

(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2013-539356

(P2013-539356A)

(43) 公表日 平成25年10月24日 (2013. 10. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 L	2 G O 4 5
A 6 1 P 37/06 (2006. 01)	A 6 1 P 37/06	4 B O 6 3
A 6 1 P 37/02 (2006. 01)	A 6 1 P 37/02	4 B O 6 5
A 6 1 P 37/08 (2006. 01)	A 6 1 P 37/08	4 C O 8 7
A 6 1 P 29/00 (2006. 01)	A 6 1 P 29/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-517589 (P2013-517589)	(71) 出願人	510087944
(86) (22) 出願日	平成23年6月30日 (2011. 6. 30)		ティクセル
(85) 翻訳文提出日	平成25年2月15日 (2013. 2. 15)		フランス国, エフー06560 ヴァルボ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/002269		ンヌ, ソフィア アンティポリス, アレ
(87) 国際公開番号	W02012/001533		デ ラ ネルティエール, レ カードリン
(87) 国際公開日	平成24年1月5日 (2012. 1. 5)		ス
(31) 優先権主張番号	10368030.2	(74) 代理人	100114775
(32) 優先日	平成22年7月29日 (2010. 7. 29)		弁理士 高岡 亮一
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100121511
(31) 優先権主張番号	61/359, 885		弁理士 小田 直
(32) 優先日	平成22年6月30日 (2010. 6. 30)	(72) 発明者	フォーセット, アルノウド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フランス国, エフー06140 ビオット
			, アベニユー セント フィリップ, 35
			, ル ハミュー デ テンプリアーズ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 1 3 産生 T R 1 - 様細胞及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、I L - 1 3 を産生可能であり、免疫抑制活性を有する、単離された T r 1 - 様細胞集団、前記集団を同定／単離／濃縮する方法、並びにその使用に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

I L - 1 3 を産生可能な、単離されたヒト T r 1 細胞集団。

【請求項 2】

前記細胞が I L - 1 0 を産生する、請求項 1 に記載の単離されたヒト T r 1 細胞集団。

【請求項 3】

前記細胞が、

- C D 4 と、
- 低レベルの C D 1 2 7 と、
- 低レベルの C D 6 2 L と、

10

を発現する、請求項 1 又は 2 のいずれか一項に記載の単離されたヒト T r 1 細胞集団。

【請求項 4】

前記細胞が特定の抗体であり、好ましくは、前記抗体が I I 型コラーゲン、オボアルブミン、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質又は H S P である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の単離されたヒト T r 1 細胞集団。

【請求項 5】

I L - 1 3 及び I L - 1 0 を産生可能な、単離されたヒト T r 1 クローン。

【請求項 6】

前記クローンが、

- C D 4 と、
- 低レベルの C D 1 2 7 と、
- 低レベルの C D 6 2 L と、

20

を発現する、請求項 5 に記載の単離されたヒト T r 1 クローン。

【請求項 7】

前記クローンが特定の抗体であり、好ましくは、前記抗体が I I 型コラーゲン、オボアルブミン、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質又は H S P である、請求項 5 又は 6 に記載の単離されたヒト T r 1 クローン。

【請求項 8】

- 細胞集団上の、C D 2 4、及び、C D 1 2 7 並びに C D 6 2 L マーカーの内の少なくとも一つの細胞表面発現を検出することと、

30

- I L - 1 3 及び I L - 1 0 の産生を検出することと、

を含み、前記細胞は C D 4、及び、低レベルの C D 1 2 7 及び／又は低レベルの C D 6 2 L を発現し、且つ、I L - 1 3 及び I L - 1 0 を産生し、前記細胞は前記 I L - 1 3 産生 T r 1 細胞である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の、ヒト T r 1 細胞集団を同定する方法。

【請求項 9】

- C D 2 4 及び低レベルの C D 1 2 7 及び／又は低レベルの C D 6 2 L を発現し、且つ、I L - 1 3 及び I L - 1 0 を産生する前記細胞を同定することと、

- 前記細胞を選択することと、

40

を含み、それによって、ヒト I L - 1 3 産生 T r 1 細胞において濃縮された細胞集団を取得し、前記ヒト I L - 1 3 産生 T r 1 細胞の割合は、濃縮前のヒト I L - 1 3 産生 T r 1 細胞の割合の少なくとも二倍である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の、ヒト I L - 1 3 産生 T r 1 細胞における細胞集団を濃縮する方法。

【請求項 10】

請求項 9 によって得られた、濃縮されたヒト I L - 1 3 産生 T r 1 細胞。

【請求項 11】

C D 4、C D 2 5、C D 1 2 7 及び C D 6 2 L を検出する手段と、I L - 1 3 及び I L - 1 0 産生を検出する手段とを含む、ヒト I L - 1 3 産生 T r 1 細胞集団を同定又は単離するためのキット。

【請求項 12】

50

請求項 1～4 若しくは 10 のいずれか一項に記載の、前記単離された及び／又は濃縮されたヒト IL-13 産生 Tr1 細胞集団、或いは、免疫反応、宿主病及び臓器拒絶反応、アレルギー疾患、炎症性疾患若しくは自己免疫状態対移植片を予防し、治療するための、請求項 5～7 のいずれか一項に記載の前記ヒト IL-13 産生 Tr1 クローン。

【請求項 13】

－請求項 8 に記載の、前記ヒト IL-13 産生 Tr1 細胞を同定することと、

－前記細胞を減少させることと、

を含み、それによって、ヒト IL-13 産生 Tr1 細胞において減少された細胞集団を取得し、前記ヒト IL-13 産生 Tr1 細胞の割合が、除去前の前記ヒト IL-13 産生 Tr1 細胞の割合の少なくとも 0.5 倍である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の、ヒト IL-13 産生 Tr1 細胞における細胞集団を減少させる方法。

10

【請求項 14】

請求項 13 によって得られた、ヒト IL-13 産生 Tr1 細胞を減少させた細胞集団。

【請求項 15】

それを必要とする対象において免疫反応を増加させるための、請求項 14 に記載のヒト IL-13 産生 Tr1 細胞を減少させた細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、単離した IL-13 産生 Tr1 細胞、その同定／分離／濃縮方法、及び、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー性疾患の診断又は治療方法のための方法及びキット、並びに、単離した IL-13 産生 Tr1 細胞を使用した臓器移植の条件に関する。

20

【背景技術】

【0002】

免疫系の恒常性は、自己抗原に対する侵入病原体及び免疫寛容に対する免疫応答の間のバランスに依存する。中枢及び末梢の両方のトレランスは、T 細胞トレランスの誘発及び維持のための重要なメカニズムである。過去 10 年間で、末梢免疫寛容の維持に重要な役割を果たす制御性 T 細胞 (Treg) が注目されてきた。Treg 細胞は、2 つの異なるサブタイプ：天然の Treg (nTreg) 及び、TGF- β 誘発 Treg 細胞、Tr1 細胞又は Th3 細胞などの誘発可能な Treg 細胞群に分けることができるということは、今はしっかりと確立されている。nTreg は、主に、FoxP3+T 細胞として記載され、一方、Tr1 細胞は、IL-10 産生制御性 T 細胞として記載されている (Allan ら、2008、Immunological reviews、223：391～421)。FoxP3+nTreg は、ナイーブ及びメモリー CD4+ 及び CD8+T エフェクター細胞、B 細胞、単球及び樹状細胞を含む様々な異なる免疫系細胞を調節／制御する。Tr1 細胞は、IL-10 及び形質転換増殖 β 因子 (TGF- β) を分泌することにより免疫反応を調節し、ナイーブ及びメモリーの両方の T 細胞応答を抑制する能力を有する。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0003】

クローン病を有する患者に Tr1 細胞を注射すると患者の症状が回復したため、Tr1 細胞は、細胞療法に有用であることが証明されている。しかしながら、Tr1 細胞を使用したこの細胞治療の効果を改善する必要性は解消されていない。

【0004】

驚くべきことに、発明者らは、IL-13 を産生可能な Tr1 細胞の亜集団を発見した。発明者らは、これらの細胞は、Tr1 細胞の特徴である IL-10 の抑制作用に加えて、IL-13 による抑制効果を有することが示された。

【課題を解決するための手段】

【0005】

50

本発明の一つの目的は、単離された T r 1 様細胞集団であり、好ましくは、単離されたヒト T r 1 様細胞集団であり、これは I L - 1 3 を産生することができる。一実施形態において、単離された本発明の T r 1 様細胞集団は、本発明において記載されるように、試験 A の条件において I L - 1 3 を産生することができる。本発明の一実施形態において、前記単離された T r 1 様細胞集団は、低量の I L - 4 を産生する。本発明の別の実施形態において、前記単離された T r - 1 様細胞集団は、以下を発現する：

- － C D 4 及び
- － 低レベルの C D 1 2 7 及び
- － 低レベルの C D 6 2 L。

【 0 0 0 6 】

本発明の別の実施形態において、前記単離された T r 1 様細胞は休止細胞であり、低レベルの C D 2 5 及び低レベルの F o x P 3 を発現する。本発明の別の実施形態において、前記単離された T r 1 様細胞集団は活性化され、C D 2 5 及び中程度のレベルの F o x P 3 を発現する。

【 0 0 0 7 】

本発明の別の実施形態において、前記単離された T r 1 様細胞は特定の抗原であり、好ましくは、抗原は I I 型コラーゲン、オボアルブミン、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質又は H S P である。

【 0 0 0 8 】

本発明の一実施形態において、単離された T r 1 様細胞集団は、T r 1 細胞集団であり、好ましくはヒト T r 1 細胞集団であり、好ましくは試験 A の条件において I L - 1 3 を産生することが可能である。本発明の一実施形態において、本発明の T r 1 様細胞集団は、好ましくは本発明の T r 1 細胞集団であり、好ましくは試験 A の条件において I L - 1 0 を産生する。

【 0 0 0 9 】

本発明の別の目的は、単離された T r 1 様クローンであり、好ましくは単離されたヒト T r 1 様クローンであり、I L - 1 3 を産生することができる。一実施形態において、本発明の単離された T r 1 様クローンは、本発明において説明するように、試験 A の条件において I L - 1 3 を産生することができる。本発明の一実施形態において、前記単離した T r 1 様クローンは、低量の I L - 4 を産生する。別の実施形態において、前記 T r 1 様クローンは以下を発現する：

- － C D 4 及び
- － 低レベルの C D 1 2 7 及び
- － 低レベルの C D 6 2 L。

【 0 0 1 0 】

本発明の別の実施形態において、前記単離した T r 1 様クローンは、特定の抗原であり、好ましくは、抗原は I I 型コラーゲン、オボアルブミン、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質又は H S P である。

【 0 0 1 1 】

本発明の一実施形態において、単離した T r 1 様クローンは、T r 1 クローンであり、好ましくはヒト T r 1 クローンであり、試験 A の条件において I L - 1 3 を産生することができる。

本発明の一実施形態において、本発明の T r 1 様クローンは、好ましくは、本発明の T r 1 クローンであり、試験 A の条件において I L - 1 0 を産生する。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の目的は、I L - 1 3 産生 T r 1 様細胞集団を同定する方法であり、以下の：

- －細胞集団上において、C D 4 並びに、少なくとも C D 1 2 7 及び C D 6 2 K マーカーの内の一つの細胞表面発現を検出することと、
- － I L - 1 3 産生を検出することと、

10

20

30

40

50

を含み、ここで、CD4及び低レベルCD127及び／又は低レベルCD62Lを発現し、且つ、IL-13を産生する細胞は、IL-13産生Tr1様細胞集団である。

【0013】

一実施形態において、本発明の方法は、単離されたヒトIL-13産生Tr1細胞を同定するためのものであり、前記方法は、更に、IL-10の産生を検出することを含む。

【0014】

本発明の別の目的は、IL-13産生Tr1様細胞における細胞集団を濃縮するための方法であり、以下の：

－CD4及び低レベルCD127及び／又は低レベルCD62Lを発現し、且つ、IL-13を産生する細胞を同定することと、

－前記細胞を選択することと

を含み、それによって、IL-13産生Tr1様細胞において濃縮された細胞集団を得られ、ここで、IL-13産生Tr1様細胞の割合は、濃縮前のIL-13産生Tr1様細胞の割合の少なくとも2倍である。

【0015】

一実施形態において、本発明の方法は、ヒトIL-13産生Tr1細胞集団における細胞集団を濃縮するためのものであり、ここで前記方法は、更に、IL-10産生の検出を含む。

【0016】

本発明の別の目的は、本明細書中に上述した方法によって得られた、濃縮されたIL-13産生Tr1様細胞集団である。本発明の一実施形態において、集団は、ヒトIL-13産生Tr1細胞において濃縮される。

【0017】

本発明の別の目的は、IL-13産生Tr1様細胞集団、好ましくは、ヒトIL-13産生Tr1細胞集団を同定又は単離するためのキットであり、CD4、CD25、CD127及びCD62Lの細胞表面発現を検出するための手段及び、IL-13又はIL-13並びにIL-13産生を検出するための手段を含む。

【0018】

本発明の別の目的は、単離された及び／又は濃縮された、IL-13産生Tr1様細胞集団であり、好ましくは、単離された及び／又は濃縮された、ヒトIL-13産生Tr1細胞集団であるか若しくはIL-13産生Tr1様クローンであり、好ましくは、免疫反応、移植片対宿主病及び臓器拒絶反応、アレルギー性疾患、炎症性疾患又は自己免疫状態を防ぐ又は治療するための、ヒトIL-13産生Tr1クローンである。

本発明の別の目的は、IL-13産生Tr1様細胞における細胞集団を減少させるための方法であり、この方法は：

－本明細書中で上述したように、IL-13産生Tr1様細胞を同定することと、

－前記細胞を減少させることと、

を含み、これによって、IL-13産生Tr1様細胞において減少された細胞集団が得られ、ここで、IL-13産生Tr1様細胞の割合は、減少させる前のIL-13産生Tr1様細胞の割合の、少なくとも0.5倍である。

【0019】

本発明の一実施形態において、本発明の方法は、ヒトIL-13産生Tr1細胞における細胞集団を減少させるためのものである。

【0020】

本発明の別の目的は、本明細書中で上述した方法によって得られた、IL-13産生Tr1様細胞を減少させた細胞集団であり、減少させた細胞集団は、ヒトIL-13産生Tr1細胞において減少される。

【0021】

本発明の別の目的は、それを必要とする対象において免疫反応を増加させるために、IL-13産生Tr1様細胞を減少させた細胞集団である。本発明の一実施形態において

10

20

30

40

50

、それを必要とする対象において免疫反応の増加のために減少させた細胞集団は、ヒト IL-13 産生 Tr1-細胞において減少される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】IL-13によるT細胞増殖活性の *In vitro*での阻害 組換え型ヒト IL-13 (12.5 ng / ml)を、抗CD3および抗CD28モノクローナル抗体で活性化されたヒト末梢血単核球の培養物に添加した。細胞の増殖はWST-1を用いてラベルする生存可能な細胞を使用して、培養三日後に評価した。

【図2】IL-13産生Tr1-様細胞による、T細胞増殖活性の *In vitro*での阻害 パネルAは、48時間抗-CD3+抗-CD28モノクローナル抗体治療後における、*In vitro*でのIL-13産生調節細胞のサイトカイン分泌パターンを示す。パネルBは、抗-CD3+抗-CD28モノクローナル抗体を用いて、培養中で三日間刺激した、ヒトPBMCの増殖に対する、IL-13の活性化細胞の上澄み液の抑制ポテンシャルを示す。パネルCは、抗-IL13阻害抗体の添加が、IL-13産生調節細胞の上澄み液の抑制作用を逆転させることができることを示す。

【図3】ヒトIL-13産生調節細胞の表現型 ヒトIL-13調節細胞は、フローサイトメトリー分析のために、傾向ラベルされたCD25、CD127、CD62L又は、FoxP3特異的モノクローナル抗体を用いて染色した。細胞は、休止状態、又は、IL-2及びCD3+CD28刺激剤を使用して活性化後7日で分析した。

【図4】異なるTr1クローンによる、IL-13及びIL-10の産生 二つの異なるドナーからのヒトTr1クローンを、*in vitro*で、抗-CD3+抗-CD28モノクローナル交代を使用して活性化した。48時間後、IL-10、IFN-γ及びIL-13の産生を、ELISA法により上澄み液中で測定した。結果は、他のクローンが三種のサイトカインを産生することができるのに対し、試験した二つの異なるドナーにおいて、いくつかのクローンが、IL-10及びIFN-γを産生できるが、IL-13を産生できないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、免疫抑制能力を有する、新規の単離したIL-13産生Tr1-様細胞集団及びその使用を提供する。発明者らは、これらの細胞が、Tr1細胞よりも同じ表面マーカーを表すためTr1-様細胞であること、及び、これらの細胞がIL-13及び低レベルのIL-4を産生することが可能であることを発見した。発明者らは、それらの免疫抑制能力が、部分的にIL-13によって媒介されることを発見した。更に、これらのTr1-様細胞の内のいくつかはまた、IL-10を産生することができる。従って、発明者らは、IL-10及びIL-13を産生することができるこれらの細胞は、Tr1細胞の亜集団であることを提示する。

【0024】

発明者らは、驚くべきことに、このTr1細胞の亜集団が促進された免疫抑制効果を有することを発見し、これは細胞療法における大きな関心事である。

【0025】

理論に束縛されることをいわずに、発明者らは、前記促進された免疫抑制効果は、標的細胞におけるIL-10及びIL-13の異なり且つ補完的な効果によるものであり得ることを示している。例えば、Mintyら (Eur Cytokine Netw. 1997; 8 (2): 189-201) は、IL-13及びIL-10が活性化単球の異なるサイトカイン分泌プロファイルを誘発したことを示した。

【0026】

本発明の一つの目的は、好ましくは試験Aの条件において、IL-13を産生することができる単離されたTr1-様細胞集団である。好ましくは、単離されたTr1-様細胞集団は、ヒト細胞集団である。

【0027】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用されるように、用語「IL-13」は、インターロイキン13を指す。

【0028】

本明細書中で使用されるように、用語「IL-13産生」は、50 pg/ml以上、培養培地中において好ましくは100 pg/ml以上、より好ましくは200 pg/ml以上、更により好ましくは500 pg/ml以上、更により好ましくは約1,000、2,000、4,000、6,000、8,000、10,000、12,000、14,000、16,000、18,000、又は20,000 pg/ml以上のIL-13の分泌量を指す。別の方法で、それは、250 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞以上、好ましくは、500 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞以上、より好ましくは、1000 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞以上のIL-13の分泌量を指す。本明細書において使用されるように、数字の前に用いられる用語「約」は、前記数字の値のプラスマイナス10%を意味する。

10

【0029】

本発明の一実施形態において、本発明のTr1様細胞は、それらが好ましくは試験Aの条件においてIL-10を産生するため、Tr1細胞である。

【0030】

本明細書中で使用されるように、用語「IL-10」は、インターロイキン10を指す。

【0031】

本発明の一実施形態において、本発明のヒトTr1細胞は、高レベルのIL-10を産生する。

20

【0032】

本明細書で使用されるように、用語「IL-10産生」は、少なくとも50 pg/ml、培養培地中において好ましくは少なくとも100 pg/ml、より好ましくは少なくとも200 pg/ml、培養培地中少なくとも約500 pg/ml、典型的には、約1,000、2,000、4,000、6,000、8,000、10,000、12,000、14,000、16,000、18,000又は20,000 pg/ml以上のIL-10の分泌量を指す。別の方法において、それは、250 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞以上、好ましくは、500 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞以上、より好ましくは、1000 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞以上のIL-10の分泌量を指す。

30

【0033】

本発明の一実施形態において、前記単離されたTr1様細胞集団は、好ましくは試験Aの条件において、低量のIL-4を産生する。

【0034】

本明細書中で使用されるように、用語「IL-4」は、インターロイキン4を指す。

【0035】

本明細書中で使用されるように、用語「低量のIL-4」は、500 pg/ml未満、好ましくは250 pg/ml未満、より好ましくは100 pg/ml未満の量を指す。

40

【0036】

あるいは、用語「低量のIL-4」は、2000 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞未満、好ましくは、1000 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞未満、より好ましくは500 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞未満、更により好ましくは100 pg/10⁶個のIL-13産生Tr1様細胞未満のIL-4の量を指す。

【0037】

本発明の一実施形態において、前記単離されたTr1様細胞集団は、好ましくは試験Aの条件において、中程度のレベルのTGF-βを産生する。

【0038】

50

本明細書中で使用されるように、用語「 $TGF-\beta$ 」は、トランスフォーミング増殖因子 β を指す。

【0039】

本明細書で使用されるように、用語「中程度のレベルの $TGF-\beta$ 」は、少なくとも約 100 pg/ml 、典型的には約 200 、 300 、 400 、 600 、 800 又は 1000 pg/ml 以上の $TGF-\beta$ の量を指す。

【0040】

別の方法において、それは、少なくとも約 $400\text{ pg}/10^6$ 個の $IL-13$ 産生 $Tr1$ 様細胞、典型的には、約 800 、 1200 、 1600 、 2400 、 3200 、又は、 $4000\text{ pg}/10^6$ 個の $IL-13$ 産生 $Tr1$ 様細胞以上の $TGF-\beta$ の量を指す。

10

【0041】

本発明の一実施形態において、前記単離された $Tr1$ 様細胞集団は、好ましくは試験Aの条件において、中程度のレベルの $IFN-\gamma$ を産生する。

【0042】

本明細書で使用されるように、用語「 $IFN-\gamma$ 」は、インターフェロン γ を指す。

【0043】

本明細書で使用されるように、用語「中程度のレベルの $IFN-\gamma$ 」は、 0.1 pg/ml ～少なくとも 400 pg/ml の間、典型的には、 600 、 800 、 1000 、 1200 、 1400 、 1600 、 1800 、又は 2000 pg/ml 以上で構成される $IFN-\gamma$ の量を指す。

20

【0044】

あるいは、用語「中程度のレベルの $IFN-\gamma$ 」は、 $0.4\text{ pg}/10^6$ 個の $IL-13$ 産生 $Tr1$ 様細胞～少なくとも $1600\text{ pg}/10^6$ 個の $IL-13$ 産生 $Tr1$ 様細胞の間、典型的には、約 2400 、 3200 、 4000 、 4800 、 5600 、 6400 、 7200 、又は $8000\text{ pg}/10^6$ 個の $IL-13$ 産生 $Tr1$ 様細胞以上で構成される $IFN-\gamma$ の量を指す。

【0045】

本発明の一実施形態において、前記単離された $Tr1$ 様細胞集団は、好ましくは試験Aの条件において、低量の $IL-2$ を産生する。

【0046】

本明細書で使用されるように、用語「 $IL-2$ 」は、インターロイキン2を指す。

30

【0047】

本明細書で使用されるように、用語「低量の $IL-2$ 」は、約 500 pg/ml 、好ましくは約 250 、 100 、 75 、又は 50 pg/ml 以下の量を指す。

【0048】

あるいは、それは、約 $2000\text{ pg}/10^6$ 個の $IL-13$ 産生 $Tr1$ 様細胞未満、好ましくは、約 1000 、 400 、 300 、又は $200\text{ pg}/10^6$ 個の $IL-13$ 産生 $Tr1$ 様細胞以下の $IL-2$ の量を指す。

【0049】

本発明の一実施形態において、前記単離された $Tr1$ 様細胞集団は、ヒト $IL-13$ 産生 $Tr1$ 集団であり、これは、 $IL-13$ 、 $IL-10$ 、中程度のレベルの $IFN\gamma$ 及び $TGF\beta$ 並びに低量の $IL-4$ 及び／又は $IL-2$ を産生する。本実施形態によると、単離された $Tr1$ 様細胞集団は、発明者らが、 $Tr1$ 細胞は試験Aの条件において $IL-13$ を産生し得るか、又はし得ないことを示したように（実施例参照）、ヒト $Tr1$ 細胞の亜集団である。

40

【0050】

細胞が、 $IL-13$ 、 $IL-10$ の産生、中程度のレベルの $IFN\gamma$ 及び $TGF\beta$ の産生、及び、低量の $IL-4$ 及び／又は $IL-2$ の産生が可能か否かを評価するための方法は、当業者に周知である。

【0051】

50

本発明において定義する試験 A は、本明細書の以下に説明し、試験 A の条件において細胞を培養することにより、サイトカイン産生の判断をすることができる。試験 A は、一つ以上の T C R 活性化剤を用いた細胞の活性化に対応する。

【0052】

一実施形態において、T C R 活性化剤は、抗-C D 3 + 抗-C D 2 8 抗体又はインターロイキン 2、P M A + イオノマイシンなどの、T リンパ球の多クローン性活性化因子である。

【0053】

別の実施形態において、T C R 活性化剤は、抗原提示細胞によって提示された抗原である。

【0054】

例えば、10%ウシ胎児血清を添加した R P M I 又は D M E M 培地中の 1×10^6 個の細胞は、48 時間の間、一つ以上の T C R 活性化剤の存在下で活性化する。培地を次に採取し、サイトカイン産生を当技術分野で公知な方法により測定した。

【0055】

これらの方法の一例は、以下のようなものである：細胞を、抗-C D 3 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 及び抗-C D 2 8 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下で 48 時間の間活性化し、サイトカイン分泌は、この時点で E L I S A 法又は F A C S 法により測定する。

【0056】

本発明の別の実施形態において、前記単離した T r 1 様細胞は、その表面に、C D 4 及び低レベルの C D 1 2 7 及び低レベルの C D 6 2 L を発現する。

本発明の別の実施形態において、前記 T r 1 様細胞の単離した亜集団は、その表面に、C D 4 及び低レベルの C D 1 2 7 及び低レベルの C D 6 2 L を発現する。

【0057】

一実施形態において、前記単離した T r 1 様細胞は、休止しており、その表面に C D 2 5 を発現しない。一実施形態において、前記単離した T r 1 細胞の亜集団は、休止しており、その表面に C D 2 5 を発現しない。

【0058】

別の実施形態において、前記単離した T r 1 様細胞は、活性化され、その表面に C D 2 5 を発現する。別の実施形態において、前記単離した T r 1 細胞の亜集団は、活性化され、その表面に C D 2 5 を発現する。

【0059】

本明細書中で使用されるように「単離した」は、その天然の環境（例えば、抹消血など）から取り除かれた細胞又は細胞集団、及び、単離され、精製又は分離された細胞又は細胞集団を指し、天然に存在するものを含む他の細胞から、少なくとも約 75% 存在しない、80% 存在しない、85% 存在しない、及び、好ましくは約 90%、95%、96%、97%、98%、99% 存在しないが、細胞が単離されたかどうかに基づく細胞表面マーカーが欠如している。

【0060】

本明細書中で使用されるように、用語「細胞表面マーカー」は、細胞集団を指定するために使用することができる細胞表面上のタンパク質、炭水化物又は脂質を指す。

【0061】

本明細書中で使用されるように、用語「発現」は、互換的に、遺伝子又は遺伝子生成物の発現を指し、エンコードされたポリペプチド又はタンパク質を含む。遺伝子生成物の発現は、例えば、ポリペプチドと結合した抗体を使用する免疫測定法により決定し得る。或いは、遺伝子の発現は、例えば、R T - P C R 法、R T - q P C R 法などの m R N A レベルの測定により決定し得る。

【0062】

用語「ナイーブ」は、当該技術分野において公知であり、未だ特定の抗原に遭遇していない免疫細胞又は細胞の集団を指す。

10

20

30

40

50

【0063】

用語「休止」は、当該技術分野において公知であり、増殖しない免疫細胞又は細胞集団を指し、サイトカインを産生せず、且つ、表面にCD25などの従来の免疫細胞活性化分子を発現しない。

【0064】

用語「活性化した」は、当該技術分野において公知であり、増殖する、及び／又はサイトカインを産生する免疫細胞又は細胞集団を指し、表面にCD25などの従来の免疫細胞活性化分子を発現する。

【0065】

特にTリンパ球について、休止から活性化状態への経路は、その特定の抗原とT細胞との遭遇又はサイトカイン若しくはマイトジェンの活性化を用いた活性化によって媒介される

10

【0066】

CD127^{low}、CD62L^{low}、又はCD25^{low}について使用される用語「low（低い）」又は「lo（低い）」又は「lo/－（低い/－）」は、当該技術分野において公知であり、対象とする細胞マーカーの発現レベルを指し、この場合、細胞マーカーの発現レベルは、全体として分析される細胞集団における細胞マーカーの発現レベルと比較すると低い。より具体的には、用語「lo（低い）」は、一つ以上の他の個別の細胞集団よりも、低いレベルで細胞マーカーを発現する個別の細胞集団を指す。

【0067】

用語「high（高い）」又は「hi（高い）」又は「bright（鮮やかな）」は、当該技術分野において公知であり、対象とする細胞マーカーの発現レベルを指し、この場合、細胞マーカーの発現レベルは、全体として分析される細胞集団における細胞マーカーの発現と比較して高い。

20

【0068】

用語「+」及び「－」は、当該術分野で公知であり、対象とする細胞マーカーの発現レベルを指し、この場合、「+」に相当する細胞マーカーの発現レベルは、高いか又は中間であり、「－」に相当する細胞マーカーの発現レベルは、低いca又はゼロである。一般的に、染色強度の上位2、3、4又は5%の細胞が「hi（高い）」と指定されており、それらは、「+」として分類される集団の上位半分に該当する。

30

【0069】

本明細書中に使用されるように、用語「CD127」は、細胞表面に存在する「インターロイキン-7受容体」（IL-7R）を指す。IL-7受容体α鎖は、文献（例えば、Goodwithら（1990）Cell 60：941～951）に記載されている。IL-7Rはまた、その文献において、CD127も指す。CD127⁺は、CD127に向けたラベルされた抗体で処理した場合、中間又は鮮やかに染色する細胞を指す。CD127^{low}は、ラベルされたCD127抗体と接触しても、僅かに鈍く、又は全く染色しない型の細胞を指す。一般的に、細胞は、当業者に知られているように染色強度で容易に認識できる差に基づいて、それらのCD127発現レベルによって指定されている。いくつかの実施形態において、CD127^{low}として細胞を指定するための分離は、CD127^{low}として細胞を指定する蛍光強度の、50%、40%、30%、又は、20%以下に該当する細胞を備える全ての細胞について観察された、蛍光強度分布の観点から設定することができる。CD127[－]細胞は、蛍光強度についてボトムの10パーセント以下に該当する細胞として指定することができる。いくつかの実施形態において、CD127染色の頻度分布は、全ての細胞に対して得られ、集団曲線はより高い染色及び低い染色集団に適合し、細胞は、それらが最も統計的に、それぞれの集団分布の統計的分析の観点から属している集団に割り当てられる。いくつかの実施形態において、CD127^{low}は、CD127⁺細胞よりも2～3倍低い強度で染色する。

40

【0070】

本明細書で使用するように、用語「CD62L」は、リンパ球移動のための重要な接着

50

分子である L-セレクチンを指す。CD 6 2 L⁺ は、CD 6 2 L に向けられたラベルされた抗体で処理された場合、中間又は鮮やかに染色する細胞を指す。CD 6 2 L^{1.0/-} は、ラベルされた CD 6 2 L 抗体と接触しても、僅かに鈍く、又は全く染色しない型の細胞を指す。一般的に、細胞は、当業者に知られているように染色強度で容易に認識できる差に基づいて、それらの CD 6 2 L 発現レベルによって指定されている。いくつかの実施形態において、CD 6 2 L^{1.0/-} として細胞を指定するための分離は、CD 6 2 L^{1.0/-} として細胞を指定される蛍光強度の、50%、40%、30%、又は、20%以下に該当する細胞を備える全ての細胞について観察された、蛍光強度分布の観点から設定することができる。CD 6 2 L⁻ 細胞は、蛍光強度についてボトムの 10 パーセント以下に該当する細胞として指定することができる。いくつかの実施形態において、CD 6 2 L 染色の頻度分布は、全ての細胞に対して得られ、集団曲線はより高い染色及び低い染色集団に適合し、細胞は、それらが最も統計的に、それぞれの集団分布の統計的分析の観点から属している集団に割り当てられる。いくつかの実施形態において、CD 6 2 L^{1.0/-} は、CD 6 2 L⁺ 細胞よりも 2~3 倍低い強度で染色する。

10

【0071】

本明細書で使用されるように、用語「CD 4」は、細胞表面糖タンパク質は、典型的には成熟したヘルパー T 細胞及び未熟胸腺細胞、並びに、単球やマクロファージ上で見つかる。T 細胞において、CD 4 は、T 細胞受容体 (TCR) の共受容体であり、チロシンキナーゼ lck を補充している。その D1-部分を用いて、CD 4 は、MHC クラス II 分子の $\beta 2$ -ドメインと接続することができる。CD 4⁺ は、ラベルされた抗-CD 4 抗体と接触すると鮮やかに染色する細胞を指し、CD 4⁻ は、蛍光的にラベルされた CD 4 抗体と接触すると、ほとんど鮮やかではない、鈍いか、又は全く染色しない型の細胞を指す。一般的に、細胞は、CD 4 染色が明らかに二峰性であるように、染色強度において容易に指定可能な差に基づいて、CD 4 発現レベルによって指定する。いくつかの実施形態において、CD 4 染色の頻度分布は、全ての細胞に対して得られ、集団曲線はより高い染色及び低い染色集団に適合し、細胞は、それらが最も統計的に、それぞれの集団分布の統計的分析の観点から属している集団に割り当てられる。いくつかの実施形態において、CD 4⁻ 細胞は、CD 4⁺ 細胞よりも 2~3 倍低い強度で染色する。

20

【0072】

本明細書で使用されるように、用語「CD 25」は、インターロイキン-2 受容体の α サブユニットを指し、55 kD の分子量を有する単鎖糖タンパク質である。モノカインインターロイキン-1 の存在下における抗原またはマイトジェンを含む T 細胞の活性化に続いて、インターロイキン 2 (IL-2) は、迅速に合成及び分泌される。これに応答して、T 細胞の亜集団は、IL-2 についての高親和性受容体を発現する。これらの細胞増殖は、ヘルパー、サプレッサー及び細胞毒性機能を媒介することができる T 細胞集団を増殖する。IL-2 受容体は、一意に T 細胞上に見つけられる訳ではない。CD 25^{hi} は、ラベルされた抗-CD 25 抗体と接触すると鮮やかに染色する細胞を指し、CD 25⁺ は、ラベルされた抗-CD 25 抗体と接触するとそれよりも低く鮮やかに染色する細胞を指し、CD 25^{1.0/-} は、ラベルされた CD 25 抗体と接触すると、最も鮮やかさが低い、つまり鈍いか、又は全く染色しない細胞を指す。一般的に、細胞は、当業者に知られているように染色強度で容易に認識できる差に基づいて、それらの CD 25 発現レベルによって指定されている。いくつかの実施形態において、CD 25 発現カテゴリ hi、+、lo 又は一細胞として、細胞を指定するための分離は、全ての細胞について観察される蛍光強度分布の観点から設定することができる。一般的に、染色強度の上位 2、3、4 又は 5% の細胞は、「hi」として指定され、それらは、「+」として分類される集団の上位半分に該当する。蛍光強度 50%以下に該当するそれらの細胞は、CD 25^{1.0} として指定され、5%以下を CD 25⁻ として指定する。

30

40

【0073】

前記 Tr1 様細胞は、このように、それらの細胞表面マーカー及びそれらの IL-13 を産生する能力により、操作可能に特徴付けられる。前記 Tr1 細胞の亜集団は、このよ

50

うに、それらの細胞表面マーカー及びそれらの I L - 1 3 並びに I L - 1 0 を産生する能力により、操作可能に特徴付けられる。これらの細胞表面マーカーは、特に、細胞表面マーカーに結合する試薬によって識別することができる。例えば、T r 1 細胞上のタンパク質、炭水化物、又は脂質は、免疫学的に特定のタンパク質や炭水化物に特異的な抗体によって認識することができる（マーカーに対する抗体の使用のために、抗体を使用する H a r l o w を参照されたい；また、例えば実験室マニュアル（C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . , 1 9 9 9 ）も参照されたい）。T r 1 - 様細胞の表面上に存在するマーカーのセット及びこれらの細胞の表面に存在しないマーカーのセットは、T r 1 - 様細胞に対して特徴的である。従って、T r 1 - 様細胞は、細胞表面マーカーを使用して、陽性及び陰性の選択により選択することができる。T r 1 - 様細胞により発現した細胞表面マーカーに結合する試薬である、「陽性マーカー」は、T r 1 - 様細胞の陽性選択のために使用することができる（即ち、細胞表面マーカーを発現する細胞を保持している）。逆に、陰性選択は、特定の細胞表面マーカーが、T r 1 - 様細胞により発現していないという事実に依存する。従って、「陰性マーカー」（即ち、T r 1 - 様細胞の細胞表面上に、マーカーが存在しない）は、陰性マーカーについて特異的である試薬と結合する細胞の除去による T r 1 - 様細胞ではない集団における、これらの細胞の除去に使用することができる。

10

【0074】

一実施形態において、細胞表面マーカーの検出された発現に基づく細胞間の識別は、細胞表面マーカーの発現と、対照の細胞集団による平均発現とを比較することにより生じる。例えば、T r 1 - 様細胞上のマーカーの発現は、T r 1 - 様細胞と同じサンプル由来の他の細胞における同じマーカーの平均の発現と比較することができる。マーカー発現による細胞間の識別の他の方法は、試薬の組み合わせを使用するフローサイトメトリーによる細胞のゲーティングを含む（G i v a n A , F l o w C y t o m e t r y : F i r s t P r i n c i p l e s , (W i l e y - L i s s , N e w Y o r k , 1 9 9 2) ; O w e n s M A & L o k e n M R . , F l o w C y t o m e t r y : P r i n c i p l e s f o r C l i n i c a l L a b o r a t o r y P r a c t i c e , (W i l e y - L i s s , N e w Y o r k , 1 9 9 5) を参照）。

20

【0075】

「試薬の組み合わせ」によりは、T r 1 様細胞の表面上に存在するか（ポジティブマーカー）若しくは存在していないか（ネガティブマーカー）のいずれかの細胞表面マーカーに結合する、又は、ポジティブ及びネガティブマーカーの組み合わせに結合する少なくとも二つの試薬を意味する。例えば、T r 1 - 様細胞表面マーカーに特異的な抗体の組み合わせの使用は、様々なサンプル／組織からの T r 1 - 様細胞の単離及び／又は濃縮をもたらす。

30

【0076】

本発明による「抗-X線抗体」又は「X線抗体」は、特にXに結合できる抗体である。例えば、抗-C D 1 2 7 抗体又はC D 1 2 7 抗体は、C D 1 2 7 と結合することができる。本発明による使用のための抗体は、組換え抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒトモノクローナル抗体、ヒト又は霊長類モノクローナル抗体、及び抗体フラグメントを含むがそれらに限定されない。非常に多くのリンパ球バイオマーカーに特異的な抗体が市販されている。これらは、抗-C D 1 2 7 、抗-C D 4 、抗-C D 6 2 L 、抗-C D 2 5 、抗-I L - 4 、抗-I L - 1 0 及び抗-I L - 1 3 抗体を含む（R & D , B D B i o s c i e n c e s ）。「抗体」は、特に、抗原に結合し且つ識別する、免疫グロブリン遺伝子又はそのフラグメントからの骨組み領域を含むポリペプチドを指す。識別された免疫グロブリン遺伝子は、 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、及び μ 定常領域遺伝子と同様に無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、 κ 又は λ のいずれかに分類される。重鎖は、 γ 、 μ 、 α 、 δ 、又は ϵ として分類され、順番にそれぞれ免疫グロブリンクラス、I g G 、I g M 、I g A 、I g D 及びI g E を定義する。典型的に、抗

40

50

体の抗原－結合領域は、結合の特異性及び親和性において最も重要となる。典型的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の同一の二つのペアから構成され、各ペアは、一つの「軽」鎖（約25 kD）及び一つの「重」鎖（約50～70 kD）を有する。各鎖のN末端は、約100～110以上の抗原識別に主に関与するアミノ酸を定義する。用語、可変的な軽鎖（VL）及び可変的な重鎖（VH）は、それぞれ軽鎖及び重鎖のものを指す。抗体は、例えば、無傷の免疫グロブリンとして、又は、様々なペプチダーゼによる消化によって産生された、多数の良く特徴付けられたフラグメントとして存在する。従って、例えば、ペプシンは、F（ab）'2を産生するヒンジ領域におけるジスルフィド結合の下位の抗体を消化し、それ自身が軽鎖であるFabの二量体は、ジスルフィド結合によりVH－CH1に結合している。F（ab）'2は、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合を壊すために、穏やかな条件下で還元し得、それにより、F（ab）'2二量体をFab'一量体へ変換する。Fab'一量体は、本質的にヒンジ領域を備えるFabである（Fundamental Immunology（Paul ed., 3d ed., 1993）を参照）。完全抗体の消化の観点から、様々な抗体フラグメントが定義される一方、当業者は、そのようなフラグメントが、化学的に、又はDNA方法論を用いて、新たに合成され得ることを理解するであろう。従って、抗体という用語はまた、本明細書で使用されるように、抗体全体の修飾により産生されたか、組換えDNA方法論を使用して新たに合成されたかのいずれかによる抗体フラグメント（例えば、一本鎖Fv）、又は、ファージディスプレイライブラリーを用いて同定された抗体フラグメント（例えば、McCafferty et al., Nature 348:552－554（1990）を参照）を含む。いくつかの実施形態において、標的の高親和性リガンドは、抗体の代わりに使用され得る。タンパク質又はペプチドについて言及する場合、抗体へ「特異的（又は選択的）結合する」又は、「特異的（又は選択的）免疫反応性」という語句は、多くの場合、タンパク質および他の生物製剤の異種集団においてタンパク質の存在を判断する、結合反応を指す。そのような条件下での抗体への特異的な結合は、特定のタンパク質へのその特異性により選択される抗体を必要とする。例えば、ポリクローナル抗体は、選択された抗原と特異的に免疫反応性であるが、他のタンパク質とは免疫反応性ではない免疫反応ポリクローナル抗体のみを得るように選択され得る。この選択は、他の分子と交差反応する抗体を取り去ることにより達成され得る。

【0077】

好ましくは、「ラベル」又は「検出可能な部分」は、抗体に共有結合的に又は非共有結合的に結合している。ラベルは、分光、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、又は他の物理的手段によって検出可能であり得る。特に有用なラベルは、蛍光染料である。抗体ヘラベルを取り付ける方法は、当業者に公知である。特に好ましいラベルは、生理的条件下で所定の酵素との接触により、容易に切断又は分離又は加水分解を受けることが可能なリンカーにより、抗体に結合しているものである。抗体はまた、常磁性マイクロビーズなどの磁性粒子と結合させることができる（Miltényi Biotec, Germany）。磁氣的にラベルした抗体によって結合された活性化したT細胞は、磁気細胞選別を含むがそれに限定されない技法を使用して単離され得る。CD127、CD62L、CD4及びCD25並びに多くの他の分化クラスターへ適切にラベルされた抗体は、市販されており、当業者に知られている。抗体は、サンプルとの接触前若しくは後に、又は、CDとの接触前若しくは後に、ラベルされ得る。CD抗体は、CD－抗体に結合するラベルされた抗体との接触により、ラベルされ得る。本明細書中で使用されるように、用語「CD」又は「分化クラスター」又は「共通の決定要因」は、抗体により識別される細胞表面分子を指す。

【0078】

本発明の一実施形態において、IL－13産生Tr1様細胞集団は休止しており、且つ、細胞は、低レベルのFoxP3を発現する。一実施形態において、IL－13及びIL－10産生Tr1細胞亜集団は休止しており、且つ、細胞は低レベルのFoxP3を発現する。

【0079】

本発明の別の実施形態において、IL-13産生Tr1様細胞集団は活性化され、細胞は、中程度のレベルのFoxP3を発現する。一実施形態において、IL-13及びIL-10産生Tr1細胞亜集団は活性化され、且つ、細胞は、中程度のレベルのFoxP3を発現する。

【0080】

本明細書で使用されるように、用語「FoxP3」は、転写因子として作用すると考えられている核タンパク質FoxP3を指す(Hori et al., 2003; Yasayko, J. E. et al., Nat. Genet. 27:68-73 (2001); Fontenot, J. D. et al., Nat. Immunol. 4:330-336 (2003); Khattry, R. et al., Nat. Immunol. 4:337-342 (2003))。細胞内に配置されると、Foxp3発現はラベルされた抗Foxp3の抗体を用いた細胞内フローサイトメトリーにより評価することができる(eBioscience inc or BD biosciences)。

10

【0081】

本発明の別の目的は、単離されたIL-13産生Tr1様細胞を含む組成物、単離されたIL-13産生Tr1様細胞から本質的に成る又は成る組成物である。

【0082】

本発明の別の目的は、単離されたIL-13及びIL-10産生Tr1細胞を含む組成物、単離されたIL-13及びIL-10産生Tr1細胞から本質的に成る又は成る組成物である。

20

【0083】

本発明の一実施形態において、Tr1細胞又はTr1様細胞の亜集団は、特定の抗原又は特定の複数の抗原である。

【0084】

Tr1細胞又はTr1様細胞についての抗原の例は、自己抗原、一般的なヒトの食事からの食物抗原、例えば、多発性硬化症関連抗原又はジョイント関連抗原などの炎症性抗原及びアレルゲンを特に含むが、これらに限定されない。

【0085】

用語「一般的なヒトの食事からの食物抗原」は、免疫原性ペプチドを指し、これは、以下の非限定的な食物抗原のリストなど、ヒトに一般的な食品から由来している：リボカンなどのウシ抗原、Ca結合S1000、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリンなどのラクトグロブリン、ウシ血清アルブミン、カゼイン。食物抗原はまた、パルブアルブミンなどの大西洋サケ抗原；オボムコイド、オボアルブミン、Ag22、コンアルブミン、リゾチーム又はニワトリ血清アルブミンなどのニワトリ抗原；ピーナッツ；トロポミオシンなどのエビ抗原；アグルチニン又はグリアジンなどのコムギ抗原、セロリプロフィリンなどのセロリ抗原；ニンジンプロフィリンなどのニンジン抗原；ソーマチン、リンゴ脂質転送蛋白質、リンゴプロフィリンなどのリンゴ抗原；ナシプロフィリン、イソフラボンレダクターゼなどのナシ抗原；エンドキチナーゼなどのアボカド抗原；アプリコット脂質転移タンパク質などのアプリコット抗原；モモ脂質転移タンパク質又はモモプロフィリンなどのモモ抗原；HPS、ダイズプロフィリン又は(SAM22)PR-IOProtなどのダイズ抗原であり得る。

30

40

【0086】

用語「自己抗原」は、前記個々のタンパク質由来の免疫原性ペプチドを指す。それは、例示として、以下の非限定なリストの自己抗原であり得る：アセチルコリン受容体、アクチン、アデニンヌクレオチド輸送体、アドレナリン受容体、芳香族L-アミノ酸デカルボキシラーゼ、アシアロ糖タンパク質受容体、殺菌性／透過性増加タンパク質(BPI)、カルシウム感知受容体、コレステロール側鎖切断酵素、コラーゲンIV型鎖、シトクロムP450 2D6、デスミン、デスモグレイン1、デスモグレイン-3、F-アクチン、

50

GM-ガングリオシド、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、グルタミン酸受容体、H/K ATPアーゼ、17-ヒドロキシラーゼ、21-ヒドロキシラーゼ、IA-2 (ICAS12)、インスリン、インスリン受容体、内因性因子1型、白血球機能抗原1、ミエリン関連糖タンパク質、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質、ミオシン、P80-coilin、ピルベートデヒドロゲナーゼ複合体E2 (PDC-E2)、ヨウ化ナトリウム共輸送体、SOX-10、甲状腺及び目の筋肉共有タンパク質、サイログロブリン、甲状腺ペルオキシダーゼ、甲状腺刺激ホルモン受容体、組織トランスグルタミナーゼ、転写コアクチP75、トリプトファン水酸化酵素、チロシナーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、ACTH、アミノアシル-tRNA-ヒスチジル-合成酵素、カルジオリピン、炭酸脱水酵素II、セントロメア関連タンパク質、DNA依存性ヌクレオソーム刺激ATPアーゼ、フィブリラリン、フィブロネクチン、グルコース6リン酸イソメラーゼ、 β 2-グリコプロテインI、golgin (95、97、160、180)、熱ショックタンパク質、タンパク質半接着斑性1180、ヒストンH2A、H2B、ケラチン、IgE受容体、KU-DNAタンパク質キナーゼ、Ku核タンパク質、Laリン酸化、ミエロパーオキシダーゼ、プロテイナーゼ3、RNAポリメラーゼI~III、シグナル認識タンパク質、トポイソメラーゼI、チューブリン、ビメンチン、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質 (MOBP)、プロテオリピドタンパク質、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質 (OSP/クロードイン11)、環状ヌクレオチド3'ホスホジエステラーゼ (CNPase)、BPの抗原1 (BPAG1-e)、トランスアルドラーゼ (TAL)、ヒトミトコンドリア自己抗原PDC-E2 (Novo1及び2)、OGDC-E2 (Novo3)、BCOADC-E2 (Novo4)、水疱性類天疱瘡 (BP) 180、ラミニン5 (LN5)、DEAD-ボックスタンパク質48 (DDX48) 又はインスリノーマ関連抗原-2。

【0087】

用語「多発性硬化症関連抗原」は、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質 (MOG)、プロテオリピドタンパク質 (PLP)、ミエリンオリゴデンドロサイトオリゴタンパク質 (OMGP)、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質 (MOBP)、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質 (OSP/Claudin11)、熱ショックタンパク質、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質 (OSP)、NOGO A、糖タンパク質Po、末梢ミエリン蛋白質22 (PMP22)、2'3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ (CNPase)、フラグメント、それらの変異体及び混合物を指す。

【0088】

用語「関節関連抗原」は、シトルリン置換環状及び線状フィラグリンペプチド、コラーゲンII型ペプチド、ヒト軟骨糖タンパク質39 (HCgp39) ペプチド、HSP、ヘテロ核リボ核タンパク質 (hnRNP) A2ペプチド、hnRNP B1、hnRNP D、Ro60/52、HSP60、65、70、90、BIP、ケラチン、ビメンチン、フィブリノゲン、コラーゲンI、II、III、IV及びV型ペプチド、アネキシンV、グルコース6リン酸イソメラーゼ、アセチルカルバスタチン、ピルベートデヒドロゲナーゼ (PDH)、アルドラーゼ、トポイソメラーゼI、snRNP、PARP、Sc1-70、Sc1-100、アニオン性カルジオリピン及びホスファチジルセリンを含むリン脂質抗原、中立的に荷電したホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジルコリン、マトリックスメタロプロテアーゼ、フィブリリン、アグリカン。を指す。

【0089】

用語「アレルゲン」は、吸入されたアレルゲン、摂取されたアレルゲン又は接触したアレルゲンを指す。アレルゲンの例は、花粉 (Cup、Jun)、室内塵性ダニ類 (Der、Gly、Tyr、Lep)、イヌ、ネコ及びげっ歯類 (Can、Fel、Mus、Rat) 由来の吸入されたアレルゲンを含むがそれらに限定されない。接触したアレルゲンの例は、重金属 (例えば、ニッケル、クロム、金など)、ラテックス、ハロタンやヒドララジンなどのハプテンを含むがそれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0090】

本発明の一実施形態において、T r 1細胞の亜集団又は、T r 1様細胞集団に対する抗原は、特定のH S P、好ましくはH S P 60である。

【0091】

本発明の別の目的は、

－細胞集団上のC D 4、及びC D 1 2 7並びにC D 6 2 Lの内の一つの細胞表面発現を検出することと、

－例えば試験Aの条件において、I L－1 3の産生を検出することと、

（ここで、前記細胞は、C D 4（即ち、C D 4⁺である）及び低レベルのC D 1 2 7及び／又は低レベルのC D 6 2 L（即ち、C D 1 2 7^{1 0}／－及びC D 6 2^{1 0}／－）を発現し、I L－1 3産生は、I L－1 3産生T r－1様細胞である）

－前記細胞を同定／単離／定量することと、
を含む、I L－1 3産生T r 1様細胞集団を同定／単離／定量する方法である。

【0092】

本発明の別の目的は、

－細胞集団上のC D 4、及び、C D 1 2 7並びにC D 6 2 Lの内の一つの細胞表面発現を検出することと、

－例えば、試験Aの条件においてI L－1 3及びI L－1 0の産生を検出することと、

（ここで、前記細胞は、C D 4（即ち、C D 4⁺である）及び低レベルのC D 1 2 7及び／又は低レベルのC D 6 2 L（即ち、C D 1 2 7^{1 0}／－及びC D 6 2^{1 0}／－）を発現し、I L－1 3及びI L－1 0産生は、T r－1細胞の亜集団である）

－前記細胞を同定／単離／定量することと、
を含む、I L－1 3及びI L－1 0産生T r 1様細胞集団を同定／単離／定量する方法である。

【0093】

本明細書で上述したように、C D 4、C D 1 2 7及びC D 6 2 Lの細胞表面発現は、抗体である、抗－C D 4、抗－C D 6 2 L、及び抗－C D 1 2 7を使用して検出され得る。

【0094】

I L－1 3及びI L－1 0の産生の検出は、当業者に公知の他の手段によって実施され得る。

【0095】

例えば、I L－1 3又はI L－1 0産生を検出するための第一の方法は、事前に透過処理を行ったT細胞の細胞内染色について、その染色をF A C Sによって読み取らせるために、ラベルされた抗I L－1 3抗体又は抗I L－1 0の使用に依存している。

【0096】

I L－1 3又はI L－1 0産生を検出するための方法の他の例は、ラベルされた抗－I L 1 3又は抗－I L－1 0抗体を用いて実施されるE L I S A試験に依存する。

【0097】

最終的に、I L－1 3産生を検出するための他の例は、M i l t e n y i B i o t e c h社により商品化されたI L－1 3分泌アッセイキット（1 3 0－0 9 3－4 8 0）又はその等価物の使用に依存する。この方法は、透過処理することなく、I L－1 3産生細胞を検出及び濃縮することを可能にするので、特に興味がある。

【0098】

T細胞を含む全ての細胞源は、I L－1 3産生T r 1様細胞又は、I L－1 3及びI L－1 0産生T r 1細胞の亜集団を単離するために使用することができる。有用な供給源は、末梢血、関節液、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄、パイエル板、及び扁桃腺を含むがそれらに限定されない。

【0099】

細胞を分離、単離又は選択するための方法は、抗体で被覆された磁気ビーズを用いた磁

10

20

30

40

50

気分離（Schwartzら、米国特許番号第5,759,793号明細書）及びアフィニティクロマトグラフィー又は個体マトリックス（例えばプレート）に結合した抗体を使用する「パニング」を含むがそれらに限定されない。正確な分離を提供する更なる技術は、蛍光活性化セルソーター（FACS）を含み、これは、複数のカラーチャンネル、低角度及び鈍角光散乱検出チャンネル又はインピーダンスチャンネルを有するなど、様々な程度のソフィスティケーションを有することができる。死細胞は、死細胞に関連つけられた染料（例えば、ヨウ化プロピジウム、LDS）を用いて選択することによって除去することができる。赤血球は、例えば、水簸、溶血、又はFicoll-Paque勾配により除去することができる。選択した細胞の生存率に角に有害ではない任意の技術を使用することができる。

10

【0100】

便利なことに、抗体は、例えば、T_H1細胞の分離を容易にするための磁性ビーズ；アビジン又はストレプトアビジンに高い親和性で結合するビオチン；蛍光活性化セルソーターで使用する蛍光色素；ハプテンなど、多数の異なる目的のラベルを使用して結合することができる。マルチカラー分析は、FACSで用いることができるか又は、免疫磁気分離法及びフローサイトメトリーを組み合わせて用いることができる。マルチカラー分析は、以下のような複数の表面抗原に基づく細胞分離のために興味深い：例えば、非-CD4+免疫細胞マーカー（CD8、CD14、CD16、CD19、CD36、CD56、CD123、TCR γ/δ 及びグリコホリンA）、CD4、CD25、CD127、及びCD62L。マルチカラー分析における使用を見出す蛍光色素は、フィコエリトリン及びアロフィコシアニンなどのフィコビリタンパク質；蛍光及びテキサスレッドを含むがそれらに限定されない。

20

【0101】

磁気分離は、磁場勾配において、選択的に遠心分離管又はカラムなどの容器内の磁性材料を保持するために使用されるプロセスである。T_H1細胞は、免疫親和性の相互作用を含む特定の相互作用を介して細胞表面へ磁性粒子を結合することにより磁氣的にラベルすることができる。適切な容器内のT_H1細胞を含む懸濁液は、次に、懸濁液中の他の細胞からT_H1細胞を分離するのに十分な強さの磁場勾配へ曝す。容器を、次に、ラベルされていない細胞を除去するために適切な流体で洗浄し、T_H1細胞の精製された懸濁液を得られた。

30

【0102】

磁気ラベルシステムの大部分は、モノクローナル抗体又はその表面と共有結合したストレプトアビジンを備える超常磁性粒子を使用する。細胞分離の用途において、これらの粒子は、目的の細胞が磁氣的にラベル及び保持されている陽性選択又は、所望ではない細胞の大部分が磁氣的にラベル及び保持されている陰性選択のいずれかについて使用することができる。使用される粒子の直径は、MACS粒子（Miltenyi Biotec社）及びStemep（商標）コロイド（StemCell Technologies社）については約50~100nm、EasySep（登録商標）（StemCell Technologies社）及びImag粒子（BD Bioscience社）については150~450nm、Dynabeads（DynaL Biotech社）については4.2 μ m以下というように、幅広く変化する。使用される粒子の型は、ラベルされた細胞を分離するために用いられる磁石技術の影響を受ける。

40

【0103】

磁気分離技術の二つの重要なクラスが存在し、その両方は、便宜的及び実用的な理由のために、電磁石とは対照的に、永久磁石を使用している。最初のクラスは、目的の標的をラベルするために、小さな弱磁性粒子を使用し、磁化マトリックスを重点したカラムにおいてこれらの標的物を分離する、カラムベースの高傾斜磁場分離技術である。磁場がカラムに適用される場合、非常に高い勾配が、マトリックス要素の表面近くに発生する。これらの比較的弱磁性の粒子を用いてラベルした標的物を分離するために、高い勾配が必要である。第二のクラスは、目的の標的物をラベルするために、より強い磁性粒子を使用する

50

チューブベースの技術である。これらの目的の標的物を、次に、チューブの外側の磁石によって発生する磁場勾配により、遠心型チューブ内で分離する。この方法は、勾配を精製するために、磁化マトリックスに依存せず、従って、効果な使い捨てカラムも、不便な洗浄及び除染の手順を含む再利用可能なカラムも必要としないという利点を有する。

【0104】

一旦磁石内に配置されると、標的細胞は、最高磁場強度の領域（単数又は複数）へ向かって移動し、ラベルされていない細胞が引き抜かれる一方、磁場内に保持される。標的細胞は、次に、磁場から取り除かれた後、収集され使用することができる。陰性の選択が必要とされる場合には、ラベルされていない細胞が保持され、様々な用途に利用されることができる。

10

【0105】

FACSは、細胞の亜集団がレーザービームを通過する時に、それらの光散乱特性に基づくそれらの分離を可能にする。前方光散乱（FALS）は、細胞サイズ及び直角光散乱に関連し、また、側方散乱特性（SSC）として知られているのは、細胞密度、細胞内含有量及び、核-細胞質比、即ち、細胞の複雑性に関連する。細胞は、蛍光識別抗体でラベルすることができるので、それらは更に、抗体（蛍光）強度により特徴付けることができる。

【0106】

特定の実施形態において、本発明のIL-13産生Tr1様細胞は、免疫-磁気クロマトグラフィーを使用して単離する。例えば、抗-CD4抗体は、磁性ビーズへ付着する。これらの抗体-ラベルされた磁性粒子は、アフィニティー精製の基礎として使用される。T細胞の抗体ラベルされた画分は、磁気親和性カラムへ適用される。非-付着細胞は廃棄され、接着細胞は、磁場を除去することによって磁気カラムから溶出される。別の実施形態において、細胞は、まず、抗体（例えば、抗-CD4）でラベルされ、次に、磁性粒子又は球を運ぶ二次抗体でラベルされる。

20

【0107】

別の実施形態において、Tr1細胞と免疫反応性の二次抗体は、IL-13産生Tr1様細胞の集団を濃縮するために使用することができる。二次抗体の使用は、一般的に当該技術分野において知られている。典型的に、二次抗体は、第一の抗体の定常領域と免疫反応性である抗体である。好ましい二次抗体は、抗-ウサギ、抗-マウス、抗-ラット、抗-ヤギ及び抗-ウマ免疫グロブリンを含み、市販されている。市販のキットは、磁性粒子及び蛍光色素などであるが、それらに限定されない、ラベル化剤に結合させた二次抗体を提供する。

30

【0108】

本発明の別の目的は、

—CD4並びに低レベルのCD127並びに／又はCD62Lを発現し、IL-13を産生する細胞を同定することと、

—前記細胞を選択することと

を含む、IL-13産生Tr1様細胞における細胞集団を濃縮するための方法であり、それによって、IL-13産生Tr1様細胞において濃縮した細胞集団を得る。

40

【0109】

本発明の別の目的は、

—CD4及び低レベルのCD127並びに／又はCD62Lを発現し、IL-13並びにIL-10を産生する細胞を同定することと、

—前記細胞を選択することと

を含む、IL-13及びIL-10産生Tr1様細胞における細胞集団を濃縮するための方法であり、それによって、IL-13及びIL-10産生Tr1様細胞において濃縮した細胞集団を得る。

【0110】

本発明の別の実施形態において、IL-13産生Tr1様細胞において集団を濃縮す

50

るための方法は、

－前記細胞集団を、非－C D 4＋細胞マーカーに結合する少なくとも一つの試薬に接触させ、それにより非－C D 4＋を減少させることと、

－本明細書で上述したように、I L－1 3 産生 T r 1－様細胞を同定し、それらを選択することと、

を含み得る。

【0 1 1 1】

本発明の別の実施形態において、I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞の亜集団を濃縮するための方法は、

－前記細胞集団を、非－C D 4＋細胞のマーカーに結合する少なくとも一つの試薬に接触させ、それにより非－C D 4＋を減少させることと、

－本明細書で上述したように、I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1－様細胞を同定し、それらを選択することと、

を含み得る。

【0 1 1 2】

非－C D 4＋細胞に結合するマーカーの例は、C D 8、C D 1 4、C D 1 6、C D 1 9、C D 3 6、C D 1 2 3 及びグリコホリン A を含むがそれらに限定されない。

【0 1 1 3】

前記マーカーに結合する好ましい試薬は抗体である。更なる実施形態において、抗体は、蛍光色素又は磁性粒子に結合している。別の実施形態において、細胞選択は、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別、磁気選別、アフィニティクロマトグラフィー又はパニング又はそれらの組み合わせによって実行される。

【0 1 1 4】

本発明の別の目的は、前記方法により得られた I L－1 3 産生 T r 1－様細胞の濃縮された集団である。本発明の別の目的は、前記方法により得られた I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞亜集団の濃縮された集団である。

【0 1 1 5】

本発明の別の目的は、濃縮された I L－1 3 産生 T r 1－様細胞集団を含む組成物、濃縮された I L－1 3 産生 T r 1－様細胞集団から本質的に成る又は成る組成物である。

【0 1 1 6】

本発明の別の目的は、濃縮された I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞の亜集団を含む組成物、濃縮された I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞の亜集団から本質的に成る又は成る組成物である。

【0 1 1 7】

本明細書で使用されるように、I L－1 3 産生 T r 1－様細胞の濃縮組成物／集団は、I L－1 3 産生 T r 1－様細胞の割合が、通常得られた細胞集団における I L－1 3 産生 T r 1－様細胞の割合よりも高いものである。可能ではあるが、濃縮された I L－1 3 産生 T r 1－様細胞集団は、産生 T r 1－様細胞の均一な集団を含む必要はない。特定の実施形態において、組成物の前記細胞の、少なくとも約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 8 % 又は約 9 9 % は、I L－1 3 産生 T r 1－様細胞である。別の実施形態において、濃縮された組成物／集団中の I L－1 3 産生 T r 1－様細胞の割合は、濃縮前の I L－1 3 産生 T r 1－様細胞の割合の、少なくとも 2 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、6 0 倍、7 0 倍、8 0 倍、9 0 倍、1 0 0 倍である。

【0 1 1 8】

本明細書で使用するように、I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞の濃縮組成物／集団は、I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞の割合が、通常得られた細胞集団における I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞の割合よりも高いものである。可能ではあるが、I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞の濃縮された集団は、I L－1 3 及び I L－1 0 産生 T r 1 細胞の均一な集団を含む必要はない。特定の実施形態において、組成

物の前記細胞の少なくとも約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 98%又は約 99%は、IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 様細胞である。別の実施形態において、濃縮された組成物／集団中の IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 様細胞の割合は、濃縮前の IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 様細胞の割合の、少なくとも 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍である。

【0119】

T 細胞を含む任意の細胞源は、IL-13 産生 Tr1 様細胞又は IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 細胞を単離／濃縮するために使用することができる。有用な源は、末梢血、関節液、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髓、パイエル板、及び扁桃腺を含むがそれらに限定されない。

10

【0120】

濃縮方法は、濃縮プロセスの各ステップに関連付けられた濃縮のレベルに応じて可変的である。IL-13 産生 Tr1 様細胞又は、IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 細胞の濃縮レベル及びパーセント純度は、ドナー、細胞／組織源及びドナーの疾患の状態を含むがそれらに限定されない多くの要因に依存するであろう。

【0121】

本発明の別の目的は、IL-13 産生 Tr1 様クローンである。

【0122】

本発明の別の目的は、IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 クローンである。

20

【0123】

本発明によると、IL-13 産生 Tr1 様細胞は、本明細書で上述した方法により単離され、次に、IL-13 産生 Tr1 様細胞は、当該技術分野で周知の方法によりクローニングされる。

【0124】

本発明によると、IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 細胞は、本明細書で上述した方法により単離され、次に、IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 細胞は、当該技術分野で周知の方法によりクローニングされる。

【0125】

別の実施形態において、当業者は、CD4 及び低レベルの CD127 及び／又は CD62L を発現する細胞を単離し、前記細胞をクローニングし、次に、活性化すると IL-13 又は IL-10 及び IL-13 産生クローンを単離することができる。

30

【0126】

本発明の別の目的は、IL-13 産生 Tr1 様クローン又は IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 クローンを含む組成物、IL-13 産生 Tr1 様クローン又は IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 クローンから本質的に成る又は成る組成物である。

【0127】

本発明の一実施形態において、IL-13 産生 Tr1 様クローン又は IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 クローンは、低レベルの IL-4 を産生する。

【0128】

本発明の一実施形態において、IL-13 産生 Tr1 様クローン又は IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 クローンは、低レベルの IL-2 を産生する。

40

【0129】

本発明の一実施形態において、IL-13 産生 Tr1 様クローン又は IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 クローンは、中程度のレベルの IFN γ を産生する。

【0130】

本発明の一実施形態において、IL-13 産生 Tr1 様クローン又は IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 クローンは、中程度のレベルの TGF β を産生する。

【0131】

本発明の方法により単離された、IL-13 産生 Tr1 様細胞又は、IL-13 及び

50

I L-10 産生 T r 1 細胞の亜集団は、更に、W O 2 0 0 6 / 1 0 8 8 8 2 に説明されたインビトロ法により増殖し得る。前記方法は、

a) 35℃未満の温度 T 1 で、培養培地 M f 中で、昆虫フィーダー細胞などのフィーダー細胞を培養することと（前記温度 T 1 は、フィーダー細胞の増殖を可能にし、前記フィーダー細胞は、以下の細胞表面タンパク質と相互作用する因子を発現する：

- －C D 3 / T C R 複合体
- －C D 2 8 タンパク質
- －I L-2 受容体
- －C D 2 タンパク質
- －I L-4 受容体)

10

b) T r 1 細胞集団、フィーダー細胞、及び培養培地 M p を含む混合物を得るために、それらの培養培地 M f を取り除いたか又は取り除いていない、ステップ a) で得られたフィーダー細胞を、I L-13 産生 T r 1-様細胞又は培養培地 M p 中に含まれる I L-13 及び I L-10 産生 T r 1 細胞の亜集団と接触させることと（前記培養培地 M p は、ステップ a) に引用される因子を当初は含んでいない）

c) ステップ b) で得られた混合物を、低くても 35℃である温度 T 2 で培養することと（前記温度は、T r 1 細胞集団が増殖し、且つ、フィーダー細胞は増殖しないように、選ばれる）

d) そのようにして増殖した T r 1 細胞集団を回収することとを含む。

20

【0132】

上記の細胞表面タンパク質と相互作用する因子の例は、

－抗-C D 3 抗体、好ましくは、修飾された抗-C D 3 抗体と（前記 C D 3 重鎖の抗-C D 3 細胞質内ドメインは、膜貫通ドメインと置換されている）

－C D 8 0 又は C D 8 6 タンパク質と

－フィーダー細胞から分泌される I L-2 と、

－C D 5 8 タンパク質と、

－I L-4 及び I L-13 を含む群から選択されるインターロイキンと

を含む。

【0133】

30

M p 培地は、T 細胞の培養に適応され、無血清培地であり得る。M p 培地の非限定的な例は、B i o W h i t t a k e r 社の X V I V O 1 5、I n v i t r o g e n 社の A I M V、D M E M、R P M I などの市販の無血清培地である。

【0134】

M f 培地は、フィーダー細胞の培養に適応され、無血清培地であり得る。M f 培地の非限定的な例は、B i o W h i t t a k e r 社の無血清シュナイダー培地、M D G i b c o 社の無血清昆虫細胞培養培地、I n v i t r o g e n 社の S F M 又は K r a c k e l e r サイエントフィック社の I n s e c t a g r o などの市販されている無血清培地である。

【0135】

40

本発明の実施形態において、このようにして得られた T r 1 細胞は、T 細胞をクローニングするための従来の方法を使用することによってクローニングされ得る。

【0136】

本発明の実施形態において、このようにして得られた T r 1 細胞又は T r 1 細胞クローンは、保存のために凍結され得る。

【0137】

本発明の別の目的は、濃縮且つ増殖された I L-13 産生 T r 1-様細胞集団又は、I L-13 及び I L-10 産生 T r 1 細胞亜集団を含む組成物、濃縮且つ増殖された I L-13 産生 T r 1-様細胞集団又は、I L-13 及び I L-10 産生 T r 1 細胞亜集団から本質的に成る又は成る組成物である。

50

【0138】

本発明の別の目的は、I L-13産生T r 1-様細胞又はI L-13及びI L-10産生T r 1細胞において細胞集団を減少させるための方法であり、以下の

－C D 4及び低レベルのC D 1 2 7及び／又はC D 6 2 Lを発現し、且つ、I L-13又はI L-10及びI L-13を産生する細胞を同定することと、

－前記細胞を減少させることと、

を含み、それによって、I L-13産生T r 1-様細胞又は、I L-13及びI L-10産生T r 1細胞において減少された細胞集団を得る。

【0139】

本発明の別の目的は、I L-13産生T r 1-様細胞を減少させた又はI L-13及びI L-10産生T r 1細胞を減少させた細胞集団を含む組成物、それらから本質的に成る又はそれらから成る組成物である。

【0140】

I L-13産生T r 1-様細胞を減少させた組成物／集団又は、I L-13及びI L-10産生T r 1細胞を減少させた組成物／集団は、I L-13産生T r 1-様細胞又はI L-13及びI L-10産生T r 1細胞の割合が、通常得られた細胞集団におけるI L-13産生T r 1-様細胞又はI L-13及びI L-10産生T r 1細胞の割合よりも低いものである。

【0141】

本発明の別の目的は、本明細書で上述した方法により得られたI L-13産生T r 1-様細胞を減少させた細胞集団である。本発明の別の目的は、本明細書で上述した方法により得られた、I L-13及びI L-10産生T r 1細胞を減少させた細胞集団である。

【0142】

本明細書において前述したように、細胞を単離するための方法は、抗体で被覆された磁気ビーズを用いた磁気分離、アフィニティクロマトグラフィー又は個体マトリックス（例えばプレート）に結合した抗体を使用する「パニング」及び蛍光活性化セルソーター（FACS）を含むがそれらに限定されず、選択される代わりに、T r 1細胞は減少されている。

【0143】

一実施形態において、減少された組成物／集団中のI L-13産生T r 1-様細胞又は、I L-13及びI L-10産生T r 1細胞の割合は、除去前のI L-13産生T r 1-様細胞又はI L-13及びI L-10産生T r 1細胞の割合の、少なくとも0.5倍、0.4倍、0.3倍、0.25倍、0.2倍、0.15倍、0.1倍である。

【0144】

本発明の別の目的は、I L-13産生T r 1-様細胞集団を同定若しくは単離するため、又は、I L-13産生T r 1-様細胞中の細胞集団を濃縮若しくは減少させるためのキットであり、前記キットは、C D 4、C D 2 5、C D 1 2 7及びC D 6 2 Lの細胞表面発現を検出するための試薬及び、I L-13産生を検出するための手段を含む。

【0145】

本発明の別の目的は、I L-13及びI L-10産生T r 1細胞集団を同定若しくは単離するため、又は、I L-13及びI L-10産生T r 1細胞中の細胞集団を濃縮若しくは減少させるためのキットであり、前記キットは、C D 4、C D 2 5、C D 1 2 7及びC D 6 2 Lの細胞表面発現を検出するための試薬及び、I L-13及びI L-10産生を検出するための手段を含む。

【0146】

好ましくは、前記試薬は抗体である。更に好ましくは、これらの抗体は、蛍光色素又は磁性粒子に結合している。

【0147】

別の実施形態において、前記キットは更に、F o x p 3発現を検出するための試薬を含む。好ましくは、前記試薬は抗体である。より好ましくは、前記抗体は、蛍光色素と結合

10

20

30

40

50

している。

【0148】

本発明の別の目的は、それを必要とする対象において免疫反応を抑制するための方法であり、本発明による単離又は濃縮された I L - 1 3 産生 T r 1 様細胞の効果的な量を、対象へ投与することを含む。

【0149】

本発明の別の目的は、それを必要とする対象において免疫反応を抑制するための方法であり、本発明による単離又は濃縮された I L - 1 3 及び I L - 1 0 産生 T r 1 細胞の効果的な量を、対象へ投与することを含む。

【0150】

一実施形態において、対象は、骨髄移植又は臓器移植などの移植を受けたか又は現在受けている。

【0151】

別の実施形態において、対象はアレルギーを有する。

【0152】

本発明の別の目的は、それを必要とする対象において炎症性症状を予防又は治療するための方法であり、本発明による、単離又は濃縮された I L - 1 3 産生 T r 1 様細胞又は、単離又は濃縮された I L - 1 3 及び I L - 1 0 産生 T r 1 細胞の有効的な量を、対象へ投与することを含む。

【0153】

本発明の別の目的は、それを必要とする対象において自己免疫症状を予防又は治療するための方法であり、本発明による、単離又は濃縮された I L - 1 3 産生 T r 1 様細胞又は、単離又は濃縮された I L - 1 3 及び I L - 1 0 産生 T r 1 細胞の有効的な量を、対象へ投与することを含む。

【0154】

本発明の一実施形態において、I L - 1 3 産生 T r 1 様細胞濃縮組成物又は、I L - 1 3 及び I L - 1 0 産生 T r 1 細胞濃縮組成物から得られ得る細胞集団は、その後導入される。

【0155】

本発明の一実施形態において、対象は、免疫応答の抑制が望ましい対象であり得る。

【0156】

一実施形態において、対象は、炎症性症状又は疾患／障害の影響を受けたヒトであり、そのような疾患／障害は以下を含む任意の疾患／症状であるがそれらに限定されない：非自己免疫性炎症性腸疾患、術後癒着、冠動脈疾患、肝線維症、急性呼吸窮迫症候群、急性炎症性膵炎、内視鏡的逆行性胆道膵管造影誘発性膵炎、火傷、冠状動脈・脳及び末梢動脈のアテローム発生、虫垂炎、胆嚢炎、憩室炎、内臓の線維性疾患、創傷治癒、瘢痕皮膚疾患（ケロイド、汗腺膿瘍）、肉芽腫性疾患（サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変）、喘息、壊疽性膿皮症、スウィート症候群、ベーチェット病、原発性硬化性胆管炎、膿瘍。

【0157】

別の実施形態において、対象は、自己免疫症状又は、以下を含むがそれらに限定されない疾患／障害の影響を受けたヒトである：紅斑性狼瘡、尋常性天疱瘡、甲状腺炎、血小板減少性紫斑病、バセドウ病、糖尿病、若年性糖尿病、自発的な自己免疫性糖尿病、重症筋無力症、アジソン病、関節リウマチ・強直性脊椎炎・若年性特発性関節炎・乾癬性関節炎などの関節炎、多発性硬化症、乾癬、ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、強皮症、自己免疫性炎症性腸疾患・クローン病・大腸炎・食物アレルギーに関連した腸炎などの腸の炎症性疾患、シェーグレン病、橋本病、重症筋無力症、自己免疫性多腺性内分泌障害症候群、I 型糖尿病（T I D M）、自己免疫性胃炎、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、及び甲状腺炎、並びに、ヒト全身性エリテマトーデスに代表される自己免疫疾患。

【0158】

本明細書で用いる「自己抗原」は、哺乳類に対して先天的であり、前記哺乳類の疾患に

10

20

30

40

50

において免疫原性であり、抗原又はエピトープを意味する。

【0159】

本発明の細胞はまた、移植片対宿主病（GVHD）及び移植片拒絶反応などの移植反応を予防する又は治療するためにも使用することができる。

【0160】

IL-13 産生 Tr1 様細胞又は、IL-13 及び IL-10 産生 Tr1 細胞の患者への導入は、養子細胞移入などの当業者に公知の方法を使用して実施される。簡単に言うと、細胞の混合集団が標的ドナーから抽出される。用途に応じて、細胞は、寛解期の間、又は、進行中の疾患の間に抽出され得る。典型的に、これは、末梢血を採取し、白血球搬出法（白血球フェレーシス）により白血球を採取することによってなされる。例えば、大量の白血球搬出（LVL）が、白血球収量を最大にすることが示されている。採取されたリンパ球は、本明細書中に記載したマーカーなどの Tr1 特異的細胞マーカーに基づく細胞分離法を使用して分離され得、その後、養子免疫抑制のため、典型的には細胞のドナー（ドナーとレシピエントが異なる、GVHD の場合を除く）である患者へ輸血される。約 $10^3 \sim 10^{11}$ 、好ましくは、 $10^4 \sim 10^{10}$ 、好ましくは、 $10^5 \sim 10^9$ 、好ましくは、 $10^6 \sim 10^9$ 、更に好ましくは、 $10^6 \sim 10^8$ の Tr1 細胞が、患者に注入される。

【0161】

本明細書で使用されるように、用語「効果的な量」は、障害又はその一つ以上の症状の低減する（任意の程度まで）又は重症度及び／若しくは継続時間を改善し、障害の進行を防ぎ、障害の寛解を生じさせ、再発、進行を防止するか、又は、別の治療（例えば、予防剤又は治療剤）の予防的もしくは治療的效果（単数又は複数）を促進若しくは改善するのに十分な、治療物質又は組成物の量を意味する。効果的な量は、被験者の年齢、性別、人種、手、全身状態など、治療される症状の重篤度、投与される特定の薬剤、治療期間、任意の併用治療の性質、薬学的に許容される使用される担体、及び、当業者の知識や経験における同様の要因により変化する。必要に応じて、任意の個々における「効果的な量」は、適切な文章及び文献を参照することにより、及び／又は、日常的な実験を使用することにより、当業者により決定することができる（例えば、Gennaro et al.,

Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore MD; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway NJ 参照)。

【0162】

用語「予防する (prevent)」 「予防している (preventing)」 及び「予防 (prevention)」 は、本明細書において、障害の進行若しくは発症の抑制、又は、治療の投与（例えば、予防又は治療剤）による被験者における障害の一つ以上の症状の再発、発症又は進行の予防、又は、治療法の組み合わせ（例えば、予防剤又は治療剤の組み合わせ）の投与を指す。「治療 (treatment)」 又は「治療 (treating)」 は、少なくとも、ホストにおいて障害に伴う症状の改善が達成されたことを意味し、ここで改善は、例えば、治療される状態に関連する症状など、少なくともパラメータの大きさによる低減を参照するために、広い意味で使用されている。このように、治療はまた、病的状態の状況又は少なくともそれに関連する症状の状況を含み、それは、被験者がもはや状態に苦しんでいないか、又は、少なくとも状況の特徴付ける症状に苦しんでいないような、例えば発症の防止などの完全に抑制された状況、又は完治などの停止した状況である。

【0163】

本明細書で使用されるように、用語「対象」は動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトを指す。

【0164】

本発明の別の目的は、それを必要とする対象において移植された細胞集団の免疫応答を強化する方法であり、本明細書で上述するように、IL-13産生Tr1-様細胞を減少させた細胞集団の治療的に有効量を対象へ投与することを含む。

【0165】

本発明の別の目的は、それを必要とする対象において移植された細胞集団の免疫応答を強化する方法であり、本明細書で上述するように、IL-13及びIL-10産生Tr1細胞を減少させた細胞集団の治療的に有効量を対象へ投与することを含む。

10

【0166】

一実施形態において、前記方法は、ガン治療を受けている対象の治療法である。

【0167】

一実施形態において、移植された細胞集団は、抗原特異的なエフェクターT細胞集団である。好ましくは、前記T細胞集団は、黒色腫のMART-1 (MelanA) 又は、黒色腫のMAGE1、2、3、甲状腺髄様、小細胞肺癌、結腸及び／又は気管支扁平上皮癌などの腫瘍抗原に特異的である。

【0168】

別の実施形態において、前記方法は、EBV、HIV、HCV、CMV感染症などの感染性疾患を治療するための方法である。

20

【0169】

制御性T細胞の除去は、ガン患者においてワクチン媒介免疫を増強することが示されている (Dannullら、2005、115 (12) : 3623~3633)。従って、本発明の別の実施形態において、IL-13産生Tr1-様細胞又は、IL-13及びIL-10産生Tr1細胞の除去は、ガン又は感染性疾患を治療するための細胞療法に使用し得ることを示しており、ここで、前記産生Tr1-様細胞又は、前記IL-13及びIL-10産生Tr1細胞は、治療のために悪影響又は有害であり得る。例えば、ガン治療において、IL-13産生Tr1-様細胞又は、IL-13及びIL-10産生Tr1細胞の一時的な除去は、ワクチン接種／免疫療法プロトコルの前に興味深いかもしれず、前記一時的な除去は、本発明の除去法によるデバイスを用いて、ex vivoで患者の血液から減少させることにより得られ、患者にすぐにそれを再注入する。

30

【実施例】

【0170】

実験手順

IL-13産生Tr1-様細胞の探知及び上澄み液の産生

IL-13産生Tr1-様細胞の単離のために、末梢血細胞をFicoll密度遠心分離によって分離し、抗原特異的Tr1-様細胞の増殖を可能にするために、特異的抗原の存在下で 2×10^6 細胞/mlで培養した。培養7日後、細胞を、三週間、限界希釈法によりクローニングした。成長しているクローンを次に、CD3/CD28刺激剤及びサイトカイン (IL-2及びIL-4) を使用して増殖させた。クローンのTr1-様細胞同一性は、活性化された状態でのみ、CD25及びFoxp3の発現を用いてCD62L及びCD127の恒常的随伴性の有無を示す、フローサイトメトリーにより表現型を評価することによって評価した。Tr1-様細胞の上澄み液の産生は、37℃で二日間、X-vivo培地において磁性ビーズ (Dynal) で被覆された抗-CD3+抗-CD28+5%CO2を用いて細胞を刺激することにより得た。

40

【0171】

フローサイトメトリー試験

ヒト細胞におけるフローサイトメトリー試験のために、以下の抗体を使用した：PE-結合抗-CD127 (Beckman Coulter社製クローンR34.34)、B

50

ecton Dickinson社製のFITC-ラベル抗-CD4 Ab (クローン番号RP4-T4)、PeCy5-ラベル抗-CD62L (Becton Dickinson社製のクローンDreg56)、及び、アロフィコシアニン結合抗-CD25 (Becton Dickinson社製のクローンM-A251)。ヒトFoxp3のための細胞質内染色は、製造元の指示に従って、PE結合抗-Foxp3 Ab (BDからのクローン259 D/C7) 及び細胞質染色キット (BD) を使用して実施した。

【0172】

サイトカインアッセイ

サイトカイン産生プロファイル (試験Aの例) の決定のために、Tr1-様細胞クローンを、2ビーズ/細胞濃度の抗-CD3及び抗-CD28を用いて刺激し、上澄み液を48時間後に回収した。ELISAは、Diaclone IFN- γ 社製の市販のキット (IL-10及びIL-4) 及びe-Bioscience社製の市販のキット (IL-13) を使用して実施した。実験は、製造元の指示に従って行った。

【0173】

阻害試験

阻害試験のために、末梢血単核細胞を、可溶性抗CD3モノクローナル抗体 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いて、IL-13産生Tr1-様細胞上澄み液及び抗-IL13 (クローン31606、R&Dシステムズ) 又は組換え型ヒトIL-13 ($6\text{ng}/\text{ml}$ 、R&Dシステムズ) の存在下又は非存在下で、二日間活性化させた。インキュベートした細胞の増殖を、ウェル培養当たりの生存細胞数を評価できるRoche社製のWST1キットを使用して測定した。

結果

【0174】

IL-13によるT-細胞増殖活性の*in vitro*での阻害

第一に、我々は、組換え型ヒトIL-13が、*in vitro*でのT細胞増殖活性を、下方制御することができることを実証したかった。この目的のために、IL-13を、抗-CD3及び抗-CD28モノクローナル抗体で活性化したPBMCの培養へ加え、細胞の増殖は、培養三日後に測定した (図1)。結果は、IL-13は*in vitro*でT細胞増殖を阻害することができ、このサイトカインの免疫抑制の可能性を示すことを実証している。

【0175】

IL-13産生Tr1-様細胞による、T-細胞増殖活性の*In vitro*での阻害

我々は、従って、抑制性サイトカインとしてIL-13を使用して、実験の設定と同じ種類で、IL-13産生Tr1-様細胞が、バイスタンダーTリンパ球の活性を阻害することが可能か否かを知りたかった。図2Aは、高いIL-13分泌であるが、IL-4は全く分泌されずに、抗-CD3及び抗-CD28モノクローナル抗体により活性化したIL-13の調節細胞のサイトカイン分泌パターンを示す。図2Bは、活性化したIL-13産生調節細胞の上澄み液は、培養中のバイスタンダーT細胞の活性化を阻害することができることを示している。重要なことには、IL-13阻止抗体を使用してT細胞増殖のこの上澄み液媒介抑制が阻害され (図2C)、これらのサイトカインは、これらの細胞から分泌される腫瘍な抑制性可用性因子を表す。

【0176】

ヒトIL-13産生調整細胞の表現型

最後に、我々は、IL-13調節細胞によりいくつかの調節細胞マーカーの発現を試験し、細胞は、CD127、CD62L及びFoxP3分子を発現しないことを示した。更に、三つのマーカーから、Foxp3とCD25は、最大活性化後調節されている (図3)。

【0177】

IL-13及びIL-10を産生することができるTr1細胞の亜集団

図4は、試験Aの条件におけるTr1細胞は、二つの集団に分けることができる: Tr

10

20

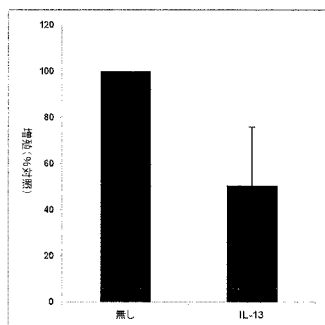
30

40

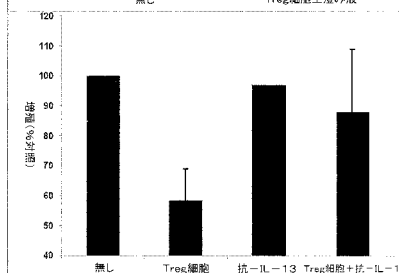
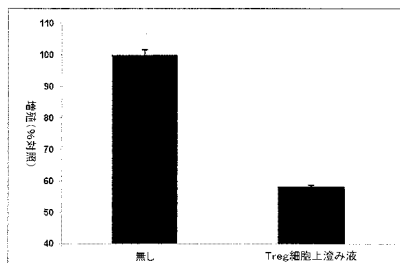
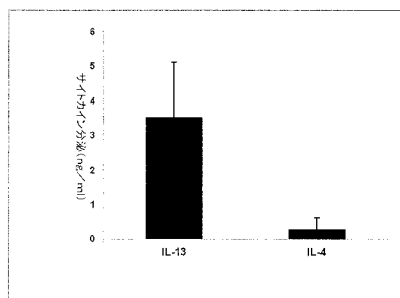
50

1細胞の一方の亜集団は、IL-10を産生することができるがIL-13を産生することができず、他方のTr1細胞の亜集団は、IL-10及びIL-13を産生することができる。

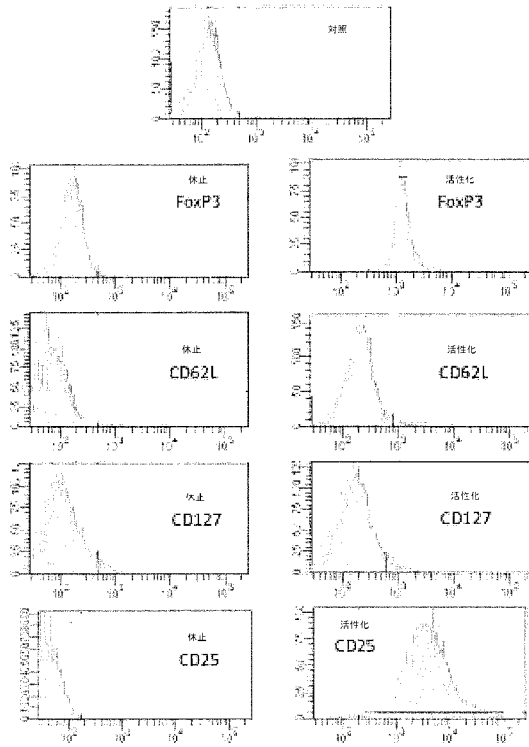
【図1】



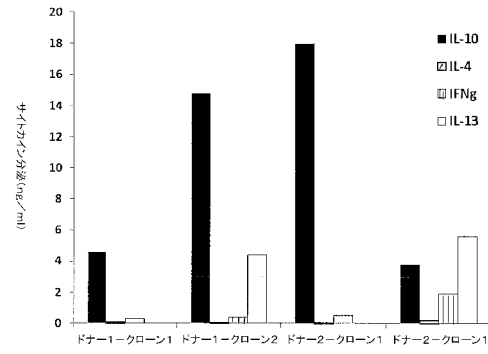
【図2】



【図 3】



【図 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/002269

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
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, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RONCAROLO MARIA GRAZIA ET AL: "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans", IMMUNOLOGICAL REVIEWS, BLACKWELL PUBLISHING, MUNKSGAARD, vol. 212, 1 August 2006 (2006-08-01), pages 28-50, XP002513979, ISSN: 0105-2896, DOI: 10.1111/J.0105-2896.2006.00420.X	1-7, 10-12, 14,15
A	the whole document ----- -/--	8,9,13

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 March 2012

Date of mailing of the international search report

10/04/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Zuber Perez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/002269

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRUN V ET AL: "Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases", INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 9, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 609-613, XP026067811, ISSN: 1567-5769, DOI: DOI:10.1016/J.INTIMP.2009.01.032 [retrieved on 2009-02-11]	1-7, 10-12, 14,15
A	the whole document section 2.1; page 609 - page 610 page 610; figure 1	8,9,13
X	BRUSKO TODD M ET AL: "Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities", IMMUNOLOGICAL REVIEWS, BLACKWELL PUBLISHING, MUNKSGAARD, vol. 223, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 371-390, XP002596194, ISSN: 0105-2896	1-7, 10-12, 14,15
A	the whole document "Tregs:master regulators of peripheral tolerance"; page 372 page 373; figure 1	8,9,13
X	ALLAN SARAH E ET AL: "CD4(+) T-regulatory cells: toward therapy for human diseases", IMMUNOLOGICAL REVIEWS, vol. 223, June 2008 (2008-06), pages 391-421, XP002612336, ISSN: 0105-2896	1-7, 10-12, 14,15
A	the whole document section "Tr1 cells"; page 392	8,9,13
A	DEEPAK PRAVEEN ET AL: "IL-13 from T(h)2-type cells suppresses induction of antigen-specific T(h)1 immunity in a T-cell lymphoma", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 22, no. 1, January 2010 (2010-01), pages 53-63, XP002612338, ISSN: 0953-8178 the whole document	1-15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/002269

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OCHOA-REPARAZ JAVIER ET AL: "IL-13 production by regulatory T cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis independently of autoantigen", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 181, no. 2, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 954-968, XP002612335, ISSN: 0022-1767 the whole document -----	1-15

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	35/14	(2006.01)	A 6 1 K 35/14	Z
G 0 1 N	33/68	(2006.01)	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N 33/48	M
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

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

(72)発明者 バスチアン, エルヴェ
フランス国, エフー０６８１０ オリボー－シュルーシアーニュ, ヴィラ ２５, ドマーニ ド
カレル, シェマン ド カレル, ３６５

(72)発明者 ブルン, バレリー
フランス国, エフー０６４１０ ビオット, アベニユー デ セント フィリップ, ３５, ル ハ
ミュー デ テンプリアーズ

(72)発明者 カッタナン, ブリジット
フランス国, エフー０６２１０ マンドゥリユーラ ナプール, レジデンス グラン コトー, ア
ヴェニュー デュ グラン コトー, ２６１

Fターム(参考) 2G045 AA24 CB01 DA36
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ79
4B065 AA93X AC14 AC20 BC03 BC07 CA44 CA46
4C087 AA01 AA02 BB43 CA04 DA20 NA14 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13