】

図5a、5bおよび5c：CD86+ Tリンパ球は、ナイーブTリンパ球を活性化するために必要な共刺激シグナルを提供する。

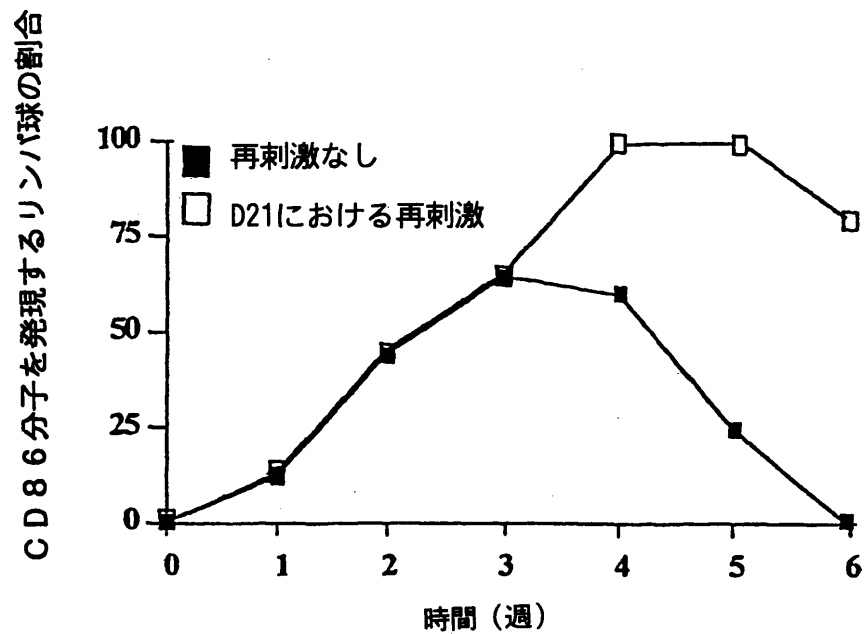
【図6】

図6：ヒトのBリンパ球およびTリンパ球によって発現されたCD86分子は、70kDaの類似の分子量を有する。

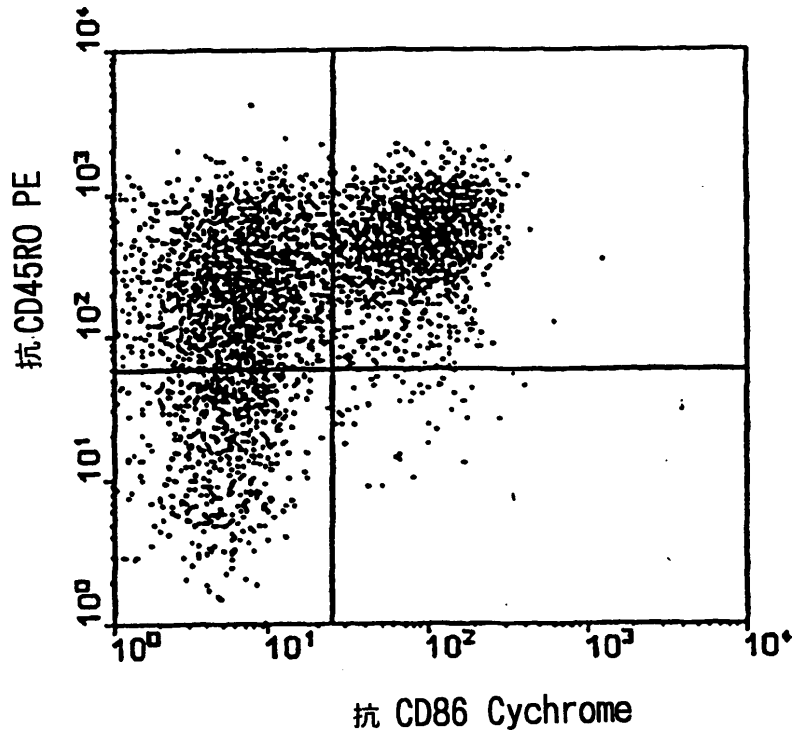
【図7】

図7：CD86+ Tリンパ球は、K562腫瘍株に対する自発的な細胞傷害活性を有する。

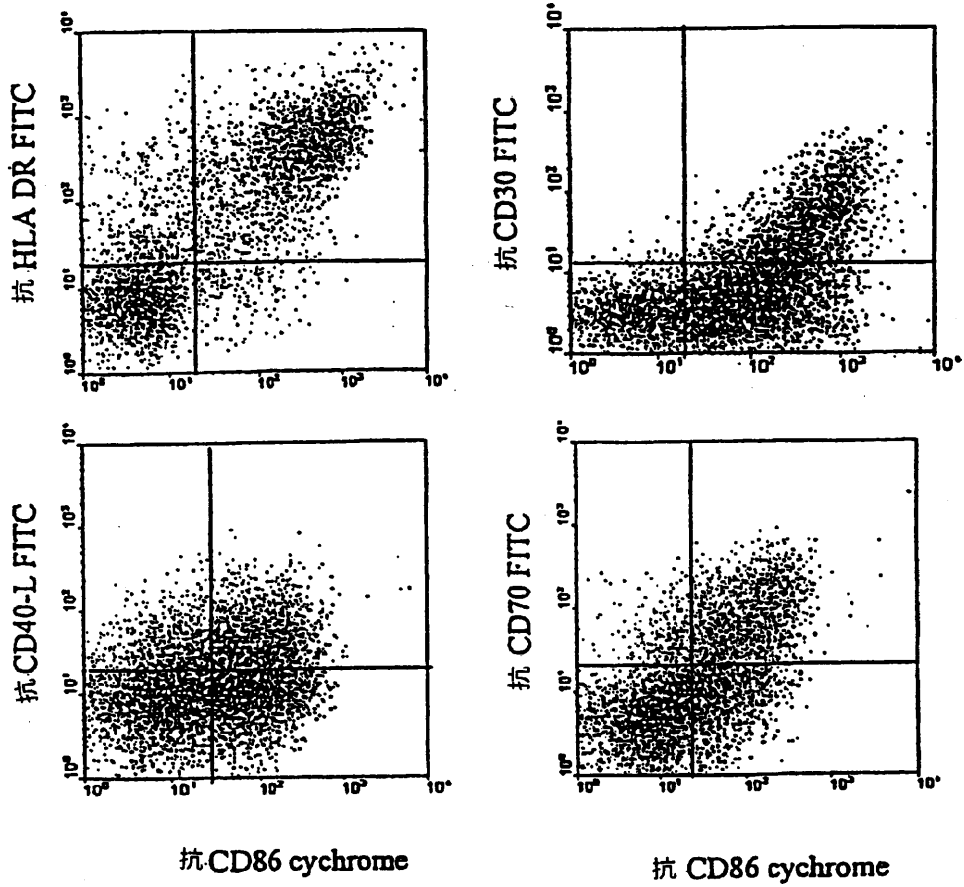
【図1】



【图2】



【图3】



【図4】

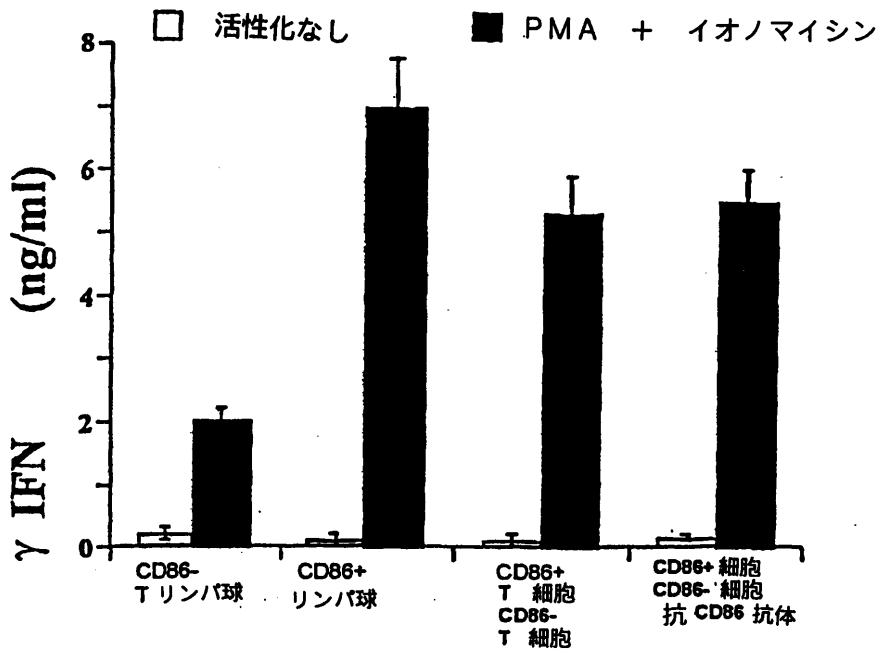


図4 a.

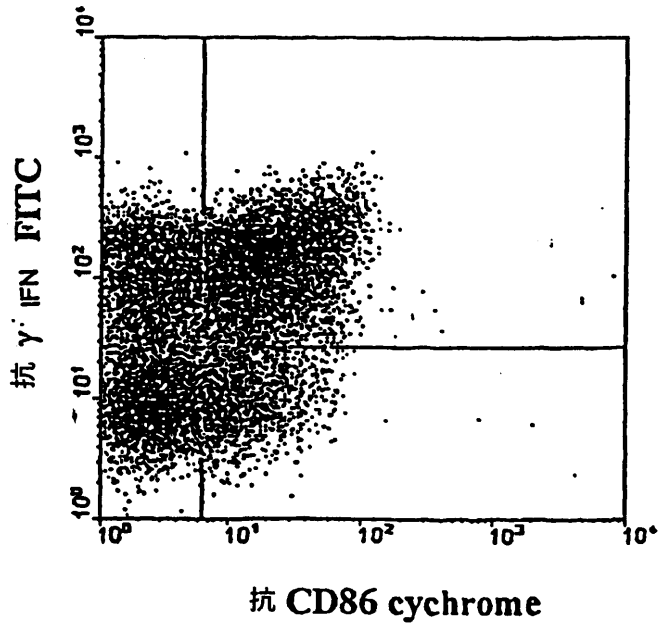


図4 b

【図5 a・b】

図5 a

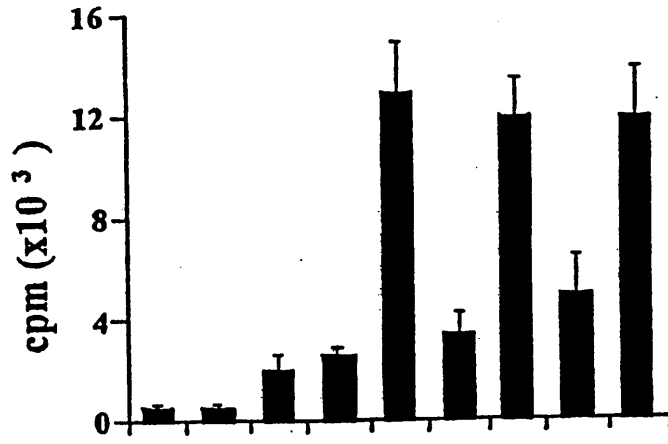
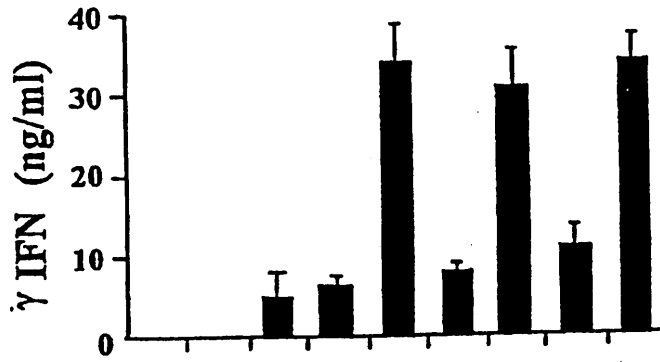


図5 b



抗CD3 抗体	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CD86+ Tリンパ球	-	+	-	-	+	+	+	+	+
CD86- Tリンパ球	-	-	-	+	-	-	-	-	-
						IT2.2	IgG2b	FUN-11	IgG1

【図5c】

(図5の続き)

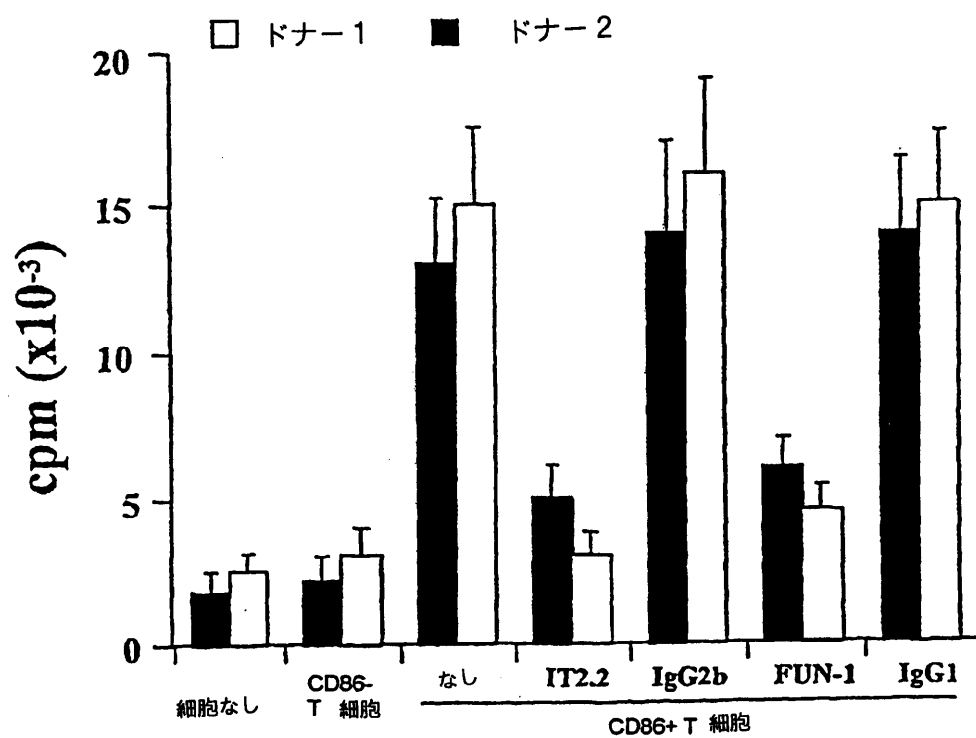
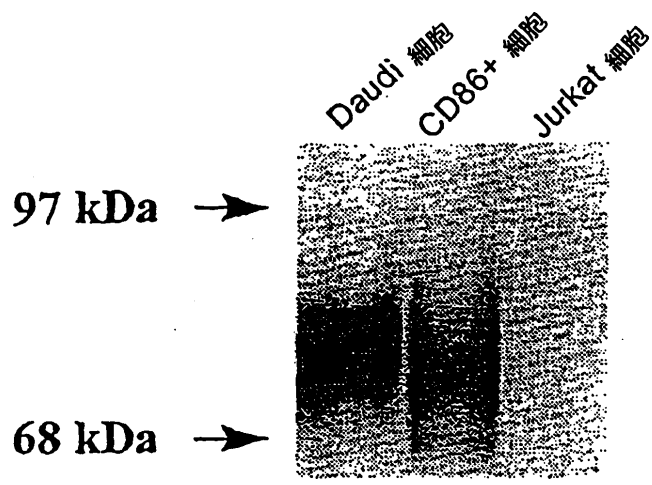
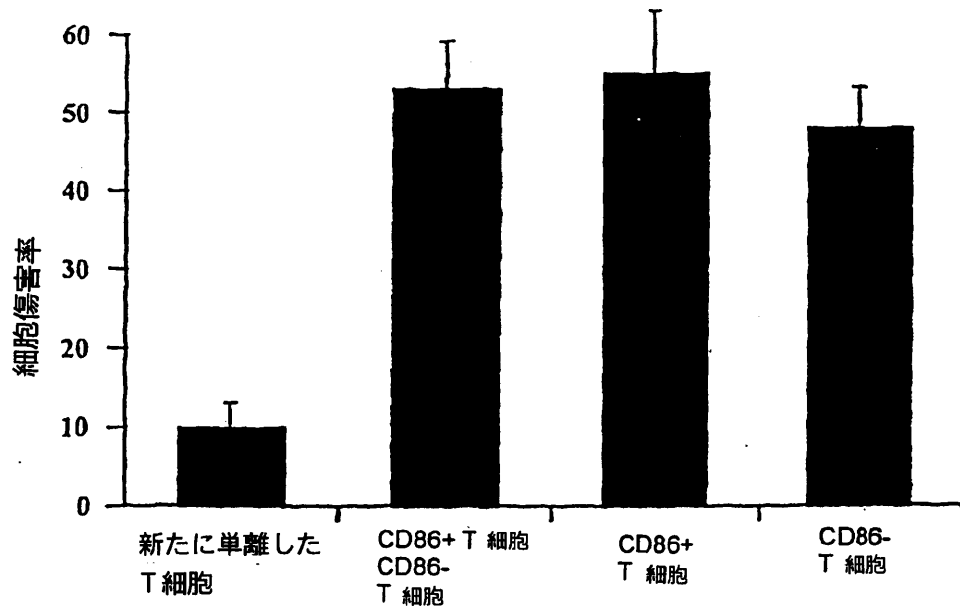


図5c

【図6】



【図7】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年4月23日(2001.4.23)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 機能的なCD86分子を発現する、共刺激性であり、細胞傷害性であるヒトTリンパ球。

【請求項2】 Tリンパ球の実質的に均一な集団の製造方法であって、ヒトTリンパ球を含むサンプルを使用し、該リンパ球の少なくとも2回の連続的な刺激を実施することを特徴とする方法。

【請求項3】 少なくとも1つのアクチベーター、およびヒトTリンパ球の増殖を刺激する少なくとも1つのサイトカインで各刺激を実施することを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 アクチベーターが抗CD2、抗CD3および抗CD28抗体ならびにマイトジェンから選択され、ヒトTリンパ球の増殖を刺激するサイトカインがIL-2、IL-4およびIL-7から選択されることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 ヒトTリンパ球を含むサンプルが、血液単核細胞(MNC)のサンプルまたはMNC中に存在するTリンパ球の単離物であることを特徴とする、請求項2～4のうちの1項に記載の方法。

【請求項6】 以下の混合物：

- ・抗CD3抗体およびIL-2；ならびに
- ・抗CD3抗体、抗CD28抗体およびIL-2、

のうちの一方を用いて、刺激を実施することを特徴とする、請求項2～5に記載の方法。

【請求項7】 刺激の後、Tリンパ球の増殖を刺激するために、サイトカイ

ンを定期的に添加することを特徴とする、請求項2～6のうちの1項に記載の方法。

【請求項8】 2回の刺激の間隔が少なくとも4日、好ましくは7日であることを特徴とする、請求項2～7のうちの1項に記載の方法。

【請求項9】 第二の刺激後、好ましくは、4日より多くが経過した後に、実質的に均一な集団が産生され得ることを特徴とする、請求項2～8のうちの1項に記載される方法。

【請求項10】 ヒトTリンパ球の実質的に均一な集団であって、該集団の50～60%が機能的なCD86分子を発現し、該集団が請求項2～9のうちの1項に記載される方法を用いて産生され得る集団。

【請求項11】 請求項2～9のうちの1項に記載の方法を用いて産生され得る、請求項1に記載のヒトTリンパ球の実質的に均一な集団。

【請求項12】 生物学的な抽出物、または生物学的な誘導体もしくはペプチドもしくはリポペプチドでパルスされていることを特徴とする、請求項10または11に記載のヒトTリンパ球の実質的に均一な集団。

【請求項13】 DNAでトランスフェクトされているか、あるいは化学的分子または免疫学的分子に結合されていることを特徴とする、請求項10～12のうちの1項に記載のヒトTリンパ球の実質的に均一な集団。

【請求項14】 機能的なCD86分子を発現するTリンパ球の集団によって産生されるリンフォカイン。

【請求項15】 請求項14に記載のリンフォカインから得られる精製リンフォカイン。

【請求項16】 請求項1に記載のヒトTリンパ球、または請求項10～13のうちの1項に記載の集団、または請求項14および15のうちの1項に記載のリンフォカインを少なくとも含むことを特徴とする治療的組成物。

【請求項17】 機能的なCD86分子を発現するリンパ球、もしくは請求項1に記載のリンパ球、あるいは請求項10～13のうちの1項に記載の集団の使用であって、先天性、後天性、または病気に起因する免疫不全の治療を意図した医薬品を調製するための使用。

【請求項18】 機能的なCD86分子を発現するリンパ球、もしくは請求項1に記載のリンパ球、あるいは請求項10～13のうちの1項に記載の集団の使用であって、微生物疾患を治療するための使用。

【請求項19】 機能的なCD86分子を発現するリンパ球、もしくは請求項1に記載のリンパ球、あるいは請求項10～13のうちの1項に記載の集団の使用であって、敗血性ショックを治療するための使用。

【請求項20】 機能的なCD86分子を発現するリンパ球、もしくは請求項1に記載のリンパ球、あるいは請求項10～13のうちの1項に記載の集団を少なくとも含むことを特徴とするワクチン。

【請求項21】 機能的なCD86分子を発現するTリンパ球を、血液または組織サンプル中で検出することによる免疫不全の診断方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/FR 00/00240
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/08 A61P37/00 A61K35/14 C12N5/10 C07K14/52 A61K39/00 G01N33/50		
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 C12N A61K C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-internal, WPI Data, MEDLINE, AIDSLINE, CANCERLIT, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, LIFESCIENCES		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ABE K ET AL: "Expression of CD80 and CD86 on peripheral blood T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus." JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, (1999 JAN) 19 (1) 58-66., XPO00857817 the whole document	1,2,12, 13,20
X	MOOSIG F ET AL: "Costimulatory molecules in Wegener's granulomatosis (WG): lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on T cells." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (1998 OCT) 114 (1) 113-8., XPO00857821 the whole document	1,2,12, 13,20
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 July 2000		Date of mailing of the international search report 26/07/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreau, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 00/00240

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 03670 A (PANGENETICS) 29 January 1998 (1998-01-29) the whole document ---	1-26
A	WO 98 21314 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE) 22 May 1998 (1998-05-22) the whole document ---	1-26
A	HAKAMADA-TAGUCHI R ET AL: "Expression and co-stimulatory function of B7-2 on murine CD4+ T cells." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998 MAR) 28 (3) 865-73., XP000857823 cited in the application the whole document -----	1-26
A	JEANNIN P ET AL: "CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 JUN 20) 272 (25) 15613-9., XP002126224 the whole document ---	1-26
P,X	JEANNIN P ET AL: "Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 FEB 15) 162 (4) 2044-8., XP002142434 the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00240

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9803670 A	29-01-1998	CA 2260752 A EP 0922111 A	29-01-1998 16-06-1999
WO 9821314 A	22-05-1998	AU 5253898 A AU 5590198 A WO 9821240 A	03-06-1998 03-06-1998 22-05-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)	
A 6 1 P	37/04	C 0 7 K	14/57	
C 0 7 K	14/57	G 0 1 N	33/53	Y
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	5/00	E
G 0 1 N	33/53			B
(72)発明者	ヴィットーリ、マルク			
	フランス国、エフ - 74160 ボーモントゥ、			
	アレ デュ グラン プレ 106			
(72)発明者	ボンヌフォイ、ジャン - イヴ			
	フランス国、エフ - 74350 ル サペ、オ			
	ノワイエール(番地なし)			
F タ-ム(参考)	4B065 AA94X AB01 AC14 AC20			
	BB19 BC01 BC50 CA24 CA44			
	4C085 AA03 CC12 DD23 EE01			
	4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 DA20			
	ZB09 ZB26 ZB35			
	4H045 AA10 AA30 CA40 DA18 EA20			
	EA28 EA29 FA72			

专利名称(译)	表达CD86分子的人效应T淋巴细胞及其治疗用途		
公开(公告)号	JP2002535983A	公开(公告)日	2002-10-29
申请号	JP2000597412	申请日	2000-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	皮尔法伯制药公司		
申请(专利权)人(译)	皮埃尔法布尔, 曼药物		
[标]发明人	ジーニンパスカル デルネストウイヴ ヴィットーリマルク ボンヌフォイジャンイヴ		
发明人	ジーニン、パスカル デルネストウ、イヴ ヴィットーリ、マルク ボンヌフォイ、ジャン-イヴ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/12 A61K35/14 A61K39/00 A61P25/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/04 C07K14/52 C07K14/57 C12N5/0783 C12N5/10 C12N5/06		
CPC分类号	A61K2035/124 A61K2039/5158 A61P25/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/52 C12N5/0636 C12N2501/23 C12N2501/515		
FI分类号	A61K35/14.C A61K39/00.H A61P31/04 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/57 G01N33/53.Y C12N5/00.E C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BB19 4B065/BC01 4B065/BC50 4B065/CA24 4B065/CA44 4C085/AA03 4C085/CC12 4C085/DD23 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB37 4C087/DA20 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4C087/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA18 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/FA72		
代理人(译)	高岛肇		
优先权	1999001187 1999-02-02 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及表达功能性CD86分子的T细胞，制备所述T细胞的基本均一的群体的方法及其在治疗和诊断中的应用。

	新たに単離した T細胞	CD86-	CD86+
HLA-Dr	+/- (5% ± 1)	+	+++
CD25	-	++	+++
CD30	-	-	++ (40% ± 12)
CD40-L	-	-	+ (10% ± 3)
CD54	+/-	+	++
CD70	-	-	++ (39% ± 8)
CD80	-	+	++