

(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2003 - 510039**

(P2003 - 510039A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 35/14	Z 4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/14		35/24	4 B 0 6 3
35/24		A 6 1 P 37/02	4 B 0 6 5
A 6 1 P 37/02		C 0 7 K 14/74	ZNA 4 C 0 8 7
C 0 7 K 14/74	ZNA	C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 32数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 522275(P2001 - 522275)

(86)(22)出願日 平成12年9月5日(2000.9.5)

(85)翻訳文提出日 平成13年5月7日(2001.5.7)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/02443

(87)国際公開番号 W001/018053

(87)国際公開日 平成13年3月15日(2001.3.15)

(31)優先権主張番号 99/11133

(32)優先日 平成11年9月6日(1999.9.6)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 アンスティテュ ナシオナル ドゥ ラ  
サ-ント エ ドゥ ラ ルシエルシュ  
メディカル (イ エン エス ウ エル  
エム)

フランス国 13 セデクス パリー リュ  
ドゥ トルピアック 101

(72)発明者 ラン フランソワ  
フランス国 ナ-ント リュ マニャーヌ  
9

(72)発明者 ボディニエ マリー  
フランス国 ナ-ント リュ フォーレ  
53

(74)代理人 弁理士 岸本 瑛之助 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H L A という背景において提示されたペプチドに特異的な C D 8 + T リンパ球個体群の検出及び精製手段

(57)【要約】

【課題】 H L A という背景において提示されたペプチドに特異的な C D 8 + T リンパ球個体群の検出及び精製手段を提供する。

【解決手段】本発明は、クラス I の M H C に類似する組換え型タンパク質から作製された多量体において、タンパク質が、C D 8 と重鎖の間の相互作用の親和力の減少ひいては抑制を導く少なくとも 1 つの改変を T リンパ球のコレセプタ C D 8 と重鎖の相互作用ゾーン内に有していることを特徴とする多量体を対象とする。抗原ペプチドと複合体形成されたこれらの多量体は、診断及び治療目的で応用される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 クラスIのMHCに類似する組換え型タンパク質から作製された多量体において、該タンパク質が、CD8と重鎖の間の相互作用の親和力の減少を、ひいては抑制までもを導く少なくとも1つの改変を、Tリンパ球のコレセプタCD8と重鎖の相互作用ゾーン内に有していることを特徴とする多量体。

【請求項2】 改変が、重鎖の3ドメインに関するものであること、を特徴とする、請求項1に記載の多量体。

【請求項3】 改変が、前記コレセプタCD8に固定される能力をもつ未変性重鎖の対応するドメインとの関係における少なくとも1つのアミノ酸の3ドメイン内の突然変異に対応することを特徴とする、請求項1又は2に記載の多量体。

【請求項4】 改変が、前記コレセプタCD8に固定される能力をもつ未変性重鎖の対応するドメインとの関係における、重鎖の3ドメインの少なくとも1つのアミノ酸の化学的修飾に対応することを特徴とする、請求項1又は2に記載の多量体。

【請求項5】 改変が、前記コレセプタCD8に固定される能力をもつ未変性重鎖の対応するドメインとの関係における、重鎖の3ドメインの少なくとも1つのアミノ酸の欠失に対応することを特徴とする、請求項1又は2に記載の多量体。

【請求項6】 抗原ペプチドとの複合体の形を呈していることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の多量体。

【請求項7】 4量体の形を呈することを特徴とする、請求項6に記載の多量体。

【請求項8】 ペプチド特異的CD8+ Tリンパ球個体群の検出及び/又は分離を目的とする、請求項6又は7に記載の多量体の使用。

【請求項9】 免疫磁気選別といった細胞選別方法における、請求項8に記載の使用。

【請求項10】 ポリクローナル個体群からペプチド特異的CD8+ Tリンパ球個体群を検出する方法において、

- 改変されたクラス I の M H C / ペプチドの複合体と、この複合体に対する親和力をもつ T リンパ球レセプタとの間の相互作用を可能にする条件下で、請求項 6 又は 7 に記載の抗原ペプチドと複合体形成された多量体とポリクローナル個体群とを接触させる段階、

- 前記複合体に固定されたリンパ球個体群を顕示する段階、  
を含んで成ることを特徴とする方法。

【請求項 1 1】 ポリクローナル個体群からペプチド特異的 C D 8 + T リンパ球個体群を分離する方法において、

- 請求項 6 又は 7 に記載のクラス I の M H C 類似体とペプチドの複合体が上に固定されている磁球とポリクローナル個体群を、前記複合体とこの複合体に対する親和力をもつ T リンパ球のレセプタとの間の相互作用を可能にする条件下で接触させる段階、

- 固定された個体群を回収する段階  
を含んで成り、望ましい場合には選別作業が繰返され及び / 又は場合によってはその後、

- 選択された個体群を *in vitro* で増幅させる段階、  
が続いていることを特徴とする方法。

【請求項 1 2】 選択されかつ場合によっては増幅されたリンパ球個体群において、請求項 6 又は 7 に記載の多量体との複合体のペプチドに対し反応性をもつ T リンパ球で独占的に構成されていることを特徴とするリンパ球個体群。

【請求項 1 3】 薬学的に不活性なビヒクルと結びつけた形で請求項 1 2 に記載のリンパ球個体群から作製されることを特徴とする、特に免疫療法において適用可能である薬学組成物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【産業上の利用分野】**

本発明は、HLAという背景において提示されるペプチドに特異的なCD8 + Tリンパ球個体群の検出及び精製手段を提供する。

**【0002】****【従来の技術】**

Tリンパ球は、TCRと呼ばれる、このリンパ球が対抗する抗原に特異的なレセプタを支持している。このTCRは、複数の鎖で構成され、そのうち及び鎖は、HLA分子内で提示された特定の抗原ペプチドに特異的な認識に参与している。この認識は、標的細胞の表面に存在するHLA - ペプチド複合体に対し一定の親和力をもって固定されるTリンパ球の / TCRの能力により示される。相互的に、可溶性HLA - ペプチド複合体は、考慮対象のHLA - ペプチド複合体に特異的なTリンパ球の表面に存在するTCRに固定される能力をもつ。

**【0003】**

現在、分子的に最も良く研究されている系は、クラスIの主要組織適合性複合体(MHC)の分子の中及び対立遺伝子HLA - A0201の中で提示された抗原ペプチドのCD8 + Tリンパ球による認識である。

**【0004】**

この系では、HLA - ペプチド複合体に対するTCRの親和力は、その抗原に対する抗体の親和力に比べきわめて低いことが立証されている。このような理由で、ペプチドを含んだ標識づけされた可溶性HLA - A0201分子を用いたこのHLAという背景内で、特異的ペプチドに対する反応性をもつTCRキャリア(TCRを支持した)リンパ球を検出することは不可能である。この低い親和力を補正するため、Altman et al (1)は、HLAの重鎖がビオチニル化されかくしてストレプトアビジンとの4量体会合が可能となっているHLA - A0201 - ペプチド複合体で構成された多価の試薬を製造した。このHLA - ペプチド4量体は、適切なTCRキャリアTリンパ球について増大された結合力を呈し、従って反応性個体群を免疫蛍光により視覚化させるために使用され得る。

## 【0005】

しかしながら、TCRはHLA-ペプチド複合体と相互作用できるTリンパ球の唯一の分子ではない。実際、生理学的認識の際には、CMH-ペプチド複合体に対するTCRの固定は、クラスIのMHC分子の定常部分に対するコレセプタCD8の固定によって補強される。相互作用におけるCD8の参加は、リンパ球クローン毎に変動し、或る種の場合には、一定の与えられたHLA-ペプチド複合体に対する固定能力のきわめて大幅な増大を導く可能性がある。クラスIのHLAに固定されるこのCD8の能力は、結果として、HLA-ペプチド複合体の非特異的TCRを支持する(carry)CD8+ Tリンパ球上のクラスIのHLA 4量体の固定の暗騒音をひき起こす。この暗騒音は、使用される4量体の濃度と共に増大し、免疫蛍光の偽陽性を導く可能性がある。この非特異的標識付けを減少させようとして、大部分の研究班は、抗CD8抗体の存在下でクラスIのHLA 4量体を用いてそれらの標識付けを実施している。ただし、或る種の抗CD8抗体のみが有効であり、抗体と4量体の間の濃度の最適な比率を各テストで再調整する必要がある。これらの欠点のため、非特異的個体群内でわずかな割合(例えば約0.1~1%)しか占めていない特異的下位個体群の検出は、困難なものとなる。

## 【0006】

なお、HLA 4量体のもう1つの潜在的応用分野が考慮されてきた。それは、in vitroでの拡張そして次に抗ウイルス又は抗腫瘍受動免疫プロトコルにおける治療向け使用を目的として一定の与えられたHLA-ペプチド複合体に対して反応性をもつリンパ球個体群を選別(フローサイトメトリー又は免疫磁気選別)により分離することから成る。しかし、CD8の参与に起因する4量体の固定暗騒音は、選択するHLA-ペプチド複合体に対し反応性をもたないTリンパ球の往々にして大きな画分の分離を導くことから、この応用分野に対する重大な障害を構成しうる。

## 【0007】

Salter et al(2)は、コレセプタCD8 に形質移入された細胞により発現された膜HLAの固定が、HLAが 3ドメイン内に1つの突然変異を有して

いる場合に改変されるということを示した。

【0008】

本発明者らによるかかる突然変異の研究から、本発明者らは、突然変異を受けた可溶性の4量体が実際に、Tリンパ球の表面でTCRに結びつけられているかいないかに関わらず、又 であるか であるかに関わらず、CD8を固定することの少ないものであるということを確認するに至り、このことは、暗騒音の減少という形で現われている。

【0009】

このとき、突然変異の結果としての親和力の喪失が、或る種のCD8依存性Tリンパ球クローンに制限された又は完全な特異的信号の喪失を導くことを予想するところがあった。この点でSalter et alの記事は、或る種のCD8依存性同種異系反応性クローンが、突然変異を受けたHLA-A2を支持する細胞に対するその細胞毒性を失ない、一方その他のクローンはほとんど影響を受けない、ということを示している。

【0010】

かくして、突然変異を受けた4量体がポリクローナル個体群の内部で(最もCD8依存性の低い)反応性細胞の1画分しか検出しないことが可能であったはずである。

【0011】

抗CD8抗体での2重標識付けで本発明者らが実施した突然変異を受けた及び未変性(native)の4量体を用いたポリクローナル個体群の数多くの比較用標識付けにより、反対に予想外にも、突然変異を受けた4量体が未変性4量体と同じ百分率の特異的細胞を認識することが明らかにされている。

【0012】

その上、CD8依存性のきわめて高いクローン及びCD8依存性のほとんどないクローン上の突然変異を受けた4量体での標識付けの比較は、TCRの発現強度と関係づけた4量体の比較可能な固定効力を示している。

【0013】

従って、突然変異はCD8単独に対する4量体の固定をきわめて大幅に減少さ

せるものの、TCR - CD8複合体に対するその固定にははるかに少ない影響しか及ぼさないと思われる。

【0014】

【発明の開示】

従って、本発明は、突然変異又はさらに一般的には改変を受けたHLA多量体において明らかにされた特性を利用することにより、新規製品としてかかる多量体及びその抗原ペプチドとの複合体を提供する。

【0015】

本発明は同様に、ペプチド特異的CD8 + Tリンパ球個体群の検出及び/又は分離のためのこれらの分子の使用をも提供する。

【0016】

さらに本発明は、特に診断及び治療での適用のために、ペプチドを含んだ(charged with)かかる分子を用いてかかる個体群を検出し及び/又は分離する方法を提供する。

【0017】

本発明による多量体は、クラスIのMHCに類似した組換え型タンパク質から作製され、該タンパク質は、CD8と重鎖の間の相互作用の親和力の減少を、ひいては抑制までもを導く少なくとも1つの改変を、Tリンパ球のコレセプタCD8とクラスIのMHC重鎖の相互作用ゾーン内に有していることを特徴とする。

【0018】

相互作用ゾーンの改変は、より特定的には、重鎖の3ドメインに関する。

【0019】

特に問題となっているのは、前記コレセプタCD8に固定される能力をもつ未変性重鎖の対応するドメインとの関係における少なくとも1つのアミノ酸の3ドメイン内の突然変異である。

【0020】

例えば、HLA-A2分子の3ドメインの位置245におけるバリン残基へのアラニン残基の突然変異が挙げられる。

## 【0021】

改変は同様に、少なくとも1つのアミノ酸の化学的修飾及び/又は少なくとも1つのアミノ酸の欠失から成るものであってよく、この又はこれらのタイプの改変は場合によって、単数又は複数の突然変異に追加される。

## 【0022】

本発明、また、新しい生成物として、上述の多量体及び抗原ペプチドから作製された複合体をも提供する。

## 【0023】

これらの複合体においては、多量体は特に4量体の形を呈する。

## 【0024】

本発明によると、これらの複合体は、複合体の抗原ペプチドを特異的に認識するCD8<sup>+</sup> Tリンパ球個体群の検出及び/又は分離のために使用される。

## 【0025】

上述の複合体の使用により、特異的標識づけ (marking) を改変することなく非特異的な固定 (binding) の暗騒音 (バックグラウンドノイズ) をきわめて大幅に削減することができ、さらに、免疫蛍光分析の際に抗CD8抗体と一緒に使用する必要性を無くすることができる。

## 【0026】

好ましい使用においては、前記複合体は、免疫磁気選別といったような細胞選別 (screening) 方法において使用される。

## 【0027】

マウスにおける特異的Tリンパ球を分離するために免疫磁気選別技術についてはLuxembourg et al, (5) によって記述される。

## 【0028】

この技術は、MHC - ペプチド複合体 (ペプチドを含んだ化学的にビオチニル化された、ショウジョウバエ属系で産生された複合体) で被覆された球系に基づくものである。

## 【0029】

本発明は、また、ポリクローナル個体群からペプチド特異的CD8<sup>+</sup> Tリン

パ球個体群を検出し分離する方法をも提供する。この検出方法は、

- 改変されたクラス I の MHC / ペプチドの複合体と、この複合体に対する親和力をもつ T リンパ球レセプタとの間の相互作用を可能にする条件下で、上述のような抗原ペプチドと複合体形成された多量体とポリクローナル個体群とを接触させる段階、
- 前記複合体に固定された (bound to) リンパ球個体群を顕示する段階、  
を含んで成ることを特徴とする。

#### 【0030】

この顕示 (visualization) は、例えば、蛍光化合物を含む多量体を使用することによって蛍光によって実施される。

#### 【0031】

ポリクローナル個体群からペプチド特異的リンパ球個体群を分離する方法も又、本発明の枠内に入り、場合によっては、上述の検出段階の後に実施可能である。

#### 【0032】

この方法は、免疫磁気選別の技術を使用し、

- 上述のようなクラス I の MHC 類似体とペプチドの複合体が上に固定されている磁球とポリクローナル個体群を、前記複合体とこの複合体に対する親和力をもつ T リンパ球のレセプタとの間の相互作用を可能にする条件下で接触させる段階、
- 固定された個体群を回収する段階、  
を含んで成り、望ましい場合には選別作業が繰返され及び / 又は場合によってその後、
- 選択された個体群を in vitro で増幅させる段階、  
が続いていることを特徴とする。

#### 【0033】

上述のような改変された多量体での特異的標識付けと暗騒音の間の差異の増大により、ポリクローナル個体群の内部での特異的リンパ球個体群のより優れた弁別 (discrimination) が可能となり、かくしてこれらの多量体での免疫磁気選別

が非常に効果的なものになる。

【0034】

MHC分子は例えば、重鎖上に酵素によるビオチニル化パターンを含む。複合体が上に固定される球は、ストレプトアビジンにカップリングされる。

【0035】

ポリクローナル個体群は、滑液又は末梢血の単核細胞といったような患者から採取した標本に由来する。

【0036】

選択された個体群の増幅段階は、有利には、増幅された個体群の代表性に影響を及ぼさない条件下でのポリクローナル刺激によって実施される。例えば、照射されたPHA, IL2又はPBLが使用される。

【0037】

本発明は、また、選択されたそして場合によっては増幅されたTリンパ球個体群において一定の与えられた複合体のペプチドに対し反応性をもつTリンパ球のみで構成されていることを特徴とするTリンパ球個体群をも提供する。

【0038】

かかるペプチド特異的な個体群は、治療において、そしてより特定的には養子免疫療法に従ったその再投与に基づく応用分野のために、きわめて有利なものである。

【0039】

従って、本発明は、薬学的ビヒクルと結びつけた形で上述のようなペプチド特異的Tリンパ球個体群から作製されることを特徴とする薬学組成物を提供する。

【0040】

かかる組成物は有利には注射により投与可能である。

【0041】

かくして、それぞれ規定のウイルス又は腫瘍ペプチドとクラスIのMHCの複合体を認識するTリンパ球の注射後に抗ウイルス又は抗腫瘍免疫性を回復させるか又は、免疫応答の活性化又は阻害特性を呈し一定の与えられた抗原に向けられたT細胞の投与により免疫不均衡（例えば自己免疫のケース）を補正することが

可能である。

【0042】

本発明のその他の特徴及び利点は、添付図面の図1～7を参照する、純粹に例示を目的として示された以下の実施例の中で記されている。

【0043】

【発明の実施の形態】

実施例1： コレセプタCD8との相互作用ゾーン内で突然変異を受けた4量体HLA-A0201の製造。

酵素によるピオチニル化パターンについてコードする1配列だけ延長されたHLA0201の重鎖についてコードするcDNAを含有する細菌発現プラスミドを使用した(Altman et al(1)に従った構成体)。3ドメインについてコードするゾーンを、配列番号1；

5' CCTTCCAGAAGTGGGTGGCTGTGGTGGTGCC3'

及び配列番号2；

5' GGCACCCACCCACAGCCACCCACTTCTGGAAGG3'

の特異的プライマで増幅した。

【0044】

増幅フラグメントの中に、StratageneのQuickchange Site-directed Mutagenesis Rキットを使用して、アラニンコドンバリコドンに形質転換するための塩基の突然変異を導入した。

【0045】

突然変異を受けたフラグメントを発現プラスミド内に再導入し、突然変異の存在を配列決定によって制御した。

【0046】

突然変異を受けた重鎖HLA-A0201を細菌封入体の形で産生し、まずペプチドを含んだHLA単量体そして次に対応する突然変異を受けた4量体をGarboczi et al(3)によって以前に記述された復元プロトコルに従って獲得することができた。

【0047】

実施例2：未変性HLA-A0201 4量体と異なるペプチドを含んだ突然変異を受けた4量体HLA-A0201との間の免疫蛍光標識付けの特異性及び効率の比較研究

a) リンパ球クローンの標識付け

未変性4量体HLA-A0201と突然変異を受けた対応する4量体に、EBVのウイルスのBMLF1タンパク質に由来するペプチドか又はCMVのタンパク質pp65に由来するペプチドを含ませた。

【0048】

実施例1の技術に従って、ただし突然変異無しで、未変性4量体を得る。

【0049】

特異的及び非特異的クローンを標識付けし、増大する濃度で使用した。

【0050】

図1は、未変性HLA-A2/BMLF1 4量体(図1A)及び対応する突然変異を受けた4量体(図1B)で得られた蛍光強度(MFI)平均を示す。

【0051】

未変性4量体HLA-A2/BMは、使用される4量体用量と共に増大する非特異的な或る種のクローン上の固定暗騒音を示す、ということがわかる。

【0052】

この暗騒音は、同じく制限されている抗メラノ-AクローンHLA-A0201が穏やかな暗騒音を示すのに2つの制限された抗IE1クローンHLA-A0201が強い暗騒音を示すことから考慮対象のクローンのHLA制限のみに関係するのではなく、含まれるペプチドにも左右されると思われる。

【0053】

突然変異を受けた4量体の場合、特異的クローン(BM/A2)について得られる蛍光平均(MFI)は、未変性4量体で得られるものよりも低い、非特異的クローン上の暗騒音は、使用される4量体の濃度の如何に関わらずほぼゼロである。

【0054】

未変性4量体と突然変異を受けた4量体の間のこの暗騒音の差は、4量体HL

A - A 2 / p p 5 5 でも見られることから、4 量体 A 2 / B M に特定のなものではないことがわかるだろう。

#### 【0055】

図2では、蛍光平均は、突然変異を受けた4量体で得られるわずかな標識付けの暗騒音を視覚化する目的で対数目盛で表示されている。ここで特異的標識付けと非特異的標識付けの間の差異が突然変異を受けた4量体 A 2 / p p 6 5 では約  $2 \log(10^2)$  であったのに対し、未変性4量体では  $1 \log$  にすぎないということがわかる。顕著な2つの例外は、未変性4量体で暗騒音がきわめて低い2つの抗EBVクローンCD4である。この観察事実は、未変性4量体で得られる標識付け暗騒音がCD8に対する4量体の一定の百分率の非特異的固定に起因するものであるとする仮説を強化している。

#### 【0056】

図3では、特異的クローン上での p p 6 5 を含んだ未変性4量体及び突然変異を受けた4量体で得られた標識付けの差が表わされている。突然変異を受けた4量体及び未変性4量体で得られた飽和曲線間の差は、これらのクローン上では突然変異を受けた4量体の場合に比べさらに多数の固定部位が未変性4量体について存在することを示している。従って、未変性4量体の場合、この分子がTリンパ球の表面でTCRの密度をはるかに上回る密度で発現されることからなおさら、一定の原子価が単独のCD8と相互作用する確率がきわめて高い。

#### 【0057】

突然変異を受けた4量体での特異的標識付けが特異的クローンのCD8依存度により有意に (significantly) 影響されたか否かをテストするため、その他の実験が実施された。実際、CD8 + Tクローンのうち、いくつかのクローンが、そのTCRとHLA A - ペプチド複合体との間の特異的相互作用を強化するためCD8を強く必要としており、一方その他のクローンにはその必要が無いということは周知の事実である。

#### 【0058】

CD8依存度は、抗CD8抗体を伴う又は伴わない Couedel et al (4) の細胞毒性試験に従って見積られ、HLA - ペプチド複合体に対するTCRの親和力

に反比例するものとみなされる。

【0059】

図4Aには、2つの特異的クローンをもったペプチドBMLF1(10 $\mu$ M)を含んだHLA-A0201系統に対する細胞毒性試験が表わされている。クローンA2.10は、その細胞毒性が抗CD8抗体により撤廃されていることから、CD8依存性が非常に高く、一方クローンA4,5は比較的CD8依存性が低い。

【0060】

表面で発現されたTCRの数を推定するため、突然変異を受けた4量体での標識付け及び抗CD3抗体での標識付けを実施した。結果は、図4B(CD3標識付け)及び4C(突然変異を受けた4量体BMLF1/A2の標識付け)に示されている。

【0061】

4量体標識付けとCD3標識付けの比率が2つのクローンについてきわめて似通っていることがわかり、このことはすなわち、突然変異を受けた4量体での標識付けがCD8依存度(ひいては演繹してTCRの親和力)による影響をほとんど受けないということを表わしている。

【0062】

かくして、HLA分子の突然変異によって誘発されるCD8に対する親和力の減少は、4量体の特異的標識付けに有意に影響を及ぼさない。

【0063】

b) ポリクローナル個体群の内部での特異的細胞の検出

ポリクローナル個体群の内部での低い百分率の特異的細胞についての未変性4量体及び突然変異を受けた4量体の検出能力を比較するため、(以下A及びBと呼ぶ)2人のHLA-A0201患者の末梢リンパ球を標識付けした。ここで問題となっているのは、予めその体内でCMVの抗pp65ペプチド応答が立証されている患者である。これらのリンパ球は予めin vitroでポリクローナル増幅させられ凍結されていた。

【0064】

患者A及びBについて得られた結果は、図5に報告されており、図5Aは患者Aに対応し図5Bは患者Bに対応している。これは、 $20\mu\text{g/ml}$ のフィコエリトリンでの4量体HLA-A0201/pp65の単純標識付け及び対応する2重標識付け(PEで標識付けされた4量体及びFITCで標識付けされた抗CD8抗体)の結果である。この図は同様に、蛍光強度平均(log)をも示している。

#### 【0065】

まず第1に、単純標識付けにおける未変性4量体の弁別能力は、出発個体群の中の特異的細胞の百分率に応じて変動可能である。実際、患者Aについては、5.60%を占める陽性細胞のピークは容易に識別可能であるが、一方患者Bについては、このピークは非特異的標識付けにより汚染され、陽性細胞の百分率の決定を困難にしている。文献と合致して、未変性4量体及び抗CD8の2重標識付けは、暗騒音を減少させ、このとき陽性下位個体群を明確に識別しその百分率を精確に推定すること(このケースでは0.84%)を可能にする。従ってこうして、未変性4量体での陽性細胞の百分率の精確な推定が抗-CD8までの2重標識付けの使用を暗に意味していることが明らかになる。

#### 【0066】

これに対して、突然変異を受けた4量体での単純標識付けは、2人の患者において陽性細胞のピークを明確に識別できるようにする。得られた陽性細胞百分率は、未変性4量体での2重標識付けにおいて得られたものとほぼ同一である。このことは、未変性4量体による検出が可能な全ての特異的細胞が、突然変異を受けた4量体でも検出可能であることを証明しており、従って、CD8依存性のきわめて高い及び非常に低いクローンで得られた結果すなわち突然変異が特異的認識に有意に影響を及ぼさないことに確証を与えている。

#### 【0067】

その上、これらの結果は、突然変異を受けた4量体を用いた2重標識付けが単純標識付けと比べて新しいデータをもたらさないということを示している。最後に、未変性4量体(患者A及びBについて216及び193)を用いた2重標識付けの際に抗CD8抗体で得られた蛍光平均が突然変異を受けた4量体(患者A

及びBについて366及び370)での2重標識付けで得られたものよりも著しく低いということを指摘することができる。抗-CD8を用いた全個体群の単純標識付けの後に得られる蛍光平均は、それぞれ患者A及びBについて340及び355であった。これにより、抗CD8抗体と未変性4量体の間の固定競合が明らかになり、この競合は突然変異を受けた4量体の場合には発生しないものである。

#### 【0068】

従って、突然変異を受けた4量体の使用によって、ポリクローナル個体群の内部での特異的細胞の百分率を推定するために抗CD8での2重標識付け無しですますことが可能となる。

#### 【0069】

実施例3：未変性4量体 HLA-A0201及びペプチド p65を含んだ突然変異を受けた4量体 HLA-A0201で実施された免疫磁気選別の特異性及び効率の比較研究

ビオチニル化されペプチド p p 65を含んだ単量体 HLA-A0201をストレプトアビジン (Dynabeads M-280 Streptanidin, DYNAL) にカップリングされた磁球上に固定した。該研究において使用されたリンパ球個体群は、リウマチ様多発関節炎を患う患者の滑液又はPBL, 又はCMVに対する血清陽性の健康な供与体に由来するPBLに由来するものである。

#### 【0070】

図6には、これらのポリクローナル個体群についての未変性4量体及び突然変異を受けた4量体を用いた単純標識付けの結果が示されている。突然変異を受けた4量体を用いた場合、未変性4量体ではほとんど識別不可能な陽性細胞である2回の採取における低い百分率の陽性細胞(0.22%及び0.14%)を明らかにすることが可能である。

#### 【0071】

これらの個体群を、未変性4量体又は突然変異を受けた4量体を含んだ球で選別し、その後選択された個体群を、増幅された個体群の代表性に影響を及ぼすことのない刺激であるポリクローナル刺激(照射されたPHA, IL2, PBL)

によってin vitroで増幅した。

【0072】

この時点で、これらの選別され2つの4量体で増幅された個体群について、標識付けを行なった。

【0073】

図6に表わされているように、未変性4量体での選別に由来する細胞はこの同じ4量体で陽性として標識付けされるものの、逆にこれらの細胞のうち突然変異を受けた4量体で陽性であるものの百分率はきわめて低い(0.7%及び2.88%)。

【0074】

結果は、選別された個体群が2つの突然変異を受けた4量体で強い陽性を示すことから、突然変異を受けた4量体での選別後では顕著に異なっている。

【0075】

突然変異を受けた4量体で得られた陽性細胞での富化係数は採取1については421であり(92.64%対0.22%)、採取2については693(97.01%対0.14%)である。

【0076】

これらの結果は、突然変異を受けた4量体を用いて選別を行なうことにより、その個体群が0.1~0.2%を占める標本から90%以上の割合で純粋な1つの陽性個体群を得ることが可能であるということを示している。

【0077】

この観察事実の一般性は、患者及び健康な供与体の滑液リンパ球及びPBLから未変性4量体及び突然変異を受けた4量体で行なわれた選別の結果を記す以下の表によって例示されている。

【表1】

表1：4量体の陽性細胞% (富化係数)

サンプル	選別されて いないもの	以下のものによる1回目の選別		以下のものによる2回目の選別	
		未変性 A2/pp65	突然変異を受けた A2/pp65	未変性 A2/pp65	突然変異を受けた A2/pp65
SFL 1	14.0	95.0 (6.8)			
PBL 1	5.6	89.5 (16.0)	97.9 (17.5)		
SFL 2	1.4	25.3 (18.1)		75.9 (3.0)	
PBL 2	0.8	51.1 (63.9)	97.5 (121.9)		
SFL 3	0.6	13.7 (22.8)			
PBL 3	非検出	8.5 (非検出)		12.0 (1.4)	
SFL 4	0.3	4.1 (13.6)		8.6 (2.1)	
SFL 5	0.2	0.7 (3.5)	92.5 (462.5)		
SFL 6	0.14	2.9 (20.6)	97.1 (693.6)		
PBL 4	0.09		82.9 (921.1)		
PBL 5	0.02	0.04 (2.0)	2.2 (110.0)	98.7 (44.90)	

突然変異を受けた4量体を用いて反復的選別を行なうことにより、なお一層頻度の低い下位個体群(表中のPBL5参照)から純粋な特異的個体群を得ることが可能である。反対に、この結果は、未変性4量体を用いて得ることがはるかに困難なものである。実際、未変性4量体での1回目の選別によって分離された非特異的細胞は、その後の選別の際に新たに選択されるのに十分な親和力をもつと思われる。従って、2回目の選別(PBL3及びSFL4参照)を行なうことにより非常に凡庸な富化係数(concentration factor)にたどりつくことになる。

【0079】

もう1つの研究は、突然変異を受けた4量体A2/pp65を固定するその能力のために選択された細胞が、生理学的状況下で、このHLA-ペプチド複合体に対し充分反応性を有していたことを確認することを目的とする、選別された個体群の反応性に関するものであった。

【0080】

このため、ペプチドpp65を含んだ細胞T<sub>2</sub>(A0201+)の存在下に置いた後、IL2でのレセプタ(CD25)の鎖の表面における誘発によって明らかにされる、選別されたリンパ球個体群の活性化を研究した。

【0081】

図7が示しているように、未変性4量体を用いて選別された個体群は、ペプチドを含んだ細胞T<sub>2</sub>との接触の後CD25を発現しない。

【0082】

反対に、突然変異を受けた4量体で選別された細胞の大部分は、ペプチドpp65を含んだT<sub>2</sub>の存在下で活性化され、CD25での陽性細胞百分率は、突然変異を受けた4量体により標識付けされた細胞の百分率と充分に対応している。(患者1及び2についてそれぞれ活性化された細胞の90.63%対標識付けされた細胞92.64%及び97.20%対97.01%)。

【0083】

これらの結果は、突然変異を受けた4量体で標識付けされ選別された細胞が排他的(独占的)に反応性細胞であり、一方未変性4量体で選別された細胞が非反応性であることを明らかにしている。

## 【0084】

この個体群の中にいくつかの陽性細胞が識別できたにも拘わらず未変性4量体での選別後は反応性細胞が全くみあたらないという事実は、おそらく機能的試験において検出するにはあまりにも低すぎるこれらの細胞の百分率のせいであると思われる。

## 【0085】

これらの結果全体は、出発個体群の中での代表性が低い個体群を免疫磁気選別により選択するためには、未変性4量体に比べ突然変異を受けた4量体の方が明らかに優れていることを立証している。

## 【0086】

出発採取の中で特異的個体群の数がさらに多い場合には、未変性4量体で反応性細胞を分離することが可能となるが、得られる個体群の純度は、突然変異を受けた4量体と並行して得られたものよりもきわめて低いものである(表)。

## 【参考文献】

- 1) Altman J.D. et al, 1996, Science 274: 94-6 及び 米国特許第5,635,363号.
- 2) Salter R.D. et al, 1990, Nature 345: 41-46
- 3) Garboczi D.N. et al, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 3429-33.
- 4) Couedel, C., M. et al, 1999, J. Immunol 162-6351-8.
- 5) Luxembourg A.T. et al, Nature Biotechnology, 第16巻 1998年3月、281-285

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

BMLF1に由来するペプチドを含んだ4量体についての、未変性4量体(1A, 2A)及び対応する突然変異を受けた4量体(1B, 2B)の濃度に応じた蛍光強度(平均)を表わす。

## 【図2】

pp65に由来するペプチドを含んだ4量体についての、未変性4量体(1A

、2 A) 及び対応する突然変異を受けた4量体(1 B, 2 B)の濃度に応じた蛍光強度(平均)を表わす。

【図3】

特異的クローンを用いた、未変性4量体と突然変異を受けた4量体濃度に応じた蛍光強度平均を示す。

【図4】

図4 Aは、ペプチドBMLF1を含んだB系統HLA-A0201の2つの特異的クローンの抗CD8抗体を伴う又は伴わない溶解百分率を表わし、図4 B及び4 Cは、これらのクローンの標識付けの結果を表わす。

【図5】

2人の患者のリンパ球を用いた、未変性4量体及び突然変異を受けた4量体の単純(フィコエリトリン、PEでの)標識付け及び2重(PE及び標識付け済み抗CD8抗体)標識付けの結果を表わす。

【図6】

未変性4量体及び突然変異を受けた4量体を用いて実施された免疫磁気選別の結果を示す。

【図7】

未変性4量体及び突然変異を受けた4量体を用いて実施された免疫磁気選別の結果を示す。

【図1】

Figure 1A

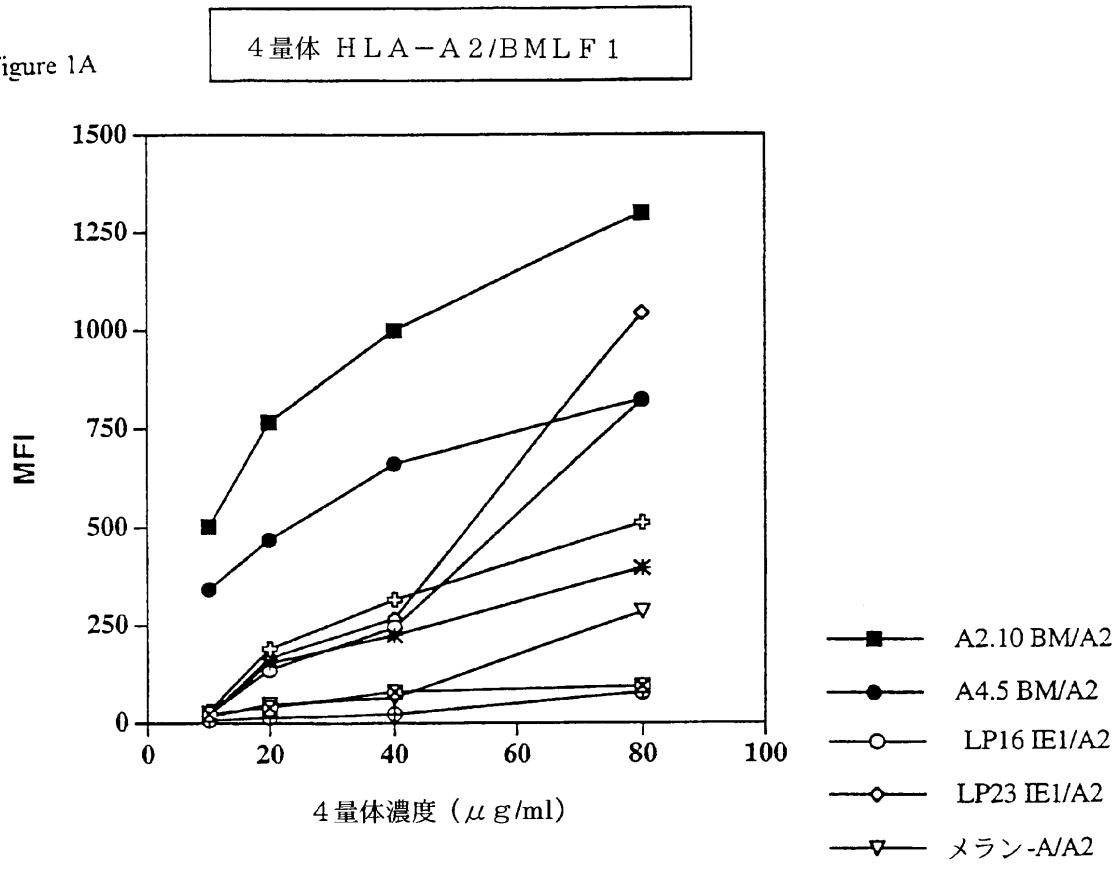
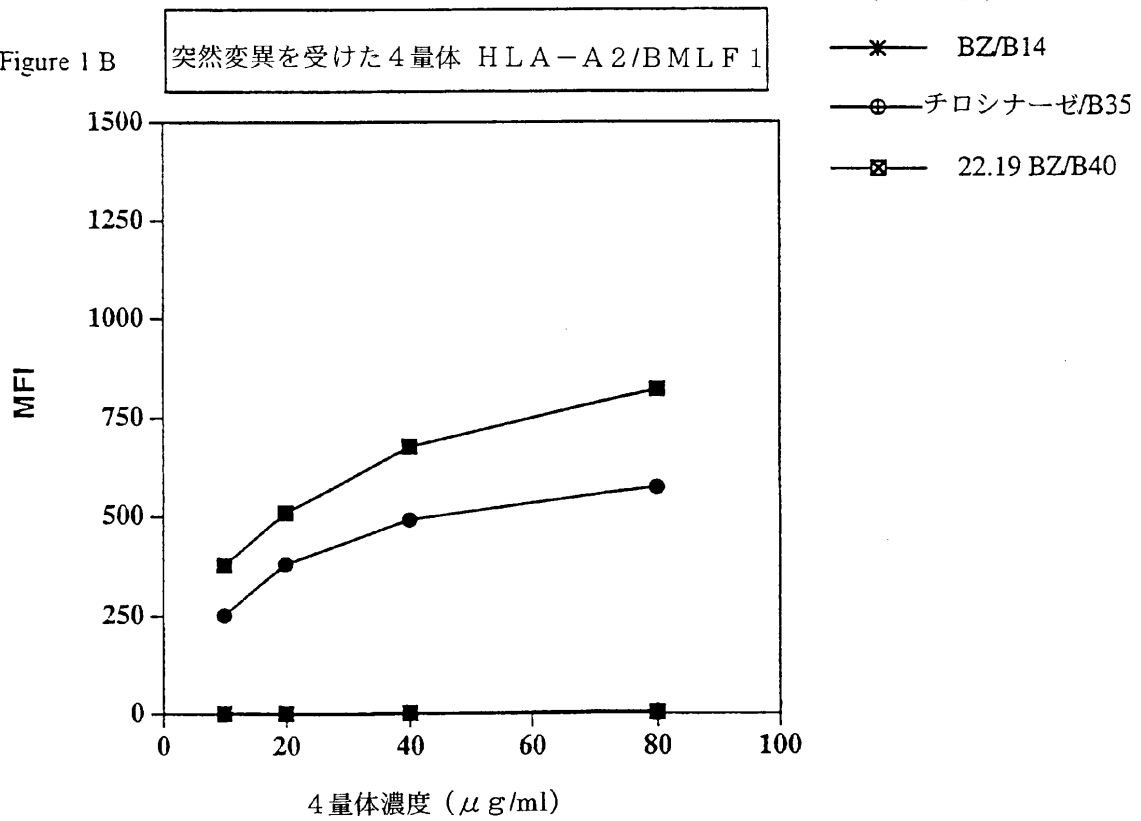


Figure 1B



【図2】

4量体HLA-A2/pp65

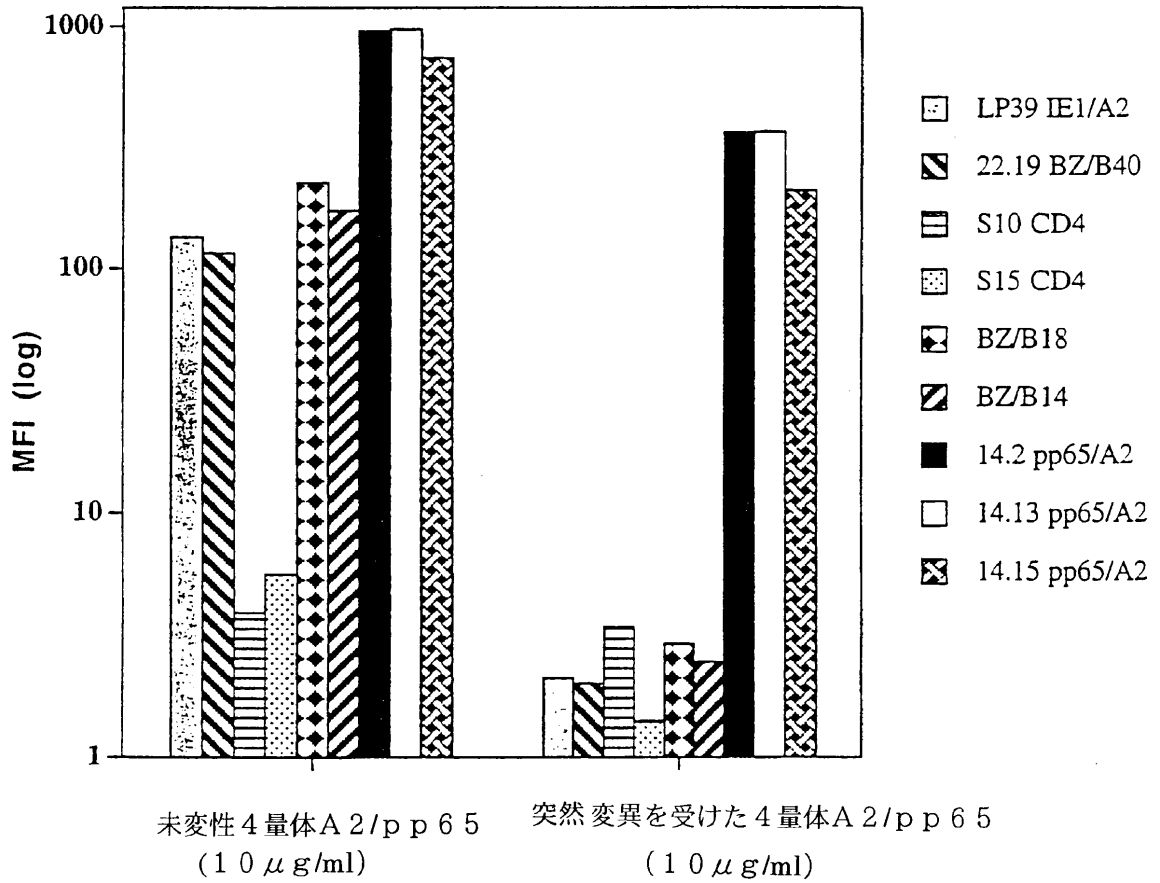
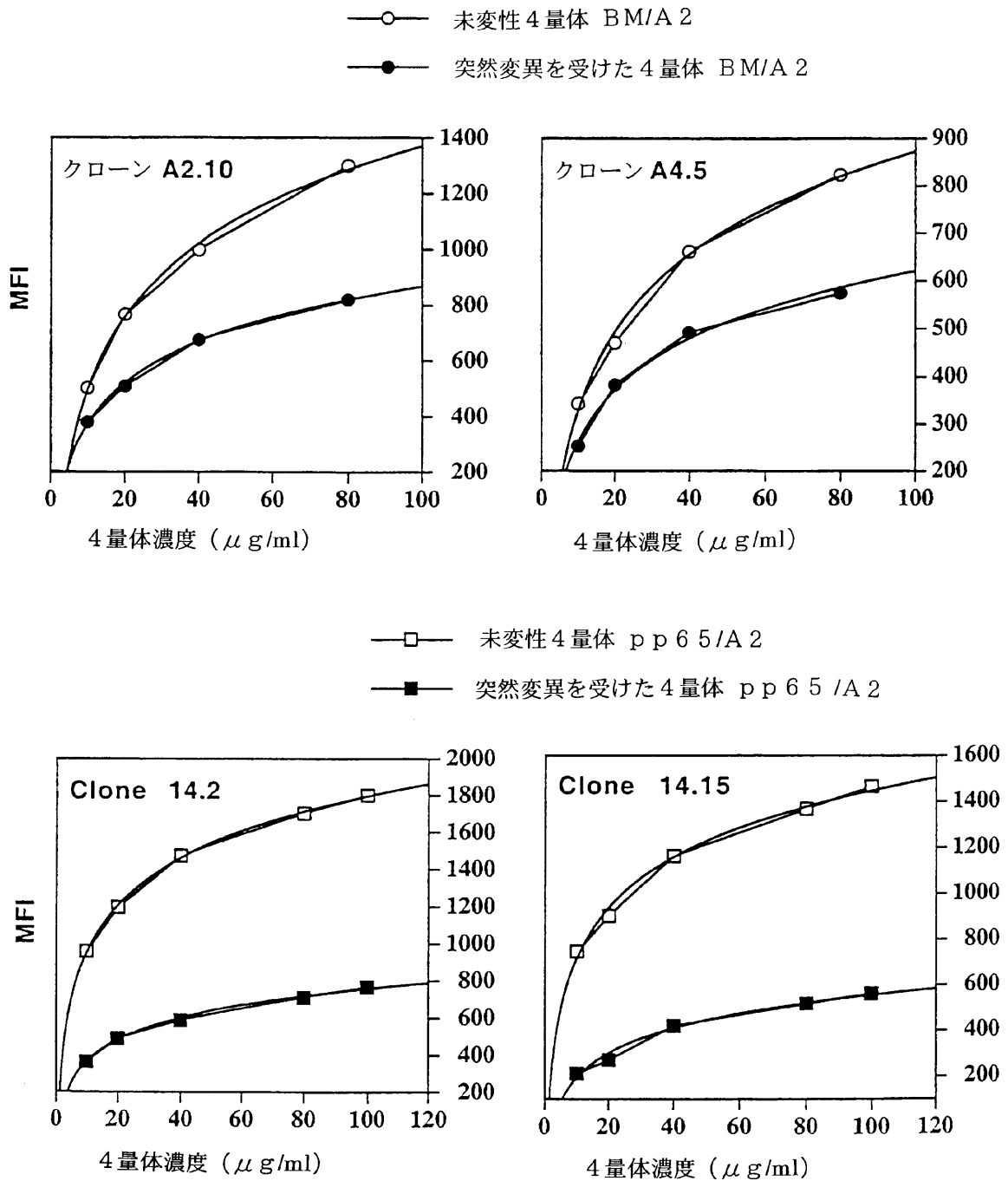


Figure 2A

Figure 2B

【図3】



【図4】

FIGURE 4A

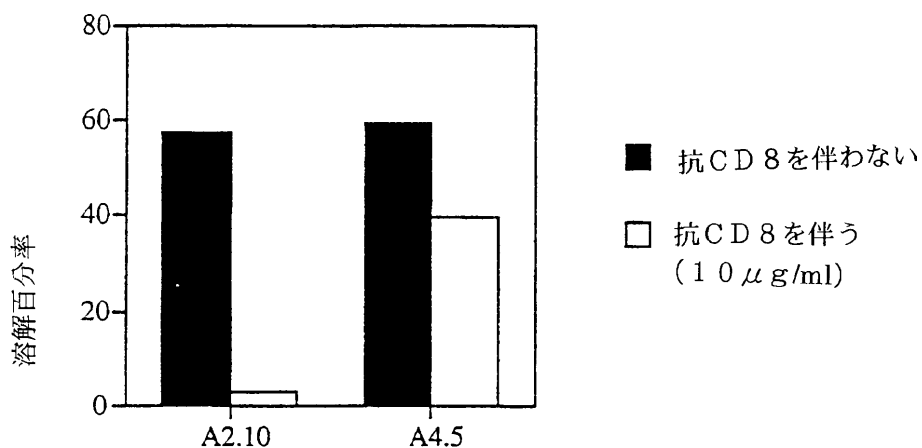


FIGURE 4B

標識付けCD3

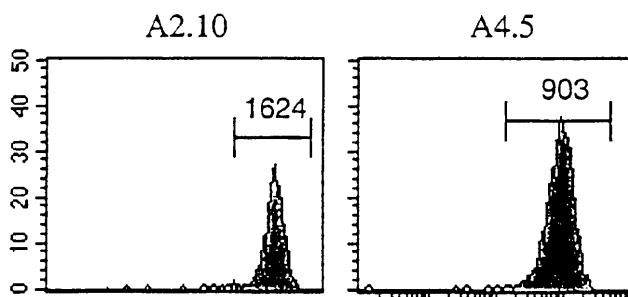
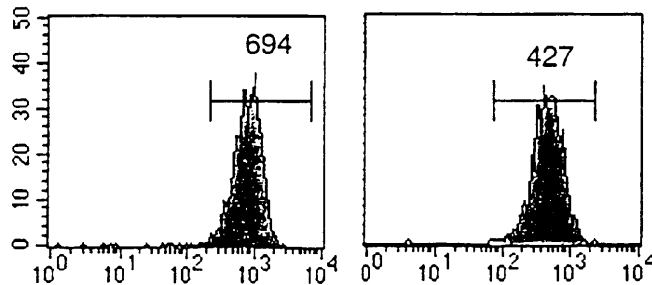


FIGURE 4C

標識付け, 突然変異を受けた4量体 B m 1 f 1/A 2

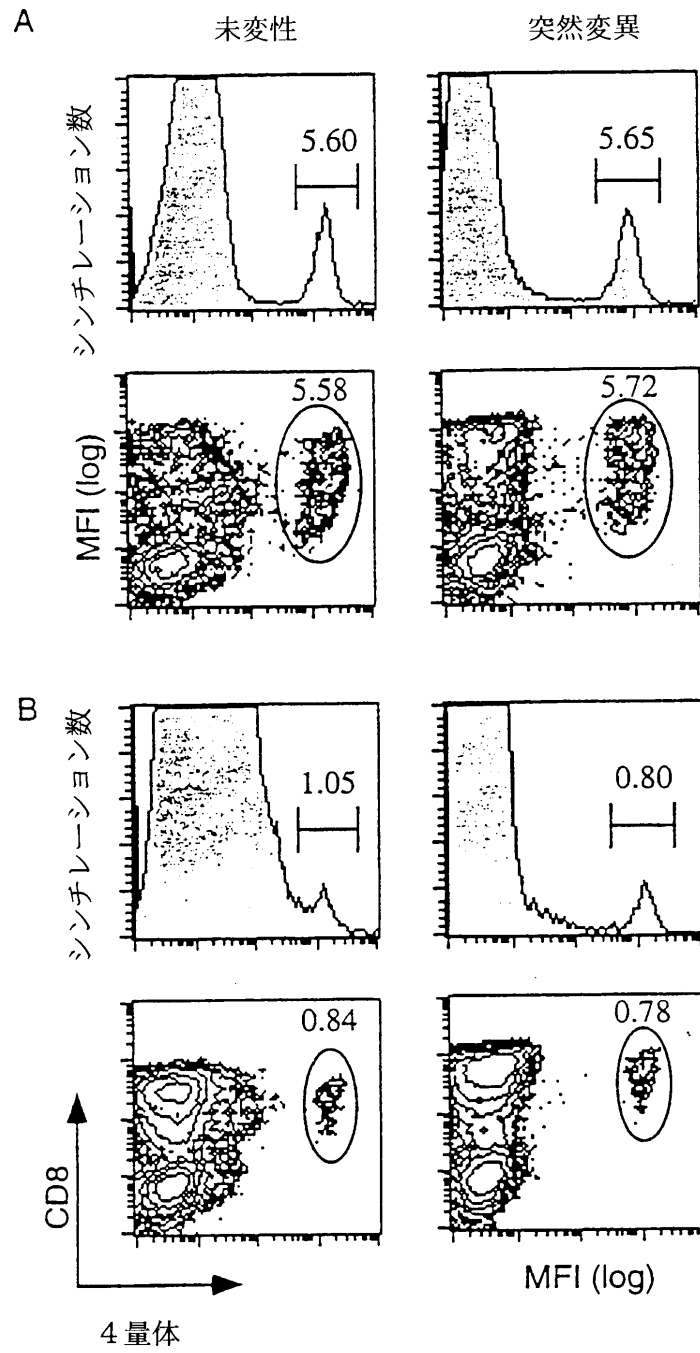


MFI (突然変異を受けた4量体) と MFI (CD) の比率

A2.10: 0,43

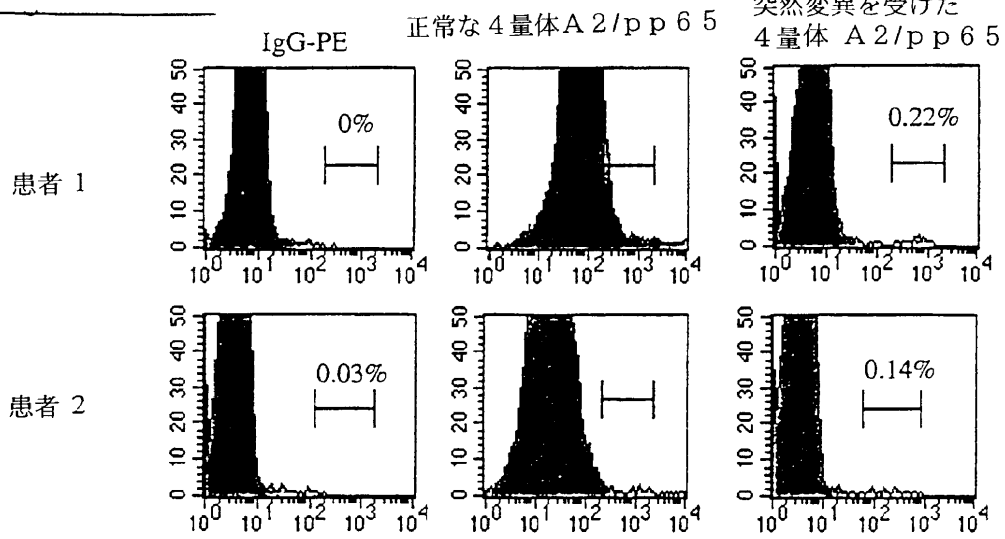
A4.5: 0,47

【図5】

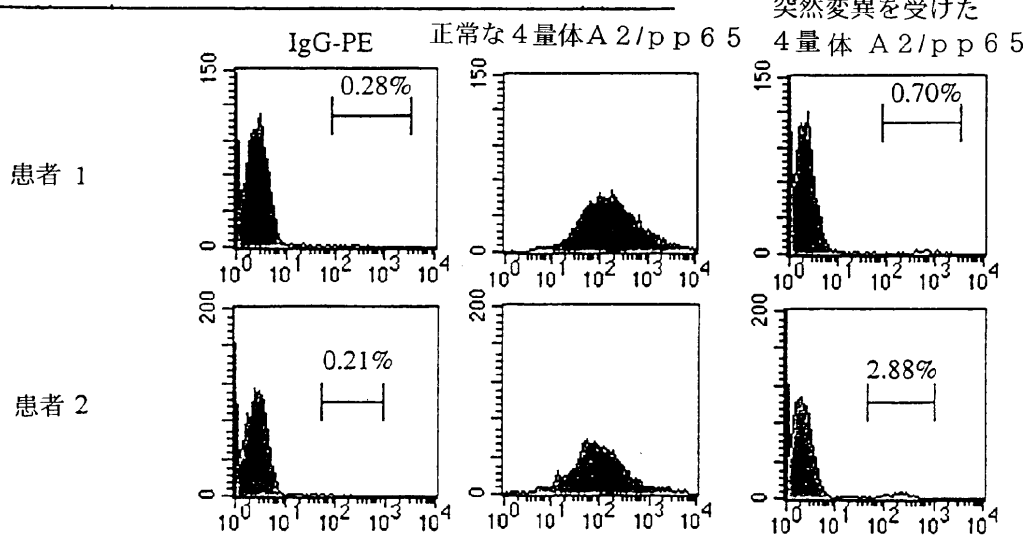


【図6】

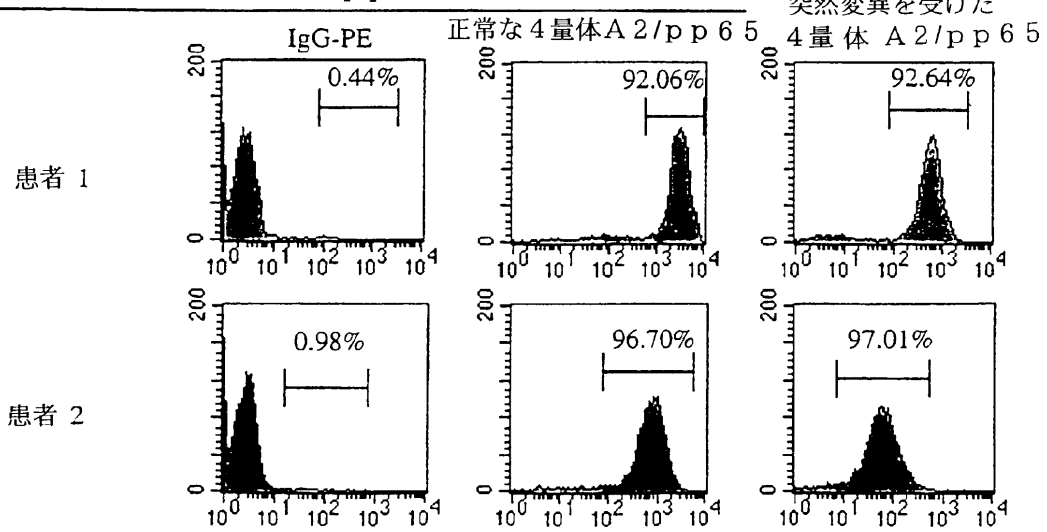
選別前の標識付け



正常な4量体 A2/pp65での選別後の標識付け

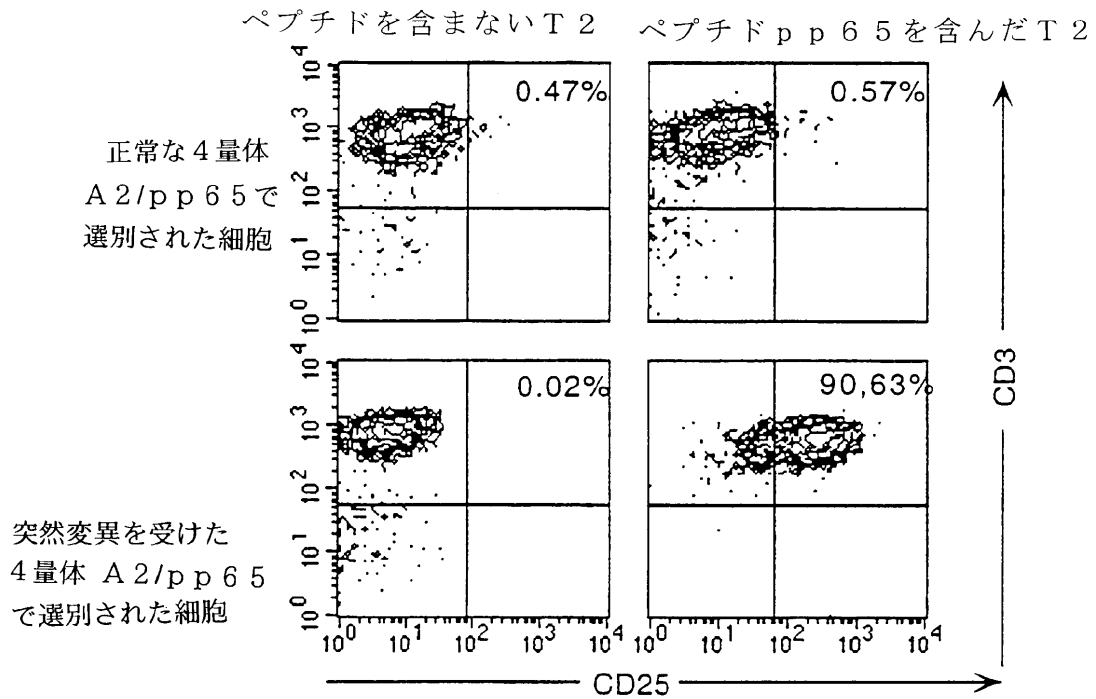


突然変異を受けた4量体 A2/pp65での選別後の標識付け

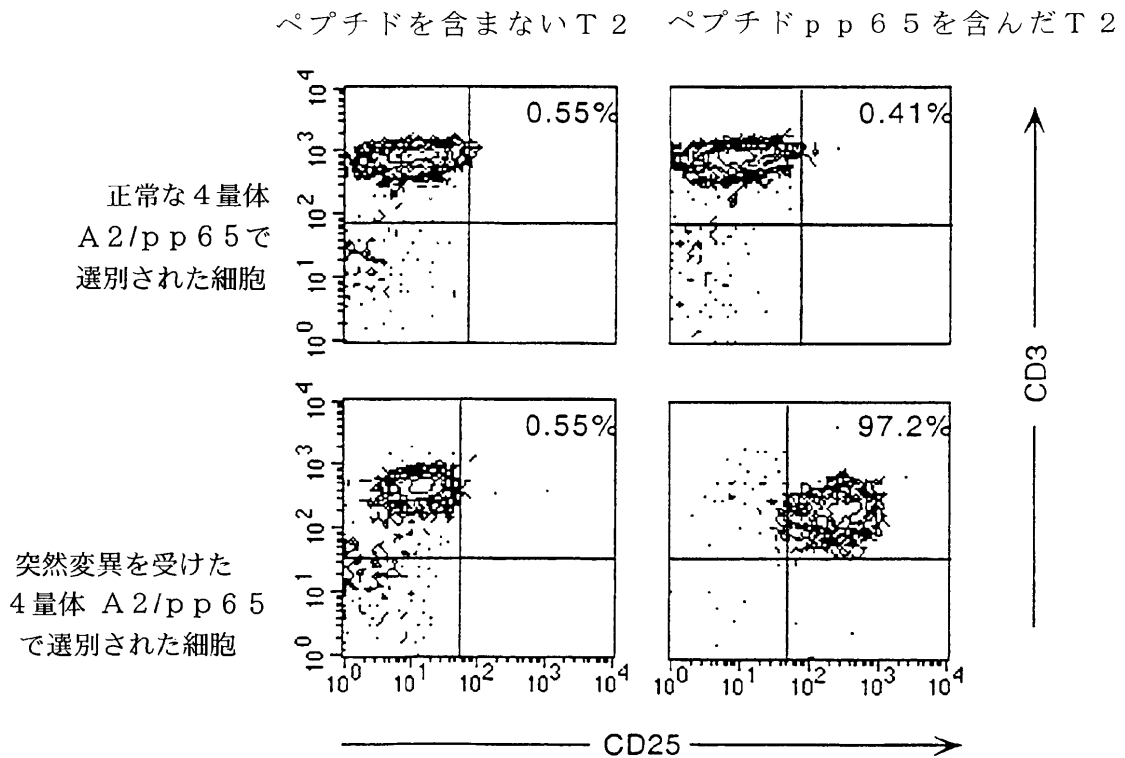


【図7】

患者 1



患者 2



## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/FR 00/02443
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 G01N33/68 C12N5/08		
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 G01N C12N		
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, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 11775 A (GEN HOSPITAL CORP ; HARVARD COLLEGE (US); GARBOCZI DAVID N (US); WA) 11 March 1999 (1999-03-11) page 24, line 4 - line 20; claims; examples	1,8, 10-13
A	WO 97 44667 A (INST NAT SANTE RECH MED ; LANGLADE DEMOYEN PIERRE (FR); LONE YU CHU) 27 November 1997 (1997-11-27) claims; examples	1,8, 10-13
A	WO 96 26962 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 6 September 1996 (1996-09-06) cited in the application claims; examples	1,8, 10-13
	--- -/-	
<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.
<sup>a</sup> Special categories of cited documents:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</li> <li>*E* earlier document but published on or after the international filing date</li> <li>*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)</li> <li>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</li> <li>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>*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</li> <li>*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</li> <li>*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.</li> <li>*Z* document member of the same patent family</li> </ul>
Date of the actual completion of the international search  6 December 2000		Date of mailing of the international search report  13/12/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Fuhr, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 00/02443
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	R.D. SALTER ET AL.: "A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha3 domain of HLA-A2" NATURE, vol. 345, 3 May 1990 (1990-05-03), pages 41-46, XP002137488 LONDON GB cited in the application page 44, right-hand column, paragraph 3 -page 46, right-hand column, last paragraph; figure 1	1,8

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911775 A	11-03-1999	EP 1017799 A	12-07-2000
WO 9744667 A	27-11-1997	AU 3036597 A	09-12-1997
WO 9626962 A	06-09-1996	US 5635363 A	03-06-1997
		CA 2212747 A	06-09-1996
		EP 0812331 A	17-12-1997
		JP 11501124 T	26-01-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)	
C 1 2 N	5/06	G 0 1 N	33/53	Y
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 N	15/00	A
G 0 1 N	33/53		5/00	E

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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 ダヴォドー フランソワ  
フランス国 ナーント リュ デ カピテン  
クレルヴィル 9

(72)発明者 ボヌヴィル マルク  
フランス国 ヴェルトゥ リュ マソニエール 60

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA06  
EA04 GA11 GA18 GA19 HA03  
4B063 QA01 QA18 QQ03 QR48 QR66  
QS36 QX01 QX04  
4B065 AA93X BA24 CA44 CA46  
4C087 AA04 AA05 BB34 BB42 DA20  
MA66 NA14 ZB07  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
CA40 DA50 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	在HLA背景中呈现的对肽特异的CD8 + T淋巴细胞群群的检测和纯化方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003510039A</a>	公开(公告)日	2003-03-18
申请号	JP2001522275	申请日	2000-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	研究所国立拉萨在水泥埃杜拉尔外壳格哈德医疗日元上课以及EM		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉城主等德拉RECHERCHE医疗 ( 李EN ESÇLM )		
[标]发明人	ランフランソフ ボディニエマリー ダヴォドーフランソフ ボンヌヴィルマルク		
发明人	ラン フランソフ ボディニエ マリー ダヴォドーフランソフ ボンヌヴィル マルク		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/12 A61K35/14 A61K35/24 A61K38/00 A61P37/02 A61P37/04 C07K14/74 C12N5/0783 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/569 C12N5/06		
CPC分类号	C12N5/0636 A61K38/00 A61K2035/124 C07K14/70539 G01N33/56972		
FI分类号	A61K35/14.Z A61K35/24 A61P37/02 C07K14/74.ZNA C12Q1/02 G01N33/53.Y C12N15/00.A C12N5/00.E		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX04 4B065/AA93X 4B065/BA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C087/AA04 4C087/AA05 4C087/BB34 4C087/BB42 4C087/DA20 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB07 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	1999011133 1999-09-06 FR		
其他公开文献	JP5020452B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

解决的问题：提供一种检测和纯化对HLA背景中呈现的肽特异的CD8 + T淋巴细胞群体的方法。本发明涉及由类似于I类MHC的重组蛋白制得的多聚体，其中该蛋白导致至少一种还原并因此抑制CD8和重链之间相互作用的亲和力。本发明涉及特征在于它们在T淋巴细胞共受体CD8和重链的相互作用区中具有改变的多聚体。这些与抗原肽复合的多聚体可用于诊断和治疗目的。

サブク リ	選別はして ないもの	以下のものによる1回目的の選別 された		以下のものによる2回目的の選別 された	
		多量性 Ab/pAb5	多量性 Ab/pAb5	多量性 Ab/pAb5	多量性 Ab/pAb5
STL1	14.0	95.0 (6.6)			
PBL1	5.6	88.5 (16.0)	97.9 (17.5)		
STL2	1.4	25.3 (18.1)		76.9 (3.0)	
PBL2	0.8	51.1 (83.9)	97.5 (21.9)		
STL3	0.6	13.7 (22.8)			
PBL3	非検出	6.5 (非検出)		12.0 (1.4)	
STL4	0.3	4.1 (13.6)		8.6 (2.1)	
STL5	0.2	0.7 (3.3)		92.5 (49.3)	
STL6	0.14	2.9 (20.6)		97.1 (69.6)	
PBL4	0.09			82.9 (92.1)	
PBL5	0.02	0.4 (2.0)	2.2 (10.0)		86.7 (44.9)