

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4601166号
(P4601166)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.

GO 1 N 33/53 (2006.01)

F 1

GO 1 N 33/53

Y

請求項の数 14 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2000-548729 (P2000-548729)
 (86) (22) 出願日 平成11年5月10日 (1999.5.10)
 (65) 公表番号 特表2002-514765 (P2002-514765A)
 (43) 公表日 平成14年5月21日 (2002.5.21)
 (86) 國際出願番号 PCT/US1999/010200
 (87) 國際公開番号 WO1999/058977
 (87) 國際公開日 平成11年11月18日 (1999.11.18)
 審査請求日 平成18年4月26日 (2006.4.26)
 (31) 優先権主張番号 60/085,136
 (32) 優先日 平成10年5月11日 (1998.5.11)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500518843
 ミルテニイ バイオテック ゲーエムベーハー¹
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94089, サニーベール, ボーデックス
 ドライブ 1190, アムセル コーポレイション内
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (72) 発明者 アッセンマッハー, マリオ
 ドイツ国 ベルギッシュ グラッドバッハ
 デー-51429, フリードリッヒ
 エバート シュトラーセ 68

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗原特異的T細胞の直接的選択方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原特異的T細胞を、該細胞によって分泌されそして放出された産物で標識する方法であって、ここで、該産物は抗原刺激に応答して分泌され、該方法は、以下の工程：

a) 該抗原特異的T細胞を、少なくとも1つのT細胞の抗原特異的刺激を誘発するに有効な条件下にて、少なくとも1つの抗原に暴露し、該刺激されたT細胞による少なくとも1つの産物の発現を可能にする工程であって、ここで、該産物は、抗原刺激に応答して分泌される、工程；

b) 該細胞の表面を、該産物に特異的な捕獲部分を含むように改変する工程であって、その結果、該捕獲部分が該細胞表面に結合される、工程；および

c) 該細胞を、該産物が分泌され、放出され、そして該捕獲部分に特異的に結合される条件下で培養して、それによって該産物分泌細胞を標識する工程；
を包含し、ここで、工程(a)および(b)は、任意の順序で行われ得、そして該抗原特異的T細胞は、細胞の混合集団中に存在する、方法。

【請求項2】

前記捕獲部分が、抗体または抗体の抗原結合フラグメントである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記抗体が二重特異性抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

10

20

前記捕獲部分が、以下の(a)～(d)を通じて前記細胞の表面に結合される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法：

- (a) 該捕獲部分に結合される脂質アンカー；
- (b) 該捕獲部分に結合される抗体またはその抗原結合フラグメント；
- (c) 該細胞表面上の成分への該捕獲部分の直接的な化学結合；または
- (d) 該細胞への該抗体の特異的結合。

【請求項 5】

前記脂質アンカーが、連結部分を介して前記捕獲部分に結合される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体または抗体の抗原結合フラグメントが、結合剤を介して前記捕獲部分に結合される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞の表面が、工程(b)において、該細胞を、細胞表面分子および前記産物に特異的な結合部位を有する少なくとも 1 つの二重特異性抗体と結合させることによって改変される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞表面分子が、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11b、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD38、CD40L、CD45RO、CD45RA、LAG3、T1/SST2、SLAM、クラスI MHC 分子、クラスII MHC 分子、T 細胞抗原レセプター、または₂-ミクログロブリンである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記産物を標識部分で標識する工程をさらに包含する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記標識部分が、前記産物に特異的な抗体である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記標識部分が、発蛍光団、放射性同位元素、発色団、磁化可能部分で直接的もしくは間接的に標識されるか、または磁気粒子を含むかのいずれかである、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記標識部分が、直径が 5～200 nm のコロイド状磁気粒子を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞が、高粘性培地またはゲル形成培地で培養される、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記細胞を、該細胞が標識される程度に従って分離する工程をさらに包含する、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術的分野)

本発明は、細胞集団の分析および細胞分離ならびにそれよって得られた組成物の分野におけるものである。より具体的には、本発明は、細胞表面に固定または結合した、産物に特異的な結合パートナーによってこれらの産物を捕獲することによって、細胞をその細胞が分泌した産物で一次標識することに基づく、抗原特異的 T 細胞の分析および分離に関する。

【0002】

(背景技術)

10

20

30

40

50

細胞が産生する産物に基づいて細胞の集団を分析し、そして細胞を分離する多くの試みがなされてきた。細胞分析および分離に対するそのようなアプローチは、所望の産物（「産物」）を分泌し得る細胞、または産物を比較的多く分泌する細胞を評価するのに特に有用である。これらの方針は、マイクロタイタープレートにおけるクローニングそして培養上清の産物についての分析、寒天におけるクローニングそして局在性の細胞の産物の同定方法による分析を含む。同定方法は、例えば、ブラークアッセイおよびウェスタンプロットティングを含む。産物の分泌に基づく細胞の分析方法および分離方法のほとんどは、細胞の物理的単離、続いて産物の分泌が可能な条件下でのインキュベーション、および細胞の位置をスクリーニングして産物を産生する細胞または細胞クローンを検出することを含む。細胞が懸濁液中にある場合、細胞が産物を分泌した後、その産物は、その産物が分泌された細胞を同定し得るマーカーを残すことなく細胞から拡散する。従って、この型の系では、分泌細胞は非分泌細胞から分離され得ない。

【0003】

別の場合には、分泌細胞および非分泌細胞の両方が産物を細胞膜に結合し得る。この型の系の例は、モノクローナル抗体を産生するB細胞由来の細胞株である。これらの型の細胞株は、蛍光活性化セルソーター（FACS）および抗体細胞表面マーカーの存在に依存する他の方法によって分離されたことが報告された。しかし、細胞表面に自然に結合するマーカーによって細胞を分析および分離する手順は、正確に同定し得ず、および／または非分泌細胞から分泌細胞を分離するのに使用し得ない。加えて、これらのようない系は分泌細胞の量的な相違（すなわち、低レベルの分泌細胞と高レベルの分泌細胞）を同定するのに有用でない。

【0004】

産物の細胞からの拡散に伴う問題を克服するために使用された方法は、細胞からの拡散速度を阻害する培地に細胞を配置することであった。代表的な方法は、細胞をゲル様培地（寒天）に固定化し、そして次いでプロットティング（例えば、ウェスタンプロット）による系を用いて、寒天プレートを産物の産生についてスクリーニングすることであった。これらの系は、多くの細胞を分泌、非分泌の性質、または分泌量について分析する場合には、煩雑かつ高価である。

【0005】

Kohlerらは、ネガティブ選択系を記載した。ここでは、抗トリニトロフェニル（抗TNP）特異性を有するIgMを分泌するハイブリドーマ株の変異体が、ハプテン（すなわちTNP）を細胞表面にカップリングさせ、そしてその細胞を補体の存在下でインキュベートすることによって濃縮された。この方法では、野生型IgMを分泌する細胞が溶解されたのに対し、減少された溶解活性を有するIgMを分泌する細胞またはTNPに結合しないIgMを分泌する細胞は、優先的に生存した。KohlerおよびSchulman（1980）Eur.J.Immunol. 10: 467-476.

より最近には、分泌産物に基づく細胞の標識および分離のための系が記載された。PCT/US93/10126。この系では、分泌産物に対する特異的結合パートナーを細胞の表面に結合させる。産物は分泌され、放出され、そして特異的結合パートナーによって細胞に結合する。次いで、細胞を結合産物で標識された細胞の程度に基づいて分離する。

【0006】

他の系は、細胞がその産物をアガロースゲルの微小滴のコンテクスト（context）に分泌することを可能にする。これは分泌産物に結合する試薬を含み、そしてその細胞をカプセル化する。そのような方法は、Nirら（1990）Applied and Environ.Microbiol. 56: 2870-2875；およびNirら（1991）Applied and Environ.Microbiol. 56: 3861-3866による出版物で開示された。これらの方法は、種々の理由で不満足なものである。マイクロカプセル化（microencapsulation）の過程で、カプセル中の細胞数の統計的な封入（trapping）が起こり、低細胞濃度でカプセル化が起こった場合多くの空のカプセルが生じ、または高細胞濃度でカプセル化が起こった場合1カプ

10

20

30

40

50

セルあたり複数の細胞を含むカプセルが生じる。分泌産物は捕獲抗体によってアガロース滴に捕らえられ、そして第二の蛍光色素化抗体によって検出される。このプロセスは、分泌産物に基づく細胞の検出および単離を可能にするが、複雑であり、特別な装置を必要とし、そして全ての型のソーティング方法に適していない。

【0007】

この技術によって単一の細胞または単一の細胞塊を分析および分離するためには、空のカプセルの数およびマイクロカプセルの大きさ(50~100 μm)のために、比較的少数の細胞で作業するのに大量の容積を扱わなければならない。大量の容積の小滴は、フローサイトメトリー分析および分離を用いた場合バックグラウンドの問題を引き起こす。加えて、カプセルは磁気ビーズを用いた分離または細胞分離のためのパニングを許容しない。

10

【0008】

標識を細胞表面に結合させるのに種々の方法が使用してきた。ここでは、蛍光色素のような標識は直接的な検出を意図する。例えば、蛍光標識を細胞に結合させるために細胞膜に挿入された疎水性リンカーが、1990年3月8日に発行されたPCT WO90/02334に記載された。HLAに対する抗体もまた、標識を細胞表面に結合させるために使用された。そのような結合は、上記で記載したカプセル化小滴より少量の容積になり、そしてそのような細胞は、フローサイトメトリーおよび磁気分離を含む標準的な分離手順で簡便に使用され得る。

【0009】

ELISPOTアッセイおよび細胞内サイトカイン染色方法が、抗原特異的CD4⁺およびCD8⁺T細胞の計数および特徴づけに使用された。Lalvaniら(1997)J. Exp. Med. 186:859-865; およびWaldropら(1997)J. Clin. Invest. 99:1739-1750。これらの方法はT細胞エピトープマッピングまたはワクチン試行で免疫原性をモニターするのに非常に有用であり得るが、例えば、ガンまたは感染に対する特異的養子免疫療法の臨床試行のために、生の抗原特異的T細胞を単離することができない。Kernら(1998)Nat. Med. 4:975-978; El Ghazalিら(1993)Curr. Opin. Immunol. 23:2740-2745; およびYeeら(1997)Curr. Opin. Immunol. 9:702-708。

20

【0010】

ペプチドを含んだ主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子の可溶性多価複合体が、抗原特異的T細胞を検出し、そして単離もするために最近開発された。Altmanら(1996)Science 274:94-96; Dunbarら(1998)Curr. Biol. 8:413-416; Oggら(1998)279:2103-2106; Luxembourgら(1998)Nat. Biotechnol. 16:281-285; Murali-Krishnaら(1998)Immunity 8:177-187; Gallimoreら(1998)J. Exp. Med. 187:1383-1393; およびFlynnら(1998)Immunity 8:683-691。これらの試薬は高度に特異的であるが、そのアプローチは良く定義された抗原性ペプチドおよび制限HLA対立遺伝子の組み合せに限られる。

30

【0011】

免疫系は2つの型の抗原特異的細胞を含む(B細胞およびT細胞)。T細胞は、それらが抗原を認識する方法によって、それらの細胞表面マーカーによって、およびそれらの分泌産物によって、表現型的に特徴付けられ得る。可溶性抗原を認識するB細胞とは異なり、T細胞は、抗原が他の細胞の表面に主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子と結合した小フラグメントの形態でT細胞に提示された場合のみ抗原を認識する。表面に抗原フラグメントと結合したMHC分子を発現するあらゆる細胞は、抗原提示細胞(APC)と考えられる。しかし、ほとんどの場合、細胞表面のMHC結合抗原フラグメントの单なる提示以上のものが、Tリンパ球を活性化するのに必要である。抗原を含むMHC分子によって作動するT細胞レセプター(TCR)によって伝達されるシグナルに加えて、T細胞は

40

50

また A P C からの補助刺激シグナルも受け取らなくてはならない。代表的には A P C は樹状細胞、マクロファージまたは活性化 B リンパ球である。

【 0 0 1 2 】

T 細胞は特有の膜分子を発現する。これらには、 C D 3 と結合して細胞表面に現れる T 細胞抗原レセプター (T C R) ; ならびに C D 5 、 C D 2 8 、および C D 4 5 R のようなアクセサリー分子が含まれる。T 細胞の部分集団はさらなる膜分子の存在によって区別され得る。従って、例えば、 C D 4 を発現する T 細胞はクラス I I M H C 分子と結合した抗原を認識し、そして一般的にはヘルパー細胞として機能する。一方、 C D 8 を発現する T 細胞は、クラス I M H C 分子と結合した抗原を認識し、そして一般的には細胞傷害性細胞として機能する。T 細胞の C D 4 + 部分集団は、細胞によって分泌されるサイトカインの型に基づいて、さらに少なくとも 2 つのサブセットに分類され得る。従って、両方のサブセットは I L - 3 および G M - C S F を分泌するが、 T H 1 細胞は一般的に I L - 2 、 I F N - および T N F - を分泌し、一方 T H 2 細胞は一般的に I L - 4 、 I L - 5 、 I L - 1 0 および I L - 1 3 を分泌する。
10

【 0 0 1 3 】

M H C 分子に結合するペプチドの小さな変更は、ペプチド - M H C 分子相互作用の親和性に影響を与える。しかし、それらは増殖および完全な T 細胞応答の間に產生されるサイトカインの一部分のみの分泌によって特徴付けられる、中間の応答を起こす部分的なシグナルを生成し得る。いくつかの修飾ペプチドは増殖およびサイトカインの分泌を全く阻害し、そして T 細胞アネルギーまたは無応答性の状態を誘導されし得る。従って、 3 つの異なる型のペプチドが存在する：アゴニスト（完全な応答を刺激する）、部分的アゴニスト（部分的な応答を刺激する）、およびアンタゴニスト（無応答性を誘導する）である。 20
1 つの A P C がその表面にアゴニストおよびアンタゴニストの混合物を提示する場合、アンタゴニストがアゴニストより非常に少量しか存在しなくとも、後者の負の効果は前者の正の効果を圧倒し得る。いくつかのウイルスは、そのタンパク質の変異を使用して、本来の野生型ウイルス由来のアゴニストペプチドを認識する T 細胞クローニング活性を抑制し得るアンタゴニストペプチドを产生するようである。

【 0 0 1 4 】

T 細胞による特定のサイトカインの分泌は、一般的に特定の機能と関連する。例えば、 C D 4 + T 細胞の T H 1 および T H 2 サブセットによって分泌されるサイトカインの相違は、これら 2 つのサブセットの異なる生物学的機能を反映すると考えられる。 T H 1 サブセットは遅延型過敏症および細胞傷害性 T 細胞の活性化のような、古典的な細胞媒介機能を担い、一方 T H 2 サブセットは B 細胞活性化のヘルパーとしてより効率的に機能する。 T H 1 サブセットは、細胞傷害性 T 細胞を活性化する I L - 2 および I F N - を分泌するので、特にウイルス感染および細胞内病原体に反応するのに適当であり得る。 I L - 4 および I L - 5 はそれぞれ I g E の產生および好酸球の活性化を誘導することが公知であるので、 T H 2 サブセットは細胞外の細菌および寄生虫性寄生生物（ h e l m i n t h i c p a r a s i t e ）に反応するのにより適当であり得、およびアレルギー反応を媒介し得る。 T H 1 細胞の選択性的な活性化が多くの自己免疫疾患の病因において中心的な役割を果たしていることを示唆する多くの証拠も存在する。 T H 2 細胞による I L - 1 0 の分泌は、間接的な様式で T H 1 細胞によるサイトカインの產生を抑制すると考えられ、そして従って、一般的な免疫抑制効果を有する。 T H 1 / T H 2 バランスのシフトが、例えば、アレルギー反応、または細胞傷害性 T 細胞応答の増加を生じ得る。
30
40

【 0 0 1 5 】

T C R によって始まる、活性化の最初の数分から数時間での変化は、細胞を細胞周期の G 0 期から G 1 期へと移行させる。刺激の数時間後、 T 細胞は I L - 2 および高親和性 I L - 2 レセプターを発現し始める。 I L 2 遺伝子の発現は、 T C R 、 C D 2 8 、およびおそらく他の T 細胞表面分子の連結によって引き起こされる、収束するシグナル伝達経路により活性化される 1 組の転写因子により影響される。

【 0 0 1 6 】

転写因子はまた、高親和性 I L - 2 レセプターの サブユニットをコードする C D 2 5 遺伝子の発現を誘導する。 I L - 2 と高親和性レセプターとの相互作用は、 T 細胞を細胞周期の G 1 期から S 期へ移行させ、そして細胞分裂へと進行させるシグナル伝達経路を開始する。シグナル伝達経路は、細胞分裂に必要ないくつかの重要なタンパク質の発現および活性を調節する。これらのいくつかはまた、 T C R - および C D 2 8 - 依存性シグナルによって直接的に活性化され、一方、他は I L - 2 レセプターを介して提供されるシグナルによってのみ活性化される。

【 0 0 1 7 】

刺激された T 細胞は、休止期から有糸分裂、そして後にエフェクター細胞および記憶細胞への分化への進行に始まる、一連の表現型の変化を受ける。最も早い(即時)の変化の中で、刺激から 15 ~ 30 分以内に観察可能であるのは、 c - F o s 、 N F - A T 、 c - M y c 、および N F - B のような転写因子、 J a k - 3 のようなタンパク質キナーゼ、および P a c - 1 のようなタンパク質ホスファターゼをコードする遺伝子の発現である。それに続く初期の変化は、刺激から数時間以内に起こり、活性化抗原をコードする遺伝子の発現の開始を特徴付ける。これらとしては、いくつかのサイトカイン(I L - 2 および他)、 I L - 2 レセプターサブユニット(C D 2 5)、インスリンレセプター、トランスフェリンレセプター、および C D 2 6 、 C D 3 0 、 C D 5 4 、 C D 6 9 および C D 7 0 のような他のいくつかの表面分子が挙げられる。

10

【 0 0 1 8 】

活性化抗原は最初の分裂の直前、刺激から 24 時間後に最大の発現レベルに達する。この期間、休止期の T 細胞すでに発現しているいくつかの他の分子の発現レベルが上昇する。後に、活性化開始の数日後、後期活性化抗原が T 細胞上に発現されるようになる。これらは M H C クラス I I 分子および 1 インテグリンファミリーのいくつかのメンバーを含む。後期活性化抗原の発現は、活性化細胞のエフェクター細胞または記憶 T 細胞への分化を特徴付ける。

20

【 0 0 1 9 】

T 細胞は、自己免疫、炎症、細胞傷害性、移植片拒絶、アレルギー、遅延型過敏症、 I g E 媒介性過敏症、および体液性応答の調節に重要な役割を果たす。自己反応性 T 細胞の活性化、アレルギー反応を起こす T 細胞の活性化、またはヒトタンパク質を模倣する抗原(これらのタンパク質は「自己抗原」になる)を産生し得る特定の細菌および寄生生物の感染に続く、自己反応性 T 細胞の活性化によって病的状態が起こり得る。これらの疾患は例えば、自己免疫疾患、特定の細菌または寄生生物の感染の 2 次的な結果として起こる自己免疫障害、 T 細胞媒介性アレルギー、および乾癬および脈管炎のような特定の皮膚疾患を含む。さらに、外来性抗原の望ましくない拒絶が移植片拒絶または不妊さえも引き起こし得、そしてそのような拒絶は特定の T リンパ球集団の活性化によるものであり得る。病的状態はまた、腫瘍またはウイルス感染に対する不適当な T 細胞の反応によって起こり得る。これらの場合、腫瘍を抑制または排除するために、または感染を根絶するために、抗原特異的 T 細胞応答を増加させることが望ましい。

30

【 0 0 2 0 】

自己免疫疾患は様々な原因を有する。例えば、自己免疫反応は損傷またはコラーゲンによる免疫化によって、スーパー抗原によって、遺伝的要因によって、または免疫調節の異常(error)によって起こり得る。スーパー抗原は、他のものの中でも、自己抗原と出会うことによって前にアレルギー化されたクローン、またはそれらの低い発現または利用可能性のために潜在的な自己抗原を無視したクローンを刺激し得る、ポリクローナルアクチベーターである。特定の自己免疫疾患は主に自己抗体によって起こり、他は T 細胞によって媒介される。自己反応性 T 細胞は、慢性関節リウマチおよび多発性硬化症を含む多くの自己免疫疾患において、組織の損傷を引き起こす。

40

【 0 0 2 1 】

自己免疫障害の処置において、非特異的な免疫抑制剤が、疾患を遅らせるために使用されてきた;これらの治療はしばしば、免疫適格細胞を無作為に殺傷または阻害することによ

50

つて一般的な免疫抑制を引き起こす。自己反応性T細胞の活性を調節することによって自己免疫障害を処置する試みは、TCRペプチドによる免疫、インターフェロン- γ (IFN- γ)による処置およびTリンパ球ワクチン接種を含んでいた。Ebers (1994) Lancet 343: 275-278; Hohlfeld (1997) Brain 120: 865-916; およびHaflerら (1992) Clin. Immunol. Immunopathol. 62: 307-313.

アレルギー感作、接触過敏症および炎症の発達は、プロアレルギー性機能を示すT細胞の活性化および刺激に依存する。アレルゲン特異的T細胞は、アトピー性アレルギーの病態生理学において重要な役割を果たしていると考えられる。アレルゲン特異的T細胞の排除または抑制は、そのようなT細胞によって起こるアレルギー性疾患の改善に役立ち得る。

10

【0022】

アレルギー反応の初期相で、身体に入った抗原（アレルゲン）はAPCによって取り込まれ、クラスII MHC分子のからみでAPCによって提示され、そしてヘルパーT細胞前駆体によって認識される。これらは刺激されて増殖し、そして主にTH2細胞に分化する。TH2細胞はBリンパ球が抗原産生プラズマ細胞に分化するのを補助する。他のあらゆる抗体媒介性反応と同様に、TH細胞から特異的な補助を受けたB細胞は、それらの表面レセプターを介してアレルゲンを認識する細胞である。TH2細胞によって產生されるサイトカインのいくつか、特にIL-4およびIL-13は、B細胞を刺激して免疫グロブリンA1ソタイプの切換えを引き起こし、そしてIgE抗体を產生させる。抗体は結合組織および粘膜にある肥満細胞表面のレセプター、ならびに循環および粘膜にある好塩基球表面の高親和性Fcレセプターに結合し、そしてアレルギー反応の発現を開始する。

20

【0023】

同種移植片拒絶は主に、移植片細胞上に発現する同種抗原（主にMHC分子）に応答する細胞媒介性免疫応答によって起こる。同種移植片拒絶に関わるTリンパ球部分集団の分析は、CD4 $^{+}$ およびCD8 $^{+}$ の両集団を含んでいた。TH1細胞は遅延型過敏症の炎症性反応を開始し、単球およびマクロファージの移植片への漸増を引き起こす。おそらく、レシピエントに存在するMHC分子が移植片に存在しないことにより警戒態勢にあるナチュラルキラー(NK)細胞がまた、応答の初期に移植片を攻撃し得る。好中球は主に、同種移植片拒絶の後期において、創傷の浄化(cleaning)、または損傷した細胞および細胞断片の除去を担う。

30

【0024】

開発されたほとんどの免疫抑制処置は、非特異的であるという不利な点を有する。すなわち、それらは一般化した免疫抑制を引き起こし、このことはレシピエントを増加した感染の危険にさらす。臓器拒絶を予防するために利用される免疫抑制剤は、アザチオプリン、シクロホスファミドおよびメトトレキサートのような有糸分裂インヒビター；コルチコステロイド；ならびにシクロスボリン、FK506、およびラパマイシンのような、IL-2およびIL-2に対する高親和性レセプターをコードする遺伝子の転写を阻害する薬剤を含む。

【0025】

ガンの処置において、細胞性免疫療法が、化学療法および放射線療法のような従来の治療の代わりに、またはその補助として利用してきた。例えば、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答が、腫瘍細胞によって特異的にまたは優先的に提示される抗原に対して指向され得る。適切に提示された腫瘍抗原の存在下での、T細胞サイトカインによる活性化に続いて、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)が培養中で増殖し、そして強力な抗腫瘍細胞溶解性の特性を獲得する。Weidmannら (1994) Cancer Immunol. Immunother. 39: 1-14。

40

【0026】

インビトロで活性化したリンパ球集団をガン患者へ導入することは、いくらか成功を収めた。腫瘍を後退させるために、ガン患者に免疫学的活性な細胞を注入する養子免疫療法は、数十年間ガン治療の魅力的なアプローチであった。2つの一般的なアプローチが探求さ

50

れた。1つ目は、組織適合性抗原の発現の相違に基づいて宿主の腫瘍に対して自然に反応性であるドナー細胞か、または種々の「免疫」技術を用いて反応性にしたドナー細胞を採取する。次いで、これらの活性化ドナー細胞を、腫瘍保有宿主に輸注する。2つ目の一般的なアプローチでは、ガン患者からリンパ球を採取し、エキソビオで腫瘍に対して活性化し、次いで、この患者に再び注入する。Triozzi (1993) Stem Cells 11: 204-211; およびSussmanら (1994) Annals Surg. Oncol. 1: 296.

ガン処置の現在の方法は、比較的非選択的である。手術は冒された組織を除去し、放射線療法は固形腫瘍を縮小し、そして化学療法は速く分裂する細胞を殺傷する。特に、化学療法剤の全身性送達は、多くの副作用を引き起こし、いくつかの場合においては、潜在的に有効な薬剤の使用を排除するほど重篤である。

【0027】

ウイルス性疾患もまた、免疫療法の候補である。Heslopら (1996) Nature Medicine 2: 551-555。ウイルス病原体に応答する免疫学的応答は、時にはウイルスを根絶または十分に激減させるのに無効である。さらに、ヒト免疫不全ウイルスのような、特定のウイルスの高度に突然変異を起こしやすい性質は、それらが免疫系から逃れることを可能にする。

【0028】

明らかに、上記で述べた病因に関するT細胞の集団を同定し、分析しそして富化(enrich)する必要性がある。現在、抗原特異的T細胞および/またはサイトカイン分泌T細胞の分析および富化のためのいくつかの方法が存在する。抗原特異的T細胞の富化は、T細胞株およびT細胞クローンを得るための選択培養技術を用いて達成され得る。これらの技術は一般的に、T細胞をインビトロで数週間以上の期間培養すること、そしてサイトカイン分泌のような望ましい表現形を示す株またはクローンを選択するためのより煩雑な方法を使用することを含む。抗原特異的T細胞を検出および富化する他の試みは、規定された多量体のMHC抗原およびMHC-ペプチド複合体を利用した。米国特許第5,353,363号。しかし、そのような技術が成功するためには、正しいMHCアロタイプのMHC-抗原複合体が必要であり、そして選択は抗原特異性に限定される（すなわち、この技術によって生じるサイトカイン分泌についての選択ではない）。

【0029】

抗原活性化後の細胞内サイトカイン染色、続くFACS分析は、抗原特異性およびサイトカイン産生の動態に関する情報を得るために使用される方法である。Waldropら (1997) J. Clin. Invest. 99: 1739-1750。この手順の後の細胞は生存能力がないので、この方法は分析にのみ有用である。同様に、サイトカインELISPOTアッセイは分析にのみ有用である。Miyahiraら (1995) J. Immunol. Methods 181: 45-54; およびLalvaniら (1997) J. Exp. Med. 186: 859-865。これらのアッセイでは、分泌されたサイトカインは分析のために周囲のマトリックスに捕獲されるが、サイトカインを分泌した細胞を同定および回収するための機構は存在しない。ゲル微小滴技術(gel microdrop technology)は、上記で述べた適応症の処置のために必要であるような大量の細胞の処理に適さない。

【0030】

多くの治療的目的および診断的目的のために、分泌産物に基づいてT細胞の集団を分析および分離するのに確実な技術の必要性が存在することは、前述の議論から明らかである。本発明は、抗原特異的T細胞集団の分析、分離、そして富化のための方法を提供することによってこの必要性に取り組む。

【0031】

(発明の開示)

本発明は、抗原刺激に応答してこれらの細胞によって分泌される1つ以上の産物に基づく、抗原特異的T細胞の簡便な分析および細胞分離の方法を提供する。T細胞は、産物に特

10

20

30

40

50

異的な捕獲部分（または「特異的結合パートナー」）と共に提供される。次いでこれは、標識として直接使用され得る。産物の捕獲部分への結合は、「捕獲産物」を生じる。あるいは、この細胞は、捕獲部分を介して産物に結合し、そして産物に特異的に結合し、次に発蛍光団、放射性同位元素、発色団、または磁気粒子のような従来の標識物質で、直接的かまたは間接的のいずれかで標識される標識部分を介してさらに標識され得る。

【0032】

次いで、標識細胞をこれらの標識に基づいて、標準的なセルソーティング技術を用いて分離し得る。このような技術は、フローサイトメトリー、FACS、高勾配磁気勾配分離（high gradient magnetic gradient separation）、遠心分離を含むがこれに限定されない。

10

【0033】

従って、1つの局面では、本発明は、刺激に応答して抗原特異的T細胞によって分泌および放出される産物によって、抗原特異的T細胞を刺激する、および細胞の集団から分離する方法を含む。本方法は、T細胞を含む細胞の混合物を抗原で刺激すること、およびそれらが産物で標識される程度によって抗原刺激細胞の分離をもたらすことを含む。抗原刺激は、少なくとも1つのT細胞の抗原特異的刺激を誘発するのに有効な条件下で、細胞を少なくとも1つの抗原に曝露することによって達成される。この産物による標識は、細胞の表面を少なくとも1つの捕獲部分を含むように改変すること、細胞を産物が分泌、放出、そして特異的に上記捕獲部分に結合する（「捕獲される」または「包括される」）条件下で培養すること、そして捕獲産物を標識部分で標識することによって達成される。ここで標識細胞は、標識手順の一部としてか、または分離手順の一部として溶解されない。

20

【0034】

本発明の別の局面は、抗原刺激に応答してこれらの細胞から分泌および放出された産物を捕獲し得る抗原特異的T細胞を含む物質の組成物である。ここで、細胞の表面は産物の捕獲部分を含むように改変される。捕獲産物は、標識部分によって別個に標識され得る。

【0035】

本発明のなお別の局面は、上記の方法で分離された抗原特異的T細胞およびその子孫である。

【0036】

本発明のさらに別の局面は、これらの細胞の表面を細胞表面に結合した産物に特異的な結合パートナーを含むように改変すること、および細胞を産物が分泌および放出される条件下で培養することによる、抗原刺激に応答して細胞によって分泌および放出された産物で抗原特異的T細胞を標識する方法である。

30

【0037】

本発明のさらなる局面は、抗原特異的T細胞の集団を分析して、集団の他の細胞と比較してある量の産物を分泌する細胞の割合を決定する方法である。ここで産物は、抗原刺激に応答して分泌される。本方法は、細胞を上記の方法で標識すること、さらに細胞を、捕獲産物を標識しない二次標識で標識すること、そして二次細胞標識と比較した産物標識の量を検出することを含む。そのような方法は、例えば個体における免疫状態を評価するのに有用である。

40

【0038】

本発明のさらなる局面は、抗原特異的T細胞を富化したT細胞集団を使用する方法である。本方法は、治療の必要がある個体に、抗原特異的T細胞を富化したT細胞集団を含む組成物を投与することを含む。そのような方法は、ガン、アレルギー、免疫不全症、自己免疫疾患、およびウイルス疾患を含む種々の病的状態を治療するのに有用である。

【0039】

本発明のさらに別の局面は、抗原特異的T細胞を、エフェクター細胞を含む混合集団から分離するのに使用するためのキットである。そのキットは、全て適当な容器に包装された、ゲル様の軟度までの異なる程度の粘性であり得る生理的に許容可能な培地、アンカーおよび捕獲部分を含む産物捕獲系、捕獲産物を検出する標識システム、および試薬を使用す

50

るための説明書を含み得る。必要に応じて、このキットはさらに、磁気標識システムおよび／または1つ以上の生物学的修飾因子を含む。

【0040】

本発明のなお別の局面は、抗原刺激に応答して所望の産物を分泌する抗原特異的T細胞の検出／分離に使用するためのキットである。このキットは、全て適当な容器に包装された、アンカーおよび捕獲部分を含む産物捕獲系、捕獲産物を検出する標識システム、および試薬を使用するための説明書を含む。必要に応じて、このキットはさらに磁気標識システム、および／または抗原、および／または1つ以上の生物学的修飾因子を含む。

【0041】

(本発明を実施する方法)

10

本発明は、分泌産物に基づいて抗原刺激T細胞を検出、分析および分離する方法を提供する。ここで、この産物は、抗原刺激の結果として分泌される。本方法は、分泌産物の捕獲および細胞表面への移転に基づく。捕獲産物は、産物の存在、非存在、または存在する量によって細胞を検出、分析、そしてもし所望のならば分類することを可能にする。捕獲の手段は、分類される細胞に適当な手段によって細胞表面に固定した産物特異的結合パートナー(「捕獲部分」)を含む。

【0042】

ここで提示されるアプローチは、とりわけ以下の利点を兼ね備える：(a) T細胞を、抗原およびAPCで周期的に活性化する必要なく、生抗原特異的T細胞の迅速な単離、計測、表現型決定および増殖を可能にする；(b)一般的に、合成ペプチド、天然タンパク質、細胞抽出物、不活化病原体を適用した、レトロウイルスベクターで形質導入した、組換えウイルスベクターで感染させた、RNAまたはDNAでトランスフェクションした等のAPCに反応性のT細胞の単離に適用できる；(c) CD4⁺抗原特異的Th細胞およびCD8⁺抗原特異的CTLの両方の単離に使用し得る；および(d)例えば、抗原特異的Th1-、Th2-またはTh3-様リンパ球の、特定のサイトカインに媒介されたエフェクター機能を有する抗原特異的T細胞の選択的な単離を可能にする。

20

【0043】

本発明の実施は、他に示されなければ、当該分野の技術の範囲内である、分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来技術を採用する。そのような技術は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版(Sambrookら、1989)；「Oligonucleotide Synthesis」(M.J.Gait編、1984)；「Animal Cell Culture」(R.I.Freshney編、1987)；「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.)；「Handbook of Experimental Immunology」(D.M.Weir & C.C.Blackwell編)；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(J.M.Miller & M.P.Calos編、1987)；「Current Protocols in Molecular Biology」(F.M.Ausubelら、編、1987、および定期的に改訂)；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」(Mullisら、編、1994)；および「Current Protocols in Immunology」(J.E.Craigieら、編、1991)のような文献において完全に説明されている。

30

【0044】

セルソーティングおよび細胞分析の方法は、当該分野で公知であり、そして例えば、The Handbook of Experimental Immunology、1から4巻(D.N.Weir、編者)およびFlow Cytometry and Cell Sorting(A.Radbruch、編者、Springer Verlag、1992)において記載されている。

40

【0045】

50

本明細書中で使用される場合、「特異的結合パートナー」または「捕獲部分」は、関連する分子の三次元構造に依存する特異的な非共有結合相互作用によって相互作用する1対の分子（「特異的結合対」）のメンバーを意味する。「標識部分」は、直接的かまたは間接的のいずれかで検出され得る。捕獲部分が抗体である場合、「捕獲（c a p t u r e）抗体」または「捕獲（c a t c h）抗体」と呼ばれ得る。捕獲部分は、直接的かまたは間接的のいずれかで細胞および産物の両方に結合するものである。標識部分は、産物に付着するものであり、そして直接的かまたは間接的に標識され得る。

【0046】

本明細書中で使用される時、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、キメラ抗体、ハプテンおよび抗体フラグメント、および産物抗原上のエピトープに特異的に結合する抗体等価物である分子を含むことを意味する。用語「抗体」は、任意のアイソタイプ（IgA、IgG、IgE、IgD、IgM）のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、またはその抗原結合部分を含み、F(ab)およびscFvのようなFv断片、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびFab発現ライブラリーを含むがこれに限定されない。抗体はまた、例えばポリマーまたは粒子に固定化され得る。

10

【0047】

二重機能性（bi functional）抗体としても知られる、「二重特異性（bi specific）抗体」は、第1の抗原またはハプテンに特異的な少なくとも1つの第1の抗原結合部位、および2番目の抗原またはハプテンに特異的な少なくとも1つの第2の抗原結合部位を有することによって、2つの異なる抗原を認識する抗体を意味する。そのような抗体は、組換えDNA方法によって產生され得、または当該分野で公知の方法によって化学的に產生された抗体を含むがこれに限定されない。その二価の特性を保持するように還元および再編成された二重特異性抗体、およびそれぞれの抗原に対して少なくとも2つの抗原認識部位を有するように化学的に結合させた抗体を化学的に作成した。二重特異性抗体は、2つの異なる抗原を認識し得る全ての抗体または抗体の結合体、または抗体の重合体形態を含む。標識部分は、蛍光色素化した抗産物抗体であり得る。それは磁気ビーズ結合抗体、コロイド状ビーズ結合抗体、FITC抗体、フィコエリトリン抗体、PerCP抗体、AMCA抗体、蛍光粒子抗体、またはリポソーム結合抗体を含み得るがこれらに限定されない。あるいは、標識部分は、本明細書中で記載されるものを含むがこれらに限定されない任意の適切な標識であり得る。二重特異性抗体は、その二価の特性を保持するように還元および再編成された抗体、およびそれぞれの抗原に対するいくつかの抗原認識部位を有し得るように化学的に結合させた抗体を含む。

20

【0048】

本明細書中で使用される場合、用語「エフェクター細胞集団」は、少なくとも1つのT細胞を含む細胞集団を意味する。エフェクター細胞集団は、抗原特異的T細胞が富化される開始細胞集団から得ることができる。

30

【0049】

交換可能に使用される用語「細胞」および「細胞（複数）」および「細胞集団」は、1つ以上の哺乳動物細胞を意味する。その用語は、細胞または細胞集団の子孫を含む。当業者は、「細胞」は1つの細胞の子孫を含むこと、そしてその子孫は、自然の、偶発性の、または故意の変異および/または変化によって、必ずしも本来の親細胞と完全に同一（形態学的に、または総DNA相補体）である必要は無くてもよいことを認識する。

40

【0050】

交換可能に使用される用語「Tリンパ球」、「T細胞」、「T細胞（複数）」、および「T細胞集団」は、その表面に、例えば、CD2およびCD3のような1つ以上のT細胞に特徴的な抗原を提示する細胞または細胞（複数）を意味する。その用語はT細胞またはT細胞集団の子孫を含む。「Tリンパ球」または「T細胞」は、その細胞表面上にCD3、および自己細胞または任意の抗原提示マトリックスの表面上に、1つ以上のMHC分子または1つ以上の非古典的MHC分子と共に提示された場合に、抗原を認識し得るT細胞抗原受容体（TCR）を発現する細胞である。本明細書中で使用される用語「T細胞」は、

50

当該分野で公知の任意のT細胞、代表的には、抗CD3モノクローナル抗体を適切な標識技術と組み合せて用いて検出される、例えば表現型がCD3⁺である、すなわち細胞表面上にCD3を発現するリンパ球を示す。本発明の方法によって富化されたT細胞は、一般的にCD3⁺である。本発明の方法によって富化されたT細胞はまた、必ずしもそうでないが、一般的にCD4、CD8、または両方に陽性である。

【0051】

本明細書中で使用される用語「本質的に富化された」は、所望の細胞集団を含む本来の混合細胞集団から、細胞集団が少なくとも約50倍、より好ましくは少なくとも約500倍、そしてさらにより好ましくは少なくとも約5000倍以上に富化されたことを示す。

【0052】

本明細書中で使用される用語「抗原提示マトリックス」は、抗原が、T細胞の表面上にあるT細胞抗原受容体によって結合され得る方法で、抗原を提示し得る分子または複数の分子を意味する。抗原提示マトリックスは、抗原提示細胞(APC)の表面上、APCの小胞調製物上、またはビーズもしくはプレート上の合成マトリックスの形であり得る。本明細書中で使用される用語「抗原提示細胞」は、その表面上に抗原を、MHCまたはその一部、または1つ以上の非古典的MHC分子またはその一部と共に提示する任意の細胞を意味する。

【0053】

本明細書中で使用される用語「自原性」、「自己(autologous)」または「自身(self)」という用語は、細胞の起源を示す。従って、細胞が、個体(「ドナー」)または遺伝的に同一の個体に由来し、そしてその個体に再投与される場合、細胞は自原性である。自原性細胞はまた、自原性細胞の子孫であり得る。その用語はまた、異なる細胞型の細胞が同じドナー、または遺伝的に同一のドナーに由来することを示す。従って、エフェクター細胞および抗原提示細胞は、それらが、同じドナーまたはドナーと遺伝的に同一の個体由来である場合、またはそれらが、同じドナーまたはドナーと遺伝的に同一の個体由来の細胞の子孫である場合、自原性であると言われる。

【0054】

同様に、本明細書中で使用される用語「同種」または「非自己」は、細胞の起源を示す。従って、細胞が、それが投与されるレシピエントと遺伝的に同一でない個体に由來した場合、細胞またはその子孫は同種である。この用語は、発現されたMHC分子の非同一性に関連する。この用語はまた、異なる細胞型の細胞が、遺伝的に同一でないドナーに由来すること(すなわち、それらが遺伝的に同一でないドナーに由来する細胞の子孫である否か)を示す。例えば、それらが遺伝的に同一でないドナーに由来する場合、APCはエフェクター細胞に対して同種であると言われる。

【0055】

「抗原特異的T細胞の集団に関連する疾患または状態」は、抗原特異的T細胞の集団またはその適切な数の欠如に関連し得るものであり、そして例えば抗原特異的T細胞が、疾患の病因を主に担う自己免疫疾患、ガン細胞の増殖が、腫瘍特異的細胞障害性T細胞によって適切に制御されないガン、ウイルス感染細胞が、細胞障害性T細胞によって溶解されないウイルス疾患、アレルゲンに特異的なT細胞が、望ましくない効果を媒介するアレルギー、感染(例えば、HIV)または先天的(例えば、ディジョージ症候群)のいずれかのために、個体に不適切な数のT細胞が存在する免疫不全症を含む。これはまた、抗原特異的T細胞が、疾患状態を主に担う別の細胞または細胞集団の活性を調節または制御するものであり；抗原特異的T細胞の集団の存在が、疾患の主な原因ではないが、疾患の病因において重要な役割を果たすものでもあり；抗原特異的T細胞の集団が、外来性抗原の望ましくない拒絶を媒介するものもある。

【0056】

「個体」は脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトである。哺乳類は、ヒト、家畜、スポーツ動物(sport animal)、およびペットを含むがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

「有効量」は、有用なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1回以上の投与で投与され得る。本発明の目的のために、抗原特異的T細胞の有効量は、疾患状態を診断、寛解、回復、安定化、後退、進行の緩徐(slow)、または遅延(delay)に十分な量である。

【 0 0 5 8 】

本明細書中で使用される場合、「処置」は、有用なまたは所望の臨床結果を得るためにアプローチである。本発明の目的のために、有用なまたは所望の臨床結果は、検出できるかまたは検出できない、症状の緩和、疾患の拡大の減少、疾患の状態の安定化(すなわち悪化しない)、疾患の伝播(すなわち転移)の防止、疾患の進行の遅延(delay)または緩徐(slowing)、疾患の状態の回復または寛解、および緩解(部分的または全体のどちらか)を含むがこれらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けない場合に期待される生存期間と比べた生存期間の延長を意味し得る。

10

【 0 0 5 9 】

疾患の「緩和」は、本発明の富化T細胞集団を投与しないのと比べて、疾患の状態の拡大および/または望ましくない臨床的症状が減少するおよび/または進行の時間経過が緩徐されるかまたは延長されることを意味する。

【 0 0 6 0 】

本発明は、産物を分泌する抗原特異的T細胞を富化した細胞集団を得る方法を提供する。ここで、この産物は、抗原刺激の結果として分泌される。本方法は、一般的にT細胞を含む細胞の混合集団を得ること;少なくとも1つのT細胞の抗原特異的刺激を誘発するのに効果的な条件下で細胞集団を少なくとも1つの抗原に曝露すること;上記混合集団の表面を、それに付着した産物に特異的な結合パートナーを含むように改変すること;刺激されたT細胞によって少なくとも1つの産物の発現を可能にすること(ここで、産物は刺激に応答して分泌される);産物を細胞表面に結合した捕獲部分に結合させて、細胞結合捕獲部分-産物複合体を形成し、それによって細胞を標識すること;および上記産物で標識される程度によって刺激されたT細胞を分離することを含む。

20

【 0 0 6 1 】

確かに、細胞表面の特異的結合パートナーによる改変は、抗原刺激の前、間、または後に行われ得る。

30

【 0 0 6 2 】**(抗原提示マトリックスおよびエフェクター細胞集団)**

本発明は、抗原刺激に応答して産物を分泌する抗原特異的T細胞を富化した細胞集団を得るための方法を提供する。本方法は、細胞の混合集団(すなわち、「エフェクター細胞集団」)を得ること、および細胞集団を少なくとも1つの抗原に曝露することを含む。混合細胞集団は、当該分野で公知の任意の方法によって得ることができ、そして好ましくはT細胞が富化されている。抗原への曝露は、抗原提示マトリックスを用いて達成され得る。それは抗原提示細胞(APC)の表面上であり得る。抗原提示マトリックスおよびエフェクター細胞は、種々の供給源から得ることができる。細胞の混合集団は、インビトロまたはインビボで抗原によって刺激され得るか、または種々の任意の方法で、たとえば化学的または遺伝的に改変され得る。

40

【 0 0 6 3 】**(抗原提示マトリックス)**

本発明の方法を適用したT細胞集団は、抗原特異的刺激を誘発するのに有効な条件下で、少なくとも1つの抗原に曝露される。少なくとも1つの抗原で刺激されたT細胞は、抗原特異的と言われる。すなわち、それはその細胞表面に、抗原提示マトリックス(例えば合成抗原提示マトリックス)、またはAPCの表面上に存在する抗原提示マトリックス上に抗原(例えば、古典的もしくは非古典的MHC分子またはその一部)を提示し得る分子と会合する抗原を特異的に認識しそして結合する抗原レセプターを提示する。

【 0 0 6 4 】

50

抗原提示分子は、クラスⅠもしくはクラスⅡであり得るか、またはCD1のような非古典的MHC分子であり得るMHC分子；MHCエピトープ；MHCエピトープを含む融合タンパク質；あるいは合成MHCエピトープであり得る。エフェクター細胞に対して抗原を提示し得る限り、抗原提示分子の性質は重要でない。MHCエピトープを調製する方法は、当該分野で公知である。

【0065】

抗原提示マトリックスは、APCの表面上の抗原提示マトリックス、および合成抗原提示マトリックスを含む。本発明における使用に適当なAPCは、MHC分子のような抗原提示分子と会合するT細胞に対して、外来性のペプチドもしくはタンパク質、または内因性の抗原を提示し得る。APCは、マクロファージ、樹状細胞、CD40活性化B細胞、抗原特異的B細胞、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞および遺伝的に改変された細胞を含むがこれに限定されない。10

【0066】

APCは、末梢血単核球(PBMC)、混合集団を含む全血またはその画分、脾臓細胞、骨髓細胞、腫瘍浸潤リンパ球、白血球搬出法によって得た細胞、リンパ節(例えば、腫瘍から流出したリンパ節)を含むが、これらに限定されない種々の供給源から得られ得る。適当なドナーは、免疫したドナー、免疫していない(ナイーブ)ドナー、処置または未処置のドナーを含む。「処置」ドナーは1つ以上の生物学的修飾因子に曝露されたものである。「未処置」ドナーは1つ以上の生物学的修飾因子に曝露されたことがない。APCはまた、インビトロで1つ以上の生物学的修飾因子で処理され得る。20

【0067】

APCは一般的に生きているが、放射線照射、マイトイシンC処理、弱毒化、または化学的に固定もされ得る。さらに、APCは全細胞である必要はない。かわりに、APCの小胞調製物を使用し得る。

【0068】

APCは遺伝的に改変され得る。すなわち、通常発現しないか、通常より低いレベルで発現するポリペプチドまたはRNA分子を発現するように、組換えポリヌクレオチド構築物でトランスフェクトされ得る。ポリヌクレオチドの例は、MHC分子、B7のような同時刺激分子、または抗原をコードするものを含むが、これに限定されない。例えば、CMVプロモーターのような強力なプロモーターの転写調節下にあるMHC分子をコードするポリヌクレオチドの発現は、高レベルのMHC分子の細胞表面上での発現を引き起こし得、従って抗原提示の密度を増加させる。あるいは、抗原がMHC分子と共に細胞表面上で発現するように、APCは、CMVプロモーターのような強力なプロモーターの転写調節下で、抗原をコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド構築物でトランスフェクトされ得る。30

【0069】

ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、転写および翻訳のために、調節配列に作動可能に連結される。調節配列が転写または翻訳を制御する場合、調節配列はコードする配列に「作動可能に連結」される。当該分野における任意の方法(例えば、精製DNA、ウイルスベクター、またはDNAもしくはRNAウイルスのいずれかを用いたリポフェクチン、形質導入、感染、またはエレクトロポレーション)が、外来性のポリヌクレオチドのAPCへの形質転換、または挿入に使用され得る。外来性のポリヌクレオチドは、非組み込みベクター、例えばプラスミドとして保持され得、または宿主細胞ゲノムに組み込まれ得る。

【0070】

哺乳動物において、インビオでは通常はAPCとして機能しない細胞を、APCとして機能するように改変し得る。広範な種類の細胞が適切に改変された場合、APCとして機能し得る。そのような細胞の例は、昆虫細胞(例えば、Drosophila、またはSphingoptera)、抗原提示経路に内因性のペプチドと細胞表面MHCクラスI分子との結合を制限する変異を有するヒトT2細胞株のようなフォスター(foster)細胞4050

である。Zweerinkら(1993)J. Immunol. 150: 1763 - 1771。例えば、MHC分子のような1つ以上の抗原提示ポリペプチド、および必要に応じてB7のようなアクセサリー分子の合成を指示する発現ベクターをこれらの細胞に導入し、これらの細胞表面に抗原提示分子および必要に応じてアクセサリー分子、またはその機能的な部分の発現をもたらし得る。あるいは、それ自身を細胞膜に挿入し得る抗原提示ポリペプチドおよびアクセサリー分子を使用し得る。例えば、グリコシル-ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol)(GPI)-改変ポリペプチドはそれ自身を細胞膜に挿入し得る。Medoffら、J. Exp. Med. 160: 1558 - 1578; および Huangら、Immunity 1: 607 - 613。アクセサリー分子は、CD28、CD80またはCD86に特異的な抗体のような同時刺激抗体; B7.1およびB7.2を含むがこれに限定されない同時刺激分子; ICAM-1およびLFA-3のような接着分子; ならびに、FasリガンドおよびCD70のような生存分子、を含むがこれらに限定されない。例えば、PCT公開番号第WO97/46256号を参照のこと。
10

【0071】

あるいは、合成抗原提示マトリックスを、エフェクター細胞に対する抗原を提示するために使用し得る。合成マトリックスは、固体支持体(例えばビーズまたはプレート)に固定化された抗原提示分子、好ましくはMHCクラスIまたはMHCクラスII分子を含み得る。アクセサリー分子が提示され得、それは共に固定化されるかまたは可溶性であり得る。その分子は、CD28、CD80またはCD86に特異的な抗体のような同時刺激抗体; B7.1およびB7.2を含むがこれに限定されない同時刺激分子; ICAM-1およびLFA-3のような接着分子; ならびに、FasリガンドおよびCD70のような生存分子を含むが、これらに限定されない。アクセサリー分子の機能が維持される限り、その分子の一部もまた使用され得る。固体支持体は、金属またはプラスチック、多孔性の物質、マイクロビーズ、マイクロタイタープレート、赤血球、およびリポソームを含む。例えば、PCT公開番号第WO97/46256号、および同第WO97/35035号を参照のこと。
20

【0072】

抗原提示マトリックスが、細胞表面または合成支持体上にあろうとなからうと、エフェクター細胞に対する抗原を提示し得るか否かを決定する方法は、当該分野で公知であり、そして例えばエフェクター細胞による³H-チミジンの取り込み、エフェクター細胞によるサイトカインの産生、および細胞溶解性⁵¹Cr-放出アッセイを含む。
30

【0073】

(エフェクター細胞集団)

抗原特異的T細胞は、エフェクター細胞集団、すなわち造血細胞集団、好ましくはT細胞が富化された集団から単離され得る。エフェクター細胞集団は、抗原特異的T細胞が単離される最初の集団である。

【0074】

本発明において使用するのに適当なエフェクター細胞集団は、自原性または同種異系、好ましくは自原性であり得る。エフェクター細胞が同種異系である場合、好ましくは、使用的前に同種反応性(alloreactive)の細胞から細胞を涸渇させる。これは、例えば同種エフェクター細胞およびレシピエント細胞集団を混合すること、ならびにそれらを適当な時間インキュベートすること、次いでCD69⁺細胞を涸渇させること、または同種反応性細胞を不活化すること、または同種反応性細胞集団のアネルギーを誘導することを含む、任意の公知の方法によって達成され得る。
40

【0075】

エフェクター細胞集団は、未分離の細胞、すなわち混合集団(例えば、PBM集団、全血など)を含み得る。エフェクター細胞集団は、細胞表面マーカーの発現に基づくポジティブセレクション、細胞表面マーカーの発現に基づくネガティブセレクション、インピトロまたはインピボでの1つ以上の抗原による刺激、インピトロまたはインピボでの1つ以
50

上の生物学的修飾因子による処理、1つ以上の抗原または生物学的修飾因子による減法刺激、またはこれらのいずれかまたは全ての組み合せによって操作され得る。

【0076】

エフェクター細胞は、PBM C、全血、または混合集団を含むその画分、脾臓細胞、骨髄細胞、腫瘍浸潤リンパ球、白血球搬出法によって得られた細胞、生検組織、リンパ節（例えば、腫瘍から流出したリンパ節）を含むがこれらに限定されない種々の供給源から得られ得る。適切なドナーは、免疫したドナー、免疫していない（ナイーブ）ドナー、処置または未処置ドナーを含む。「処置」ドナーは1つ以上の生物学的修飾因子に曝露されたものである。「未処置」ドナーは1つ以上の生物学的修飾因子に曝露されたことがない。

【0077】

エフェクター細胞を抽出および培養する方法は、周知である。例えば、エフェクター細胞は、白血球搬出法、連続フローセル分離機 (continuous flow cell separator) を用いた機械的アフェレーシスによって得られ得る。例えば、リンパ球および単球を、軟膜から、Ficcoll-HyqueTM勾配による分離、Percol勾配による分離、または溶出を含むがこれに限定されない任意の公知の方法によって単離し得る。Ficcoll-HyqueTMの濃度は、所望の集団（例えば、T細胞が富化された集団）を得るために調節され得る。細胞特異的アフィニティカラムに基づく他の方法が公知であり、そして使用され得る。これらは、例えば蛍光標示式細胞分取（FACS）、細胞接着、磁気ビーズ分離などを含む。親和性に基づく方法は、細胞表面マーカーに特異的で、かつAmerican Type Culture Collection (Rockville, MD) を含む種々の市販の供給源から入手可能な抗体またはその一部を利用し得る。あるいは、親和性に基づく方法は、細胞表面レセプターのリガンドまたはリガンドアナログを利用し得る。

10

【0078】

エフェクター細胞集団は、細胞表面マーカーの発現に基づく1つ以上の分離プロトコールに供され得る。例えば、細胞は、CD2、CD3、CD4、CD8、TCR、CD45、CD45RO、CD45RA、CD11b、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD40Lのような「クラスターの分化」細胞表面マーカー；リンパ球活性化遺伝子3産物（LAG3）、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAM）、T1/TST2のようなリンパ球活性化に関連する他のマーカー；CCR3、CCR4、CXCR3、CCR5のようなケモカインレセプター；CD62L、CD44、CLA、CD146、47、E7のようなホーミングレセプター；CD25、CD69およびOX40のような活性化マーカー；ならびに、CD1によって提示されるリポグリカン、を含むがこれらに限定されない、1つ以上の細胞表面ポリペプチドの発現に基づくポジティブセレクションに供され得る。エフェクター細胞集団は、非T細胞および/または特定のT細胞サブセットの渇渴についてのネガティブセレクションに供され得る。ネガティブセレクションは、CD19、およびCD20のようなB細胞マーカー；単球マーカーCD14；NK細胞マーカーCD56を含むがこれらに限定されない、種々の分子の細胞表面発現に基づいて実施され得る。

20

【0079】

エフェクター細胞集団は、インビボまたはインビトロで1つ以上の抗原にさらすことによって処理され得る。抗原は、ペプチド；タンパク質；糖タンパク質；脂質；糖脂質；細胞；細胞抽出物；組織抽出物；原生動物、細菌およびウイルスのような微生物全体を含むがこれらに限定されない。抗原は未変更、すなわちその自然の状態で使用され得る。あるいは、抗原は、例えばタンパク質を変性または病原体を不活化するための加熱；タンパク質を変性するためまたは2つの抗原分子の架橋するための化学的変更；グリコシル化；ポリエチレングリコールを含むがこれに限定されない部分による化学的変更；および酵素消化、を含むがこれらに限定されない任意の公知の方法によって変更され得る。1より多い抗原が使用される場合、曝露は同時または連続的であり得る。

30

【0080】

40

50

エフェクター細胞を、処置される状態に関連する少なくとも1つの抗原の存在下で培養し得る。抗原は複数の抗原決定基を有する单一の抗原であり得るか、または抗原の混合物であり得る。抗原は、処置される状態に依存して、自己抗原または外来性抗原であり得る。自己抗原は、自己免疫疾患に関連する抗原、およびガン細胞に関連する抗原を含む。抗原は、タンパク質、細胞、組織または標的器官であり得る。抗原が自己抗原である場合、自己抗原は器官（例えば、脳または甲状腺）の一部であり得、そしてそれから精製される必要はない。精製自己抗原または精製自己抗原の混合物も使用され得る。

【0081】

末梢血リンパ球（PBL）または腫瘍浸潤リンパ球（TIL）と自己腫瘍細胞との同時培養は、一般的にサイトカイン刺激を伴う。Sporriら（1993）Cancer Immunol. Immunother. 37: 175-180；およびPeyretら（1991）Chirurgie 117: 700-709。

10

【0082】

エフェクター細胞集団は、インビオまたはインビトロで1つ以上の生物学的修飾因子に曝露することによって処理され得る。適切な生物学的修飾因子は、IL-2、IL-4、IL-10、TNF-、IL-12、IFN-のようなサイトカイン；フィトヘマグルチニン（PHA）、ホルボールミリストアセテート（PMA）のようなホルボールエステル、コンカナバリン-A、およびイオノマイシンのような非特異的修飾因子；抗CD2、抗CD3、抗IL-2レセプター、抗CD28のような細胞表面マーカーに特異的な抗体；ケモカイン（例えば、リンホタクチンを含む）を含むがこれに限定されない。生物学的修飾因子は、天然の供給源から得られた天然の因子、組換えDNA技術によって產生された因子、化学的に合成されたポリペプチドまたは他の分子、または天然の因子の機能的活性を有する、それらの任意の誘導体であり得る。1つ以上の生物学的修飾因子が使用される場合、曝露は同時または連續的であり得る。

20

【0083】

本発明は、抗原特異的細胞が富化された、本発明の方法によって富化されたT細胞を含む組成物を提供する。「富化された」は細胞集団が少なくとも約50倍、より好ましくは少なくとも約500倍、そしてさらにより好ましくは少なくとも約5000倍以上、所望の細胞集団を含む元の混合細胞集団から富化されたことを意味する。所望の抗原特異的細胞を含む富化細胞集団の割合は、10%未満から100%の抗原特異的細胞まで、実質的に異なり得る。抗原特異的である割合は、例えばT細胞集団が所望の抗原を提示する抗原提示マトリックスによって攻撃される、³H-チミジンの取り込みアッセイによって、容易に決定され得る。

30

【0084】

（細胞標識）

本明細書中の方法は、細胞を、細胞によって分泌された産物で標識することに基づく。ここで、この産物は抗原刺激に反応して分泌される。標識を達成するために、細胞集団の細胞表面は、産物に特異的に結合する部分である、「特異的結合パートナー」が直接、または固定する手段（「アンカー部分」）のいずれかによって、必要に応じて捕獲部分を形成するためのリンカーによって、細胞表面に結合するように改変される。細胞集団は、多くの型の細胞を含み得、そして一般的に混合集団からなった。好ましくは、細胞集団は造血系であり、より好ましくは、細胞集団はエフェクター細胞であり、最も好ましくは、細胞集団はT細胞またはそのサブセットである。サブセットは、例えばリンパ球に関してはCD45、細胞傷害性細胞に関してはCD8などの細胞表面マーカーによって単離され得る。

40

【0085】

抗原刺激に反応して分泌された産物は、当該分野で公知であり、そしてIL-2、IL-4、IL-10、TNF-、TGF-、およびIFN-のようなサイトカインを含むがこれらに限定されない。

【0086】

50

特異的結合パートナーは、比較的高い親和性および特異性が、産物および結合パートナーの間に存在する部分、および産物：パートナー複合体の分離が比較的遅く、その結果、産物：パートナー複合体が細胞分離技術の間、検出される任意の分子を含む。特異的結合パートナーは、産物が結合する基質または基質アナログ、ペプチド、ポリサッカライド、ステロイド、ビオチン、ジギトキシン、ジギトニンおよびそれらの誘導体を含むがこれに限定されない。好ましい実施態様では、特異的結合パートナーは、抗体または抗原結合フラグメントもしくはその誘導体である。用語「抗原結合フラグメント」は、産物に特異的に結合する任意のペプチドを含む。代表的には、これらのフラグメントは F_{ab} 、 $F(ab')、 $F(ab')、 $s c F_v$ （単量体および多量体の両方）および単離された H鎖および L鎖のような免疫グロブリンフラグメントを含む。抗原結合フラグメントは、アビディティおよび／または親和性は変化し得るが、インタクトな免疫グロブリンの特異性を保持する。$$

【 0 0 8 7 】

本発明の実施において、捕獲部分は、細胞膜（または細胞壁）に種々の方法で結合され得る。適切な方法は、タンパク質構成要素のアミノ基への直接的な化学的結合、タンパク質構成要素のチオールへの結合（ジスルフィド結合の還元後に形成）、抗体（抗体の組を含む）またはレクチンによる間接的な結合、疎水性アンカーによる脂質二重膜への固定、およびポリカチオンによる負に荷電している細胞表面への結合を含むがこれに限定されない。

【 0 0 8 8 】

本発明の他の実施態様では、捕獲部分は 2 つ以上の工程を用いて、例えば、細胞を、直接的に例えればビオチン／アビジン複合体によってか、または間接的に適當な結合部分または複数の部分によってのいずれかで、捕獲部分のアンカー部分への結合を可能にする、少なくとも 1 つのアンカー部分で標識することによって導入される。

【 0 0 8 9 】

適切なアンカー分子は、脂肪酸のような脂肪親和性の分子を含む。あるいは、抗体、または MHC 抗原または糖タンパク質のような細胞表面マーカーに対する他の特異的結合物も使用され得る。

【 0 0 9 0 】

「捕獲部分」は、結合剤によってアンカー部分に結合し得、そしてまた、例えれば改変デキストラン分子、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、およびポリビニルピロリドンを含む分枝ポリマーのような、利用可能な捕獲部分の数、および従って産物の捕獲の可能性を増すリンクを含み得る。

【 0 0 9 1 】

抗体の細胞表面への直接的な化学結合の方法は、当該分野で公知であり、そして例えれば、グルタルアルdehyd またはマレイミド活性化抗体を用いた結合を含む。複数の工程手順を使用する化学的結合方法は、ビオチン化、例えはこれらの化合物のスクシニミドエステルを用いたトリニトロフェノール (TNP) またはジゴキシゲニンの結合を含むがこれに限定されない。ビオチン化は、例えは、D - ビオチニル - N - ヒドロキシスクシニミドの使用によって達成され得る。スクシニミド基は、pH 値が 7 より上で、そして好ましくは約 pH 8.0 から約 pH 8.5 の間で、有効にアミノ基と反応する。ビオチン化は、例えは細胞をジチオトレイトルで処理し、続いてビオチンマレイミドを加えることによって達成され得る。

【 0 0 9 2 】

細胞への結合はまた、細胞表面抗原（「マーカー」）に対する抗体を用いて達成され得る。表面抗原に対する抗体は、一般的に 10^7 細胞あたり 0.1 から $1 \mu g$ の範囲の抗体を必要とする。しかし、この必要性は、抗体の産物に対する親和性に反応して大きく変化し、そして経験的に決定する必要がある。そのような決定は、当該分野における技術の範囲内である。従って、適當な量の抗体は、経験的に決定されるべきであり、そして当該分野における技術の範囲内である。これは、細胞型に特異的なマーカー発現について特異的な

10

20

30

40

50

細胞に結合することを可能にする。例えば、T細胞またはそのサブセットのような細胞のクラスが特異的に標識され得る。捕獲部分として、細胞またはそれに存在するアンカー部分、および産物に対する抗原認識部位を有する二重特異性抗体が使用され得る。

【0093】

捕獲部分、特に捕獲抗体は、分泌産物の量に基づいて選択されるべきである。例えば、少數の分子のみを分泌する細胞に関しては、高い親和性の抗体が、大部分の分泌分子を捕獲する。あるいは、インキュベーション時間の間に、細胞が多くの分子を分泌する場合は、捕獲マトリックスの早すぎる飽和を防止するために、より低い親和性の抗体が好ましくあり得る。分泌されたタンパク質のレベルに適当な親和性の決定は、経験的に決定され、そして当該分野の技術の範囲内である。

10

【0094】

大量のN-アセチルノイラミン酸を、そのリポポリサッカライドの構成物として表面に有する細胞は、生理的なpH値で負電荷を有する。捕獲部分の結合は、電荷の相互作用により得る。例えば、ポリカチオンを有する部分は負に荷電した細胞に結合する。ポリカチオンは当該分野で公知であり、そして例えばポリリシンおよびキトサンを含む。キトサンは、 - (1-4) グルコシド結合で結合したD-グルコサミン基からなるポリマーである。

【0095】

結合パートナー（1つ以上の捕獲部分を含み得る）を細胞へ結合させる他の方法は、細胞表面のポリサッカライドに結合させることによる。ポリサッカライドに結合する基質は当該分野で公知であり、そして、例えばSigma Chemical CompanyおよびAldrich Chemical Companyを含む多くの会社によって供給されるレクチン（例えば、コンカナバリンA、solanum tuberosum、aleuria aurantia、datura stramonium、galanthus nivalis、helix pomatia、lens culinarisおよび他の既知のレクチンを含む）を含む。

20

【0096】

本発明のいくつかの実施態様において、産物結合パートナーを、細胞膜に疎水性に固定することにより、細胞に結合する。膜の脂質二重層と相互作用する適切な疎水基は、当該分野において公知であり、そして脂肪酸および非イオン性界面活性剤（例えば、Tween-80を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。疎水性アンカーの挿入を介する、細胞への捕獲部分の付着の欠点は、細胞中への疎水性部分の組み込みの速度が遅いことである。従って、高濃度の疎水性アンカーを有する部分がしばしば必要とされる。この後者状況は、捕獲部分が比較的制限されている場合、または高価な物質（例えば、抗体）である場合は、しばしば非経済的である。

30

【0097】

膜中にそれ自体を包埋する疎水性分子の低収率は、これらの分子が比較的限定された量において利用可能である場合にのみ、問題となる。この問題は、固定化パートナーおよび捕獲部分を含むパートナーを含有する架橋系を使用することによって克服され得る。この架橋系で、このパートナーの1つは、より高度に利用可能であり、そして架橋系の2つのパートナーがあたかも互いに高度な特異性および親和性を有する。例えば、1つの実施態様において、アビジンまたはストレプトアビジンを、疎水性アンカーを介して細胞表面に付着させ、一方、産物捕獲部分を有するパートナーは、ビオチン化された抗-産物抗体である。別の実施態様において、細胞表面をジゴキシゲニンで標識し、次に、抗ジゴキシゲニン抗体フラグメントと抗-産物抗体との結合体を用いる。このアプローチを、連結を形成し得る他の分子対（例えば、ハプテンと抗ハプテン抗体、NTAとポリヒスチジン残基、またはレクチンと多糖類が挙げられる）を用いて使用し得る。好みの実施態様は、アンカー部分あたりの捕獲部分の数を増加することによる、この系の「增幅」を可能とする実施態様である。

40

【0098】

50

1つの例示的な実施態様において、分岐したデキストランを、パルミチン酸と結合し、そのようにして、複数の利用可能な結合部位を提供する。その結果、このデキストランをビオチンと結合し、そして産物に特異的なアビジン・結合体化抗体で処理する。

【0099】

当然のことながら、本発明の実施態様において、アンカー部分が任意の様式において細胞表面と結合する場合、架橋系を、アンカー部分と捕獲部分との間に使用し得ることが意図される。従って、例えば、アビジン（またはストレプトアビジン）ビオチンリンカー部分は、抗体アンカー部分と捕獲部分を連結し得る。二重特異性抗体もまた、リンカー部分として作用し得る。

【0100】

10
産物を分泌する能力を有する細胞を分析し、そして所望される場合に選択するために、捕獲部分を含有するように上記のように改変された細胞が、捕獲された産物を含有する細胞への結合および検出を可能とするのに十分な量で、産物を產生しそして分泌することを可能にする条件下で、インキュベートされる。これらの条件は、当業者に公知であり、そして、とりわけ適切な温度、pH、ならびにインキュベーション培地中の塩濃度、増殖因子濃度、および基質濃度、ならびに気相中の適切な気体濃度が挙げられる。高產生細胞と低產生細胞とを区別することが所望される場合、インキュベーション時間は、細胞により分泌される産物がなお線形の状態である程度である。適切な条件は、経験に決定され得、そしてそのような決定は、当業者の範囲内である。

【0101】

20
さらに、細胞の分泌を、生物学的修飾因子を使用して、改変（すなわち、アップレギュレート、誘導、または減少）し得る。生物学的修飾因子は、任意の時点で添加され得るが、好ましくは、インキュベーション培地に添加される。あるいは、インキュベーション工程の前に、細胞をこれらの薬剤かまたは細胞で前処理し得る。適切な生物学的修飾因子としては、分子または他の細胞が挙げられるがこれらに限定されない。適切な分子としては、薬物、サイトカイン、低分子、ホルモン、インターロイキンの組み合わせ、レクチン、および他の刺激剤（例えば、PMA、LPS、二重特異性抗体および細胞機能またはタンパク質発現を改変する他の薬剤）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0102】

適切な細胞としては、例えば、腫瘍細胞とT細胞との間のような直接的な細胞間相互作用、および例えば、生物学的修飾因子を分泌する他の細胞の近接によって誘導されるような間接的細胞間相互作用が挙げられるが、これらに限定されない。適切な細胞としては、血球細胞、末梢骨髄細胞および種々の細胞株が挙げられるがこれらに限定されない。

【0103】

インキュベーション条件はまた、産物產生細胞から非產生細胞を区別するか、または低產生細胞から高產生細胞を区別するように、産物が他の細胞によって実質的に捕獲されないか、または他の細胞よりかなり少なく捕獲されるものである。一般に、インキュベーション時間は、5分～10時間の間であり、そしてより通常は、1時間～5時間の間である。インキュベーション培地は、必要に応じて、產生細胞からの産物の拡散を遅くする物質を含み得る。液体培地中の産物の拡散を阻害し、そして細胞に対して非毒性である物質は、当該分野において公知であり、そして部分的または完全なゲル（例えば、アルギン酸塩、低融点アガロースおよびゼラチンを含む）である種々の物質が挙げられる。培地の粘性または透過性を変化させることにより、产生細胞による異なるサイズの産物の局所的な捕獲を、調節し得る。培地の分子サイズ排除を調節して、反応を最適化し得る。培地の最適な組成は、経験的に決定され得、そして細胞濃度、分泌のレベルおよび産物の分子量、ならびに産物についての捕獲部分の親和性による影響を受ける。そのような決定は、当業者の範囲内である。

【0104】

好ましくは、ゲルを、インキュベーション後に可溶化し、細胞分離技術によって、培地からの細胞または細胞群の単離を可能にする。従って、例えば、ゲルを、メルカプトエタ

10

20

30

40

50

ノールまたはジチオスレイトールのようなスルフヒドリル還元剤によって解離し得るジスルフィド結合によって連結し得るか、またはゲルは、イオン架橋剤（例えば、EDTAのようなキレート剤の添加によって可溶化されるカルシウムイオンを含む）を含有し得る。

【0105】

分泌期の終期において、細胞は、通常冷却され、さらなる分泌を妨げられ、そしてゲルマトリックスがある場合、可溶化される。この順番は、当然のことながら、逆にし得る。架橋に起因して、捕獲部分の添加後に、キャッピングが生じ得るので、キャッピングを減少するインキュベーション工程が、この時点では追加され得る。細胞を例えば、サイトカラシンAまたはBあるいはキャッピングを防ぐ他の任意の適切な物質中で、インキュベートし得る。次に、捕獲された産物を含有する細胞は、標識化部分を用いて標識される。標識化は当業者に公知の任意の方法によって達成され得る。例えば、抗-産物抗体を使用して、直接的にか、または間接的に、産物を含有する細胞を標識し得る。使用する標識は、産物に対する標識部分の付着に基づいて、細胞を分析するか、または分類する系における使用に適切な標識である。10

【0106】

他の実施態様において、捕獲産物を含有しない捕獲部分が、検出され得る。このことは、例えば、ネガティブ分離方法（すなわち、産物で高度には飽和していない細胞の検出）を使用することによって、多量に分泌する細胞の単離を可能とする。細胞は、例えば、細胞表面マーカー、細胞型、DNA含量のような細胞のパラメーター、細胞の状態、または捕獲部分の数を認識する他の標識化物質を用いて標識され得る。20

【0107】

実際の捕獲部分を数えることは、例えば、細胞の異なる結合体化の可能性に起因してこれら分子の量が変化することを補うために重要であり得る。まれな細胞の単離のためには、産物捕獲系（アンカー部分および捕獲部分を含む）の結合能が減少または増加した細胞を除くことが特に重要であり得る。あるいは、反応は、「一工程反応」において同時に進行し得る。

【0108】

（細胞分析およびセルソーティング）

標識の存在に基づく細胞集団の分析およびセルソーティングは、当該分野において公知の多数の技術によって達成され得る。細胞は、例えば、フローサイトメトリーまたはFACSによって分析または分類され得る。これらの技術は、細胞の1つ以上のパラメーターに従って、分析および分類することを可能にする。通常、1つまたは複数の分泌パラメーターを、細胞の他の測定可能なパラメーター（細胞型、細胞表面マーカー、DNA含量などを含むがこれらに限定されない）と組み合わせて、同時に分析し得る。データを分析し得、そして測定したパラメーターの任意の手法または組み合わせを使用して、細胞を分類し得る。セルソーティングおよび細胞分析方法は、当該分野において公知であり、そして例えば、The Handbook of Experimental Immunology、第1～4巻、(D.N. Weir、編)；Flow Cytometry Cell Sorting (A. Radbruch、編、Springer Verlag、1992)；およびCell Separation Methods and Applications (D. RecktenwaldおよびA. Radbruch、編、1997) Marcel Dekker、Inc. N.Y.に記載される。細胞をまた、顕微鏡技術（例えば、レーザー走査型顕微鏡、蛍光顕微鏡を含む；画像化分析系と組み合わせて使用され得るような技術）を使用して分析し得る。セルソーティングの他の方法としては、例えば、親和性技術を使用するパニングおよび分離（プレート、ビーズおよびカラムのような固体支持体を使用する分類技術を含む）が挙げられる。30

【0109】

セルソーティングのいくつかの方法は、磁気分離を利用し、これらの方法のいくつかは、磁気ビーズを利用する。種々の磁気ビーズが多数の供給源（例えば、Dynal (Norway)、Advanced Magnetics (Cambridge, MA, U.S.)40

. A.)、Immuncon (Philadelphia, U.S.A.)、Immunotec (Marseilles, France)、およびMiltenyi Biotech GmbH (Germany)が挙げられる)から利用可能である。

【0110】

好ましい磁気標識方法としては、5~200 nmの範囲のサイズ、好ましくは10~100 nmのサイズのコロイド超常磁性(superparamagnetic)粒子が挙げられる。これらの磁性粒子は、細胞の定量的磁気標識を可能にし、従って、結合した磁気標識の量は、結合した産物の量と比例し、そして磁気分離方法は、産物分泌の異なる量に對して感度がよい。種々の特異性を有するコロイド粒子が、当該分野において公知であり、そして例えば、Miltenyi Biotech GmbHより入手可能である。免疫特異的蛍光または磁気リポソームの使用もまた、捕獲産物の定量的標識のために使用され得る。これらの場合、磁気物質および/または蛍光色素を含有するリポソームは、その表面上で抗体と結合体化し、そして磁気分離を使用して、非產生細胞、低產生細胞と高產生細胞との間の最適な分離を可能にする。

【0111】

磁気分離は、磁力を引き付ける第2の力を組み合わせ、2つの対抗力の異なる強度に基づく分離をすることにより、高効率で、達成され得る。代表的な対抗力は、例えば、磁気分離チャンバー中の分離培地中に混合された磁性液体によって誘導される力、重力、および細胞に対する培地の流速によって誘導される粘性力である。任意の磁気分離方法(好ましくは定量的分離を可能とする磁気分離方法)が使用される。異なる分離方法を組み合わせ得ることもまた、意図される。例えば、磁気セルソーティングは、FACSと組み合わせられ、分離の質を増加し得るか、または複数のパラメーターによる分類を可能にし得る。

【0112】

好ましい技術としては、高勾配磁気選別法(HGMS)(磁場に配置されたチャンバーまたはカラム中に磁性物質を選択的に保持するための手順)が挙げられる。本技術の1つの適用において、産物を磁気粒子に付着させることによって標識する。この付着は、一般に、結合体化のための官能基を提供する、磁気粒子上のコーティングと結合体化される標識部分と、産物との会合を介する。従って、捕獲産物は、磁気「標識」と結合され、次にチャンバーに適用される液体中に懸濁される。チャンバーを横切って供給される磁気勾配の存在下で、磁気標識化標的細胞は、チャンバー中に保持される;チャンバーがマトリックスを含有する場合、その細胞はマトリックスと会合する。磁気標識を有さない細胞、または磁気標識の少量のみを有する細胞は、チャンバーを通過する。

【0113】

次に保持された細胞は、磁場の強度を変えるか、または磁場を取り除くことによってか、あるいは、磁性流体を導入することによって、溶出され得る。捕獲産物についての選択性は、磁気粒子に直接的にかまたは間接的にかのいずれかで、結合体化された標識部分によつてか、あるいは一次抗体および一次抗体を認識する磁気粒子の使用によって、供給される。横切って磁場が適用されるチャンバーは、適切な磁場の磁化率の物質のマトリックスがしばしば提供され、マトリックスの表面に近接する容量のチャンバーにおいて、局所的な高度の磁場勾配を誘導する。このことは、かなり弱く磁化された粒子の保持を可能にする。種々のHGMS系を記載する刊行物が、当該分野において公知であり、そして例えば、米国特許第4,452,773号、同第4,230,685号、PCT公開第WO85/04330号、米国特許第4,770,183号、およびPCT/EP89/01602号が挙げられる;系は、米国特許第5,411,863号;同第5,543,289号;同第5,385,707号;および同第5,693,539号にもまた記載される。これらは、共有(commonly owned)であり、そして本明細書において参考として援用される。

【0114】

さらに、他の実施態様において、プロセスは、捕獲部分(存在する場合)によって捕獲された産物を含有する細胞の標識工程を含む。他の実施態様はまた、細胞集団を分析する工

10

20

30

40

50

程を包含し、標識された細胞（存在する場合）を検出し、そして所望される場合、標識された細胞（存在する場合）を分類する。

【0115】

(抗原特異的T細胞を検出する診断方法)

本発明は、抗原特異的T細胞を検出するための診断方法を、さらに提供する。これらの方法としては、T細胞を富化した細胞の集団を分析して、抗原特異的T細胞を同定する方法または数える方法、ならびに抗原刺激に応答して、産物を分泌する抗原特異的T細胞の分布を決定する方法が挙げられる。

【0116】

T細胞を富化した細胞の集団を分析して、集団の他の細胞と比較して、ある量の産物を分泌しそして放出する抗原特異的T細胞（ここで産物は、抗原刺激に応答して分泌されそして放出される）を、同定するか、または数える方法は、本発明の方法によって細胞を標識する工程；捕獲産物を標識しない、少なくとも1つのさらなる標識で、細胞を標識する工程；および、さらなる標識と比較した、産物標識の量を検出する工程、を包含する。そのような方法は、例えば、所与の抗原について特異的な細胞の集団の割合を決定する際に、有用である。この方法を使用して、個体の免疫状態に関する情報（アレルゲン、腫瘍またはウイルスに対する免疫応答を評価すること、あるいは自己免疫疾患を検出またはモニターするために自己反応性である、個体中の細胞の集団を評価することを包含する）を提供し得る。

【0117】

(富化された抗原特異的T細胞を使用する処置方法)

本発明は、本発明の富化されたT細胞を使用して、抗原特異的T細胞の集団に関する疾患または状態を処置する方法を提供する。

【0118】

処置方法としては、抗原特異的T細胞集団を、同定し、富化し、そして個体に導入する方法；抗原特異的T細胞の集団を、同定し、富化し、そして個体への導入前にインビトロで拡大する方法；抗原特異的T細胞の集団を同定し、そして個体へ導入される細胞の集団から除去する方法；投与前のエキソビオ遺伝子改変；ならびにサイトカイン発現に従って選択される抗原特異的T細胞の選択が、挙げられる。サイトカイン発現に従って選択される抗原特異的T細胞の例としては、癌、ウイルス（例えば、CMV、EBV）および細菌（例えば、リステリア菌、マイコバクテリア）感染の処置のためのINF- α またはTNF- α 分泌CD8 $^{+}$ T細胞（細胞傷害性）；同じ徴候のため、ならびにまた、アレルギーの抑制および/または逆の調節もしくはアレルギーに対するワクチン接種、TH2関連自己免疫疾患の抑制もしくはこれら自己免疫疾患に対するワクチン接種のためのINF- α 分泌CD4 $^{+}$ T細胞；TH1抑制のためだけでなく、またTH2関連自己免疫疾患のための、またはこれらの自己免疫疾患に対するワクチン接種（寛容誘導）のための、IL-10またはTGF- β 分泌CD4 $^{+}$ T細胞；TH1関連自己免疫疾患の抑制、またはこれらの自己免疫疾患に対するワクチン接種のためのIL-4 分泌CD4 $^{+}$ T細胞；ならびに蠕虫感染の処置のためのIL-4またはIL-5 分泌CD4 $^{+}$ T細胞、が挙げられるが、これらに限定されない。

【0119】

本発明の方法に従って富化されたT細胞の集団を使用して、種々の障害を処置し得る。これらの障害に含まれるものは、癌である。腫瘍抗原に特異的なT細胞は、本発明の方法を使用して、得られ得る。腫瘍細胞は、個体から得られ得、そしてこれらの細胞は、同一の個体から得られたT細胞とインビトロで共培養され得る。適切な時間の細胞の共培養の後に、腫瘍特異的T細胞を、本発明の方法に従って富化し得る。次にこの富化された集団は、患者に再導入され得る。自系T細胞を使用する抗腫瘍免疫療法のための方法は、当該分野において公知である。例えば、WO 97/05239号を参照のこと。

【0120】

あるいは、抗腫瘍免疫療法の処置において使用される細胞は、異質遺伝子型であり得る。

10

20

30

40

50

異質遺伝子型T細胞を用いる癌の処置の種々の方法は、当該分野において記載され、そして本発明の方法において使用され得る。例えば、PCT公開第WO96/37208号を参考のこと。必要に応じて、異質遺伝子型T細胞は、個体への導入前に活性化され得る。活性化は、生物学的修飾因子、細胞表面マーカーを指向する抗体、または細胞表面レセプターについての、そのリガンドもしくはそのアナログとの接触を介して、生じ得る。

【0121】

本発明の富化されたT細胞集団の別の使用は、例えば、自己免疫疾患、炎症性障害、アレルギーおよび過敏症（例えば、遅延型過敏症および接触過敏症）の処置における免疫調節における使用である。自己反応性細胞の活性を破壊または抑制し得るT細胞は、インビトロで富化され得、必要に応じてインビトロで拡大され得、次に患者に再導入され得る。アレルギー応答の処置において、TH1細胞とTH2細胞との比を変化させ得るか、またはアレルゲン特異的細胞に対して反応性の細胞を、富化し、そして個体に導入し得る。10

【0122】

T細胞アレルギーの誘導もまた使用して、同種移植拒絶を、処置、寛解または予防し得、従って、器官移植の結果を改善し、そして患者を組織適合性とし得る組織型（histotype）の範囲を増加し得る。

【0123】

富化されたT細胞集団を含有する組成物をさらに、ワクチンとして使用して、ウイルス感染、自己免疫障害、アレルギー応答、癌、または他の障害のような疾患状態の発生の可能性を防ぐか、または実質的に減少し得るか、あるいは、その後に疾患に感染するか、または疾患に罹患する場合、その疾患の重篤度または持続時間を減少する。20

【0124】

細胞組成物は、任意の公知の経路（静脈内投与、非経口的投与、または局所的投与が挙げられるがこれらに限定されない）によって投与され得る。本発明の処置方法において、富化されたT細胞は、個体に投与される。全細胞数、用量数、および1用量あたりの細胞数は、処置される状態に依存する。一般に、約 10^6 ～ 10^{11} の細胞が、約5ml～1リットルの範囲の容量において投与される。細胞は、単回用量において、または選択された時間間隔にわたり数回の用量において、投与され得る。投与される細胞のうち、好ましくは少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約50%が、産物を分泌する抗原特異的T細胞である。30

【0125】

（キット）

所望される産物の分泌細胞の検出において使用される試薬が、都合のよいように、キットの形態でパッケージングされ得ることが意図される。このキットは、例えば、必要に応じて、調製されたゼラチン状の細胞培養培地において使用するための1つ以上の物質、所望の分泌産物の産生のための細胞インキュベーションのために使用される培地；アンカー部分および捕獲部分から構成される産物捕獲系；標識部分；ならびに試薬の使用のための指示書を含む。全ての試薬は、適切な容器中にパッケージングされる。

【0126】

キットはまた、以下を含むように処方され得る。この場合、全ての試薬は、好ましくは、細胞が添加される1つのバイアル中に配置される。特定の細胞表面構造またはアンカー部分、および産物について二重特異性である、少なくとも1つの抗体。少なくとも1つの標識部分、および必要に応じて、生物学的修飾因子。40

【0127】

必要に応じて、キットは、生理学的に受容可能なキャリアを含有し得る。そのような緩衝液は、当該分野において公知であり、そしてBSA含有PBSまたはBSA非含有PBS、等張生理食塩水、細胞培養培地、および特定の細胞型に必要とされる任意の特定の培地が挙げられるが、これらに限定されない。交差標識を減少し、そして細胞の周囲の局所的な産物濃度を増加する緩衝液が使用され得る。緩衝液は、粘性を増加するか、または透過性を減少する薬剤を含み得る。適切な薬剤は、本明細書において記載される。培地の粘性50

は、当該分野において公知の任意の方法（生理学的に受容可能な緩衝液中への溶解、熱溶解、EDTA溶解、および酵素溶解が挙げられるが、これらに限定されない）によって分析前に減少され得る。添加培地の非存在下で、培地中に既に懸濁されている細胞は、直接バイアルに添加され得る。適切な細胞懸濁液としては、細胞株および生物学的サンプルが挙げられるがこれらに限定されない。生物学的サンプルとしては、血液、尿および血漿が挙げられるが、これらに限定されない。

【0128】

さらなる構造物が、非結合産物を捕獲して、細胞の交差夾雜を減少し、それにより產生細胞から産物が拡散していくことを減少するために、添加され得る。これらには、ゲルエメント、ビーズ、磁気ビーズ、およびポリマーに固定化された抗-産物抗体が挙げられるが、これらに限定されない。10

【0129】

生物学的修飾因子もまた、緩衝液または培地に添加され、特異的分泌を誘導し得る。

【0130】

抗体（磁気的に、または蛍光的に標識された）のようなさらなる標識部分もまた、存在し得る。これらには、細胞型を同定する抗細胞表面マーカー抗体、死細胞を標識するヨウ化プロピジウム、および特定の細胞型を標識する磁気ビーズが挙げられるが、これらに限定されない。

【0131】

この実施態様において、すべての物質が、バイアルのような単一の容器中に配置され、そして細胞サンプルを添加し得る。内容物をインキュベートし、産物の分泌、ならびにその後の産物の捕獲および標識化部分の産物への結合を可能にする。次に、産物を分泌する細胞、および産物を結合する細胞が、捕獲産物の存在、非存在または量に基づいて、分類および／または分析され得る。分類は、当該分野において公知の任意の方法によってなされ得る。この方法には、単純な希釈、赤血球溶解、遠心分離・洗浄工程、磁気分離、FACSおよびフィコール分離が挙げられるが、これらに限定されない。細胞の分析は、種々の方法によって実行され得る。これらの方法には、FACS、画像化分析、細胞学的標識、および免疫アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。20

【0132】

以下の実施例は、単に本発明の説明の目的ために提供され、そして本発明の範囲を限定するためには、本発明の開示を考慮すると、特許請求の範囲内の多数の実施態様が、当業者にとって明らかである。30

【0133】

(実施例1)

末梢血单核細胞（PBMC）を、100U/mlのペニシリン、0.1mg/mlのストレプトマイシン、0.3mg/mlのグルタミン、10mMの2-メルカプトエタノール、および10%ヒトAB型血清（Sigma、St. Louis、MO）を含む完全RPMI 1640（Gibco BRL、Grand Island、NY）中で、細胞濃度 2×10^6 細胞/mlで培養した。インフルエンザウイルスマトリックスタンパク質由来のペプチドM1 58-66（GILGFVFTL；Neosystem、Strasbourg、France）を、1μMの最終濃度まで添加した。コントロール細胞をペプチドなしで培養した。40

【0134】

細胞を、7.5%CO₂含有雰囲気下で、37でインキュベートした。5時間および30分後、細胞を遠心分離により採集した。細胞を、細胞濃度 5×10^7 細胞/mlで、完全RPMI 1640中で、抗ヒトCD45mAb 5B1に結合した抗ヒトイインターフェロン（IFN-）モノクローナル抗体（mAb）4SB3（30μg/ml）と共に、8で7分間インキュベートした。次いで、細胞を、10%FCSを含む完全RPMI 1640を用いて、 2×10^6 細胞/mlに希釈し、そして37で45分間インキュベートした。次いで、細胞をペレットにし、そしてフィコエリトリン（PE）結合体化50

抗ヒトインターフェロン (IFN-) mAb NIB42 (4 µg/ml) および FITC 標識化抗 CD8 mAb と共に、PBS / BSA / EDTA 溶液 (0.05% BSA および 2 mM EDTA) 中で、4 度で 10 分間インキュベートした。次いで、細胞を PBS / BSA / EDTA 中で洗浄し、そして MicroBeads (Miltenyi Biotech) に結合体化したマウス抗 PE mAb 80-5 で、PBS / BSA / EDTA 中、8 度で 15 分間標識した。細胞を洗浄し、そして 500 µl の PBS / BSA / EDTA 中に再懸濁した。

【0135】

IFN- 分泌細胞を、磁気細胞分離システム MACS で富化させた。磁気で標識された細胞懸濁液を、MinimACS 分離ユニット中の MinimACS 分離カラム上にピペットし、その細胞懸濁液を通過させ、そしてそのカラムを 500 µl の緩衝液で 3 回洗浄した。この溶出液を負の画分 (N1) として採集した。このカラムを分離機から取り出し、そして適切な管上に配置した。1 ml の緩衝液をカラムの一番上にピペットし、そして磁気で標識された細胞を、プランジャーを用いて流し、そして二回目の MinimACS 分離に供した。

【0136】

もとの細胞 (すなわち、MACS 分離の前)、負の細胞画分 (一回目および二回目の MACS 分離のもの、N1 および N2 とそれぞれ称する) および二回目の MACS 分離の正の細胞画分 (P2) を、フローサイトメトリーで分析した。FACScan および CELL Quest 研究用ソフトウェア (Becton Dickinson, Mountain View, CA) をフローサイトメトリー分析に使用した。死んだ細胞および細胞細片を散乱特性に従って除去し、そしてヨウ化プロピジウム (PI; 0.3 µg/ml) で染色した。

【0137】

結果を図 1 A ~ P に示す。ドットプロット A ~ H は、ペプチドなしで培養したコントロール細胞の分析を示し、一方、プロット I ~ P は、ペプチド刺激細胞の分析を示す。ドットプロットは、出発細胞集団 (A および I) および富化細胞集団 (C および K) の散乱特性を示し；そして出発細胞集団 (B および J) ならびに富化細胞集団 (D および L) の PI 蛍光対 PE 蛍光を示す。

【0138】

ドットプロット E ~ H および M ~ P は、もとの細胞画分 (E および M)、一回目の負の細胞画分 (F および N)、二回目の負の細胞画分 (G および O)、および最終の正の細胞画分 (H および P) におけるゲート細胞の抗 CD8 - FITC 染色対抗 IFN- - PE 染色を示す。

【0139】

コントロール細胞集団中で、CD8⁺IFN-⁻細胞は生存細胞 (図 1 H) 中 11% まで富化したが、一方ペプチド刺激細胞集団中では、CD8⁺IFN-⁻細胞は 40% まで富化した (図 1 P)。3.5 × 10⁷ コントロール細胞の出発集団から、約 600 の CD8⁺IFN-⁻ 細胞を単離し、3.5 × 10⁷ ペプチド刺激細胞の出発集団から単離した 4100 の CD8⁺IFN-⁻ 細胞と比較した。

【0140】

PE 標識された抗 IFN- で明るく染色された CD8 細胞は、CD19⁺B 細胞 (識別試薬 (おそらく PE) に特異的な最も可能生のある B 細胞) であった。これらの細胞は、ペプチドで刺激した細胞と比較して、コントロール細胞から同じ程度まで富化された。

【0141】

PE 標識された抗 IFN- でうす暗く染色された CD8⁻ 細胞 (CD8⁺IFN-⁻ 細胞のような) もまた、ペプチドで刺激した細胞と比較して、コントロール細胞から同じ程度まで富化された。このような細胞は、部分的に CD4 および CD56 について染色し、従って、IFN-⁻ を分泌する最も可能性のある T ヘルパー細胞または NK 細胞である。

【0142】

10

20

30

40

50

従って、インビトロの内部抗原特異的刺激によらない($CD4^+$)Tヘルパー細胞、($CD8^+$)細胞傷害性T細胞および($CD56^+$)NK細胞による基底レベルのIFN- γ の分泌が存在し、これは、血液サンプリング時に進行中の免疫応答において、インビオですでに誘導されたIFN- γ 分泌を最も可能に反映する。

【0143】

しかし、HLAクラスI制限インフルエンザペプチドM1 58-66で刺激されることによって誘導されるIFN- γ ⁺分泌CD8⁺細胞は、このバックグラウンドレベルを超えて有意に富化された；従って、ペプチド刺激された細胞から富化された、大部分のCD8⁺IFN- γ 細胞は、ペプチド特異的T細胞である。富化された細胞の特異性は、さらにV 17 TCR(これは、M1 58-66特異的細胞傷害性T細胞中の保存されたT細胞レセプター(TCR)セグメントである)の存在についての染色について確認された。¹⁰ Lehnerら(1995)J. Exp. Med. 181:79-91；およびLal vaniら(1997)J. Exp. Med. 186:859-865。コントロール細胞から単離されたIFN- γ ⁺細胞ではほとんど発現しないが、ペプチド刺激された細胞から単離されたIFN- γ ⁺細胞のほとんどがV 17⁺TCRを発現する。

【0144】

(実施例2)

末梢血単核細胞(PBMC)を、100U/mlのペニシリン、0.1mg/mlのストレプトマイシン、0.3mg/mlのグルタミン、10mMの2-ME、および10%ヒトAB型血清(Sigma、St. Louis、MO)を含む完全 RPMI 1640(Gibco BRL、Grand Island、NY)中で、 2×10^6 細胞/mlで培養した。インフルエンザウイルスマトリックスタンパク質由来のペプチドM1 58-66(GILGFVFTL；Neosystem、Strasbourg、France)を、1μMの最終濃度に添加した。コントロール細胞をペプチドなしで培養した。²⁰

【0145】

5時間30分後、細胞を遠心分離により採取した。細胞を、 5×10^7 細胞/mlで、完全RPMI 1640中で、抗ヒトCD45mAb 5B1(30μg/ml)に結合した抗ヒトイントフェロン(IFN- γ)mAb 4S83と共に、8℃で7分間インキュベートした。次いで、細胞を、10%FCSを含む完全RPMI 1640を用いて、 2×10^6 細胞/mlに希釈し、そして37℃で45分間インキュベートした。次いで、細胞をスピンドウンし、そしてフィコエリトリン(PE)結合体化抗ヒトIFN- γ mAb NIB42(4μg/ml)およびFITC標識化抗CD8と共に、PBS/BSA/EDTA溶液中で、4℃で10分間インキュベートした。次いで、細胞をPBS/BSA/EDTA中で洗浄し、そしてマウス抗PE mAb 80-5結合体化MicroBeads(Miltenyi Biotech)を用いて、PBS/BSA/EDTA中、8℃で15分間標識した。細胞を洗浄し、そして500μlのPBS/BSA/EDTA中に再懸濁した。³⁰

【0146】

IFN- γ 分泌細胞を、磁気細胞分離システムMACSで富化させた。磁気で標識された細胞懸濁液を、MinimACS分離ユニット中のMinimACS分離カラムの一番上にピペットし、細胞懸濁液を通過させ、そしてカラムを500μlの緩衝液で3回洗浄した。この溶出液を負の画分として採取した。このカラムを分離器から取り出し、そして適切な管上に配置した。1mlの緩衝液をカラムの一番上にピペットし、そして磁気で標識された細胞を、プランジャーを用いて還流し、そして二回目のMinimACS分離に供した。⁴⁰

【0147】

もとの細胞(すなわち、MACS分離の前)、負の細胞画分(一回目および二回目のMACS分離のもの)および二回目のMACS分離の正の細胞画分を、フローサイトメトリーで分析した。FACScanおよびCELLQuest研究用ソフトウェア(Becton Dickinson、Mountain View、CA)をフローサイトメトリー⁵⁰

に使用した。死んだ細胞および細胞細片を、実施例1に示すように、散乱特性に従って除去し、そしてヨウ化プロピジウム(PI; 0.3 μg/ml)で染色した。この結果を図2に示す。

【0148】

ドットプロット2A～Gはペプチドなしで培養したコントロール細胞の分析を示し、プロット2J～Rはペプチド刺激細胞の分析を示す。

【0149】

ドットプロット2A～Dおよび2J～Mは、もとの細胞画分(A、J)、一回目の負の細胞画分(B、K)、二回目の負の細胞画分(C、L)および最終の正の細胞画分(D、M)における、ゲート細胞のFITC標識された抗CD8対PE標識された抗IFN-染色を示す。10

【0150】

コントロール細胞において、CD8⁺IFN-細胞を生存細胞の8.2%まで富化した(2D)。ペプチド刺激細胞から、CD8⁺IFN-細胞を41.6%(2M)まで富化した。6.1 × 10⁷のコントロール細胞から、約1360のCD8⁺IFN-細胞を単離して6.9 × 10⁷のペプチド刺激細胞をからの11700のCD8⁺IFN-細胞と比較した。

【0151】

HLAクラスI制限インフルエンザペプチドM1 58-66を用いた刺激により誘導されるIFN-⁺分泌CD8⁺細胞は、有意にバックグラウンドレベルより上に、有意に富化された(すなわち、ペプチド刺激細胞から富化された大部分のCD8⁺IFN-⁺細胞は、ペプチド特異的T細胞であるはずである)。富化された細胞の特異性は、V17TCR(これは、M1 58-66特異的細胞傷害性T細胞中の保存されたT細胞レセプターセグメントである)に対する染色によりさらに確認された(Lehner 1995; Lalvani 1997)。ペプチド刺激細胞から単離されたIFN-⁺細胞の中でのみ、大部分がV17⁺TCRを発現し、コントロール細胞から単離されたIFN-⁺細胞の大部分では、発現しない(2F対2O)20

以下の実施例は、適切な抗原特異的刺激であるCD4⁺およびCD8⁺リンパ球は、サイトカインを迅速に発現することを示す。この技術は、ここで、HLA-A0201制限インフルエンザマトリックスタンパク質(FLU)ペプチド58-66特異的CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、インフルエンザAウイルスおよび組換え破傷風毒素C(rTT.C)フラグメント特異的Tヘルパー1型(Th1)細胞、および破傷風トキソイド(TT)特異的Tヘルパー2型(Th2)細胞について実証される。30

【0152】

(実施例3)

(実施例4～8の材料および方法)

(細胞およびエキソビオ刺激)

バフィーコートをthe Institute for Transfusions medicine, Hospital Merheim, Cologne, Germanyより入手した。そして必要である場合、HLA型に基づいて選択した。PBMCを、標準的なFicoll-Paque(Pharmacia, Uppsala, Sweden)密度勾配遠心分離法により調製し、そしてPBS中で2回洗浄し、そして10%(wt/vol)ヒトAB血清(Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany)、1mMのL-アラニル-グルタミン(Life Technologies)、100U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン(Life Technologies)、0.05mMの2-メルカプトエタノール(Life Technologies)および1mMのピルビン酸ナトリウム(Life Technologies)を補充した RPMI 1640(Life Technologies, Paisley, UK)からなる細胞培養培地中に、1mlあたり2 × 10⁶細胞の細胞濃度で再懸濁した。12.5mlの細胞懸濁液を、100 × 20mmの組織培養ディッシュ(4050

Sarstedt, Newton, MA) 中に配置し、そして FLU 58-66 ペプチド (Neosystems, Strasbourg, France) を最終濃度 1 μM まで添加し、そして精製インフルエンザ A ウイルス調製物 (Biodesign, Kenebunk, ME) を最終濃度 μg/ml まで添加し、rTT.C (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を最終濃度 7 μg/ml まで添加し、そして精製 TT (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) を最終濃度 1 μg/ml まで添加した。細胞を加湿 7.5% CO₂ 霧囲気下、37°で 5~10 時間インキュベートした。

【0153】

(細胞親和性マトリックスによる分泌サイトカインの捕獲)

10

CD45 に対する Ab - Ab 結合体および IL-4 もしくは IFN- のいずれかを、標準的なタンパク質カップリング技術により生成した。Aslamら (1998) Bioc conjugation, Macmillan Reference Ltd., London。エキソビオ刺激の後、ディスボーサブル細胞スクレーパ (Costar, Cambridge, MA) を用いて細胞を採取し、そして 1 mlあたり 50 μg の Ab - Ab 結合体で、氷冷培地で 1 mlあたり 10⁸ 細胞の細胞濃度で、7 分間標識した。次いで、細胞を、最終細胞濃度が 1 mlあたり 2 × 10⁶ 細胞まで培地で希釈し、そして加湿 7.5% CO₂ 霧囲気下で 37°で 45 分間分泌させた。

【0154】

(サイトカイン分泌細胞の磁気的富化および検出)

20

サイトカイン捕獲期間の後、細胞を再び採取し、リン酸緩衝化生理食塩水 (0.5% (w/v) ウシ血清アルブミンおよび 5 mM EDTA (緩衝液) を含む) 中に 1 mlあたり 10⁸ 細胞の細胞濃度で再懸濁し、そして 5 μg/ml の抗 IFN- - PE または抗 IL-4 - PE をそれぞれ用いて +4°で 10 分間染色した。細胞を緩衝液 (300 × g、10 分) で洗浄し、400 μl の緩衝液中に再懸濁し、そして 100 μl の抗 PE Ab - マイクロビース (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて、+4°で 15 分間、磁気的に標識した。洗浄後、この細胞を MS + カラム上に適用し、そして MiniMACS 磁石 (Miltenyi Biotech) 中に配置した。このカラムを緩衝液でリーンスし、そしてより高い富化速度を達成するために磁界からカラムを除去した後、保持された細胞をカラムから溶出し、最初のカラムから溶出された細胞を別の MS + カラムに適用し、そして磁気分離を繰り返した。細胞サンプルを、FACScalibur フローサイトメーター (Becton Dickinson, San Jose, CA) で、CellQuest ソフトウェアパッケージを用いて分析した。

30

【0155】

(サイトカイン分泌細胞の磁気富化および検出)

サイトカイン分泌細胞の検出、計数および表現型化について、以下の試薬を使用した：抗 IFN- - CD45 (抗 IFN- 、クローン 4SB3; CD45、クローン 5B1、W. Knapp, Vienna, Austria)、抗 IFN- - PE (クローン 45-15)、抗 IL-4 - CD45 (抗 IL-4、クローン 1A6-10; CD45、クローン 5B1、W. Knapp, Vienna, Austria)、抗 IL-4 - PE (クローン 7A3-3) CD8 - Cy5 (クローン BM135/80、Behring Diagnostics, Marburg, Germany)、CD4 - Cy5 (クローン M-T321、Behring)、CD4 - FITC (クローン SK3、Becton Dickinson)、CD27 - FITC (クローン M-T271、Pharmingen, San Diego, CA)、CD28 - FITC (クローン CD28.2, Pharmingen) CD57 - FITC (クローン HNK-1、Becton Dickinson)、抗 V 17. FITC (クローン E17.5F3.15.13、Coulter-Imunotech, Marseille, France)。Meagerら (1984) Interferon Res. 4: 619~625; Alkanら (199

40

50

4) J. Immunoassay 15: 217~225; および Birdら(1991)
) Cytokine 3: 562~567。

【0156】

(細胞傷害性活性アッセイ)

富化されたサイトカイン分泌細胞の細胞傷害性活性を、以前に記載されたフローサイトメトリーに基づくアッセイを用いて分析した。Mattisら(1997) J. Immunol. Met. 204: 135~142。簡単には、 1×10^6 HLA-A.1⁺T2細胞を、1mlあたり4μgのグリーン蛍光色素DiO(Molecular Probes, Eugene, OR)を用いて、5mM EDTAおよび3%ウシ胎仔血清を含むリン酸緩衝化生理食塩水中で、37度、45分間標識した。細胞を緩衝液で3回洗浄し、細胞培養培地中に再懸濁し、そして1μM Flu58-66ペプチドまたはMelan A/MART1 27-35ペプチド(Bachem, Heidelberg, Germany)を、加湿7.5%CO₂雰囲気下で37度一晩、ロードした。富化したサイトカイン分泌細胞を、組換えヒトIL-2(Peprotech, London, U.K.)存在下の組織培養中で18日間増殖させた。増殖させたサイトカイン分泌細胞およびペプチドロードしたDiO標識HLA-A2.1⁺T2細胞を、1:1の比率で、加湿7.5%CO₂雰囲気下で37度、16時間同時培養した。培養期間後、細胞を採取し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。生存しているDiO標識化T2細胞と死んだDiO標識化T2細胞との間の区別を可能にするために、サンプルを赤色蛍光排除色素ヨウ化プロピジウムで対比染色した。

【0157】

(実施例4)

合成ペプチドパルスAPCまたは天然抗原パルスAPCでの短期間の抗原性再刺激の後のIFN-αのようなエフェクターサイトカインを分泌する能力は、記憶/エフェクターCD4⁺(Th1型)およびCD8⁺T細胞の代表的な特徴である。Salmonら(1989) J. Immunol. 143: 907~912; およびHamzaanら(1997) 186: 1407~1418。IFN-αの抗原誘導化分泌および細胞親和性マトリックス技術に基づく末梢血から直接的に、低頻度の記憶/エフェクター抗原特異的CD4⁺およびCD8⁺T細胞を単離するために、HLAが一致した成人の健康な血液ドナー由来の末梢血単核細胞(PBMC)を、5~6時間、以下を用いて刺激した:(a) HLA-A0201制限FLUペプチド58-66、(b) 精製インフルエンザAウイルス調製物、および(c) rTT.C。刺激期間後、IFN-αに対する親和性マトリックスを、CD45およびIFN-αに対する抗体(Ab)-Ab結合体を用いて細胞表面上で作製し、そして細胞を45分間、培養物中でIFN-αを分泌させた。次いで、分泌細胞の親和性マトリックスに再配置させたIFN-αを、フィコエリトリン(PE)結合体化IFN-α特異的Abで染色し、そしてPE標識化細胞を抗PE Abマイクロビーズを用いてMACSにより富化した。Brosterhusら、10th International Congress in Immunology, New Delhi, India, 1~6 1998年11月、1469~1473頁もまた参考のこと。

【0158】

非刺激コントロールサンプルと比較して、有意により高い割合のIFN-α分泌CD8⁺細胞は、FLU58-66ペプチド刺激サンプル(図3A: 38.3%対13.7%)中の富化後、検出可能であり、そして有意により高い割合のIFN-α分泌CD4⁺細胞は、それぞれ、インフルエンザAウイルス調製物で刺激したサンプル(図3B: 35.5%対1.1%)およびrTT.Cで刺激したサンプル(図3C: 6.1%対0.3%)中の富化後、検出可能であった。富化IFN-α分泌T細胞の絶対数および全PBMC中のそれらの頻度で見る場合、刺激サンプルと非刺激サンプルとの間の差異は、さらにより顕著である:(a) 12,500のIFN-α分泌CD8⁺T細胞を 5.3×10^7 FLU58-66ペプチド刺激PBMCから単離し(頻度4,200分の1)、そして1370のIFN-α分泌細胞CD8⁺T細胞を、 5.1×10^7 非刺激PBMCから単離した(頻度10)

度：37,000分の1）；（b）351のIFN- 分泌CD4⁺T細胞を 5×10^6 のインフルエンザAウイルス刺激PBMCから単離し（頻度14,000分の1）、そして4個のIFN- 分泌CD4⁺T細胞を 5.0×10^6 の非刺激PBMCから単離した（頻度1,250,000分の1）；ならびに（c）132のIFN- 分泌CD4⁺T細胞を 1.8×10^7 のrTT.C刺激PBMCから単離し（頻度：136,000分の1）、そして7個のIFN- 分泌CD4⁺T細胞を 1.9×10^7 の非刺激PBMCから単離した（頻度：約2,710,000分の1）。これらの実験結果を考慮すると、 10^{-6} 以下の頻度で存在するIFN- 分泌T細胞が、本発明者らの技術で検出され得る。

【0159】

（実施例5）

記憶型CD8⁺T細胞およびエフェクター型CD8⁺T細胞の両方は、IFN- を分泌し得る。Hamannら（1997）。FLU58-66ペプチド特異的CD8⁺T細胞の表現型を決定するために、FLU58-66ペプチド刺激サンプルおよびコントロールサンプル由来の富化IFN- 分泌CD8⁺T細胞を、記憶型CD8⁺T細胞とエフェクター型CD8⁺T細胞との間を区別し得る、白血球表面マーカーのパネルの発現について三色免疫蛍光法によって分析した。Hamannら。図2に示すように、大部分のFLU58-66ペプチド特異的CD8⁺T細胞は、（1997）記憶表現型と一致するCD27⁺、CD28⁺およびCD57⁻であった。一方、FLU58-66ペプチドと独立して単離された大部分のIFN- 分泌CD8⁺Tは、エフェクター表現型と一致するCD27⁻、CD28⁻、CD57⁺であった。後者は、インビボで誘導されてIFN- を分泌し得、従って、進行中の免疫応答を反映したかもしれない。

【0160】

コントロールサンプル由来の2.2%未満のIFN- 分泌CD8⁺T細胞と比較して、FLU58-66ペプチド刺激サンプル由来の、54.8%より多いIFN- 分泌CD8⁺T細胞が、V17TCR鎖を発現した（図4）。このことは、HLA-A0201制限FLUペプチド58-66特異的CD8⁺T細胞の最初はクローニングCTLにおいて、V17TCR鎖の使用への偏向、後にPBMCにおいても、FLU58-66ペプチドをロードしたHLA-A2.1分子の蛍光テトラマーの使用への偏向を示す以前の報告を確認する。Lehnerら（1995）J. Exp. Med. 181: 79~91；およびDunbarら（1998）。

【0161】

（実施例6）

FLU58-66ペプチド刺激PBMC由来の富化IFN- 分泌CD8⁺T細胞の特異性をさらに確認するために、そしてそれらの細胞傷害性活性を研究するために、これらの細胞をIL-2の存在下の組織培養中で18日間増殖させ、次いで1:1のエフェクタ- : 標的の割合でのCTL活性についてアッセイした。図5に示すように、標的細胞をFLU58-66ペプチドでロードした場合、有意な殺傷が観察されたが、標的細胞をコントロールペプチド（Melan A/MART 1 27-35）でロードした場合、観察されなかった。

【0162】

（実施例7）

49のHLA-A2+個体由来のPBMCを、FLU58-66ペプチドを伴ってか、または伴わずに培養し、そして実施例3に記載されるようにIFN- 分泌細胞についての富化手順に供した。45の場合において、コントロールサンプルと比較して、平均約80倍より多いIFN- 分泌CD8⁺T細胞を、FLU58-66ペプチド刺激サンプルから単離した。3つの場合においてのみ、有意な差異は、両サンプル間で検出されなかった。PBMC間のFLU58-66ペプチド特異的CD8⁺T細胞の平均頻度は、FLU58-66ペプチド刺激化サンプルの頻度からコントロールサンプルの頻度を減算することによって決定されるように、30,000分の1（600,000分の1~1000分の1との間の範囲）であった。これらの結果は、以前の報告と完全に一致する。FLU58

10

20

30

40

50

- 66 ペプチド特異的 CD8⁺T 細胞の頻度を、単一細胞の IFN- γ の放出または FLU58-66 ペプチドロードした HLA-A2.1 分子の四量体についての酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイを用いて決定した。 Lalvani (1997); および Dunbar (1998))。

【0163】

(実施例 8)

本発明者らのアプローチが生存している抗原特異的 Th2 型 CD4⁺T 細胞を単離することを実証するために、PBM C を精製した TT で刺激し、そして IL-4 分泌 CD4⁺T 細胞を、CD45 および IL-4 に対する Ab - Ab 結合体を用いて単離した。10 時間の TT 刺激の後、150 の IL-4 分泌 CD4⁺T 細胞を、 2.2×10^7 の PBM C から単離し得、純度は 6,89% であった (図 6)。これは、全 CD4⁺T 細胞における TT 特異的 Th2 細胞の頻度である、94,000 分の 1 に対応する。TT なしのコントロール培養物における IL-4 分泌 CD4⁺T 細胞の頻度は、約 10 倍低かった。

【0164】

本明細書中で引用される全ての参考文献、前出および後出の両方は、本明細書により本明細書中に援用される。前述の発明が、明確さおよび理解する目的のための例示および実施例によりいくらか詳細に記載されているが、特定の変更および改変が実施され得ることは当業者に明らかである。従って、本説明および実施例は、添付の特許請求の範囲により表される本発明の範囲を制限するよう解釈されるべきでない。

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 A - P は、実施例 1 で記載した分離プロトコールに供した細胞の分析を示す FACS プロットである。A - H はペプチドなしで培養したコントロール細胞の分析を示す。I - P はペプチド刺激細胞の分析を示す。A、C、I および K は、開始時の細胞集団 (A および I) ならびに富化細胞集団 (C および K) の分散の特性を示す。B、D、J および L は、開始時の細胞集団 (B および J) ならびに富化細胞集団 (D および L) の PI 対 PE 染色のプロフィールを示す。プロット E - H および M - P は、開始時の細胞集団 (E および M)、最初の陰性集団 (F および N)、2 番目の陰性集団 (G および O) および 富化細胞集団 (H および P) の、FITC 標識抗 CD8 対 PE 標識抗 IFN- γ 染色を示す。

【図 2】図 2 A - N は、実施例 2 で記載した分離プロトコールに供した細胞の分析を示す FACS プロットである。A - G は、ペプチドなしで培養したコントロール細胞の分析を示す。N - R は、ペプチド刺激細胞の分析を示す。A - D および H - K は、開始時の細胞集団 (A および J)、最初の陰性集団 (B および I)、2 番目の陰性集団 (C および J) および 富化細胞集団 (D および K) の、FITC 標識抗 CD8 対 PE 標識抗 IFN- γ 染色を示す。F および M は、富化細胞集団の V17TCR に対する染色を示す。

【図 3】図 3 は、生抗原特異的 CD4⁺ および CD8⁺T 細胞の、IFN- γ の分泌に基づいた富化および検出を示す一連のドットプロットである。ドットプロットは、HLA-A0201 - 制限 FLU58-66 ペプチドと共に (A、B) または無しで (C、D)、精製インフルエンザ A ウィルス調製物 (と共に (E、F) 無しで (G、H))、および rTTC (と共に (I、J) 無しで (K、L)) で刺激した健常な成人ドナー由来の PBM C の、IFN- γ 分泌細胞の磁気富化前 (A、C、E、G、I、K) および後 (B、D、F、H、J、L) の、CD8-Cy5 対抗 IFN- γ - PE (A - D) または CD4-Cy5 対抗 IFN- γ - PE (E - L) 染色を示す。生リンパ球は、光散乱特性およびヨウ化プロピジウム排除によって制御された (gated)。

【図 4】図 4 は、富化 FLU58-66 ペプチド特異的 CD8⁺T 細胞の表現型分析を示す一連のドットプロットである。FLU58-66 ペプチド刺激 PBM C (A、B、E、F) 由来、およびコントロールとして非刺激 PBM C (C、D、G、H) 由来の富化 IFN- γ 分泌 CD8⁺T 細胞を、抗 IFN- γ - PE で染色、および CD27、CD28、CD57 および TCR V17 鎖に対する FITC 結合抗体で対比染色した。生 CD8⁺T 細胞を制御 (gating) するために、光散乱特性、ヨウ化プロピジウムおよび C

10

20

30

40

50

D 8 - C y 5 染色を使用した。

【図5】図5は、富化および増殖させたF1u58-66ペプチド特異的T細胞の細胞溶解活性を示すグラフである。F1U58-66ペプチド刺激PBMC由来のIFN- 分泌CD8⁺T細胞を、IL-2存在下の組織培養で18日間増殖させ、次いでCTL活性アッセイに関してアッセイした。図は、F1u58-66ペプチドか、または陰性コントロールペプチドMelan A/MART 1 27-35のいずれかを用いて適用された溶解したHLA-A2.1+T2細胞の割合を示す。

【図6】図6は、TT特異的IL-4分泌CD4⁺T細胞の単離および検出を示す一連のドットプロットである。ドットプロットは、IL-4分泌細胞の磁気富化有り(A、C)または無し(B、D)で刺激した健常な成人ドナー由来のPBMCの、CD4-Cy5対抗IL-4-PE染色を示す。生リンパ球は、光散乱特性およびヨウ化プロピジウム排除によって制御された(gated)。

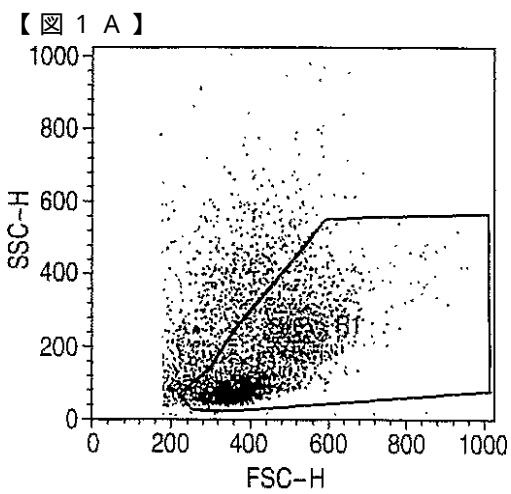


FIG. 1A

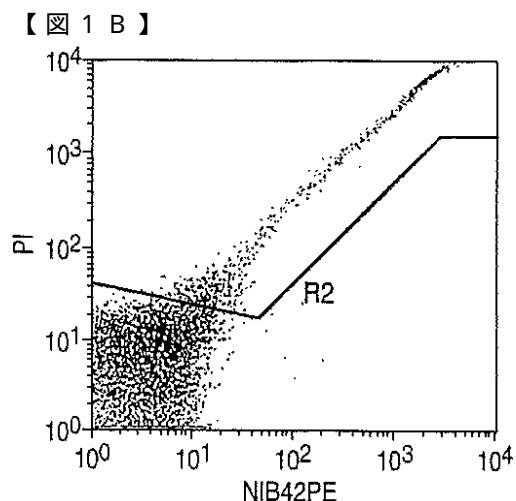
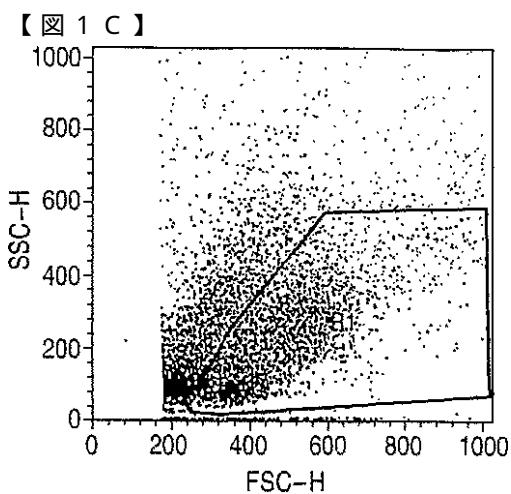
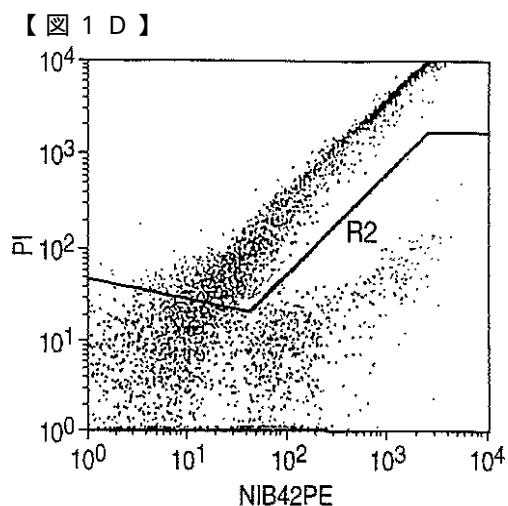
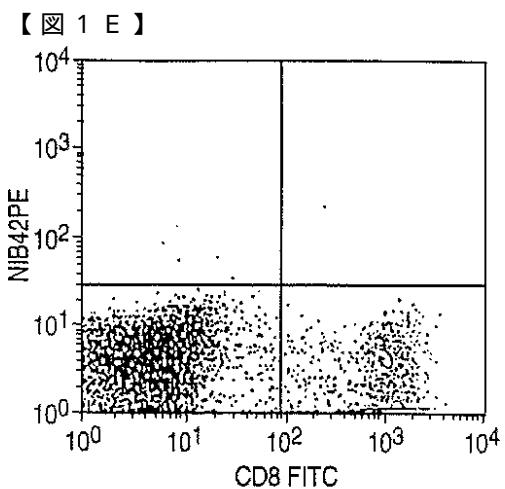
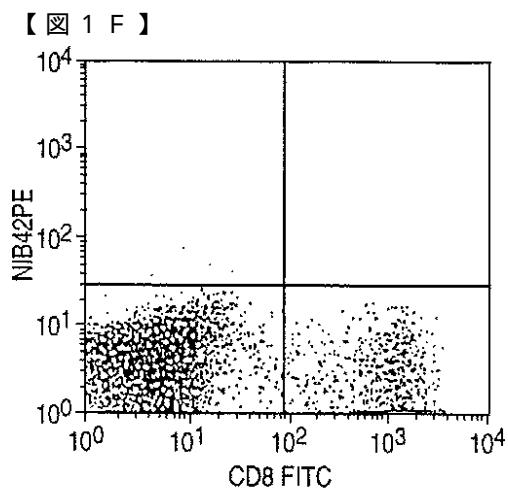
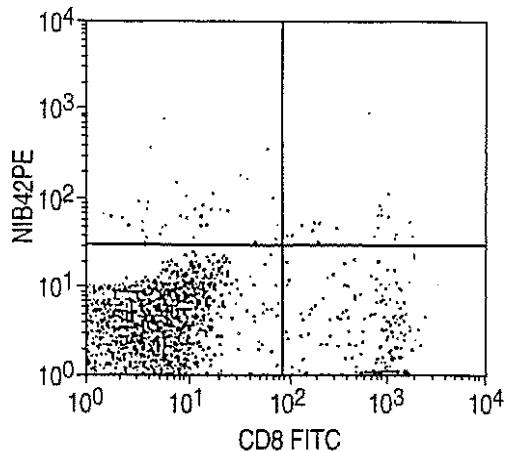


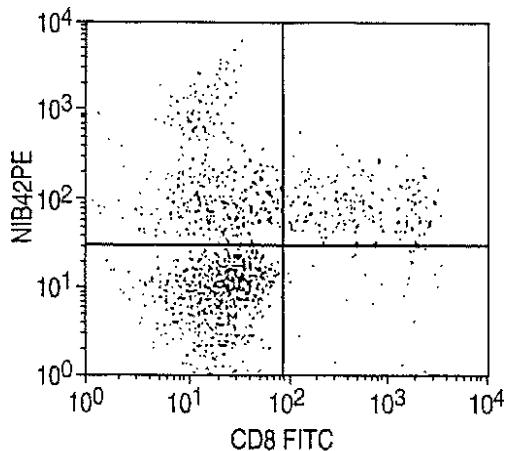
FIG. 1B

**FIG. 1C****FIG. 1D****FIG. 1E****FIG. 1F**

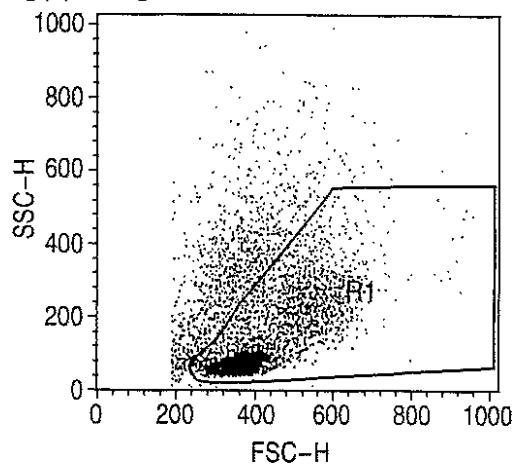
【図 1 G】

**FIG. 1G**

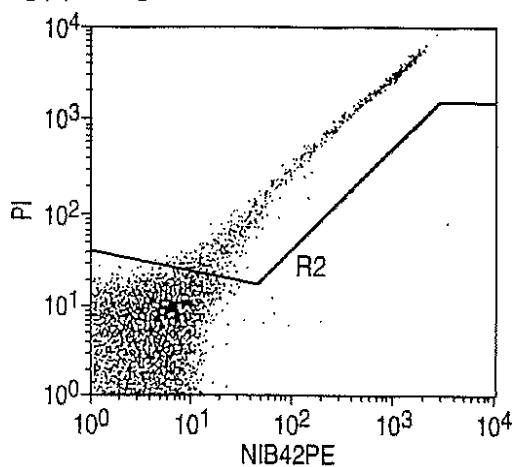
【図 1 H】

**FIG. 1H**

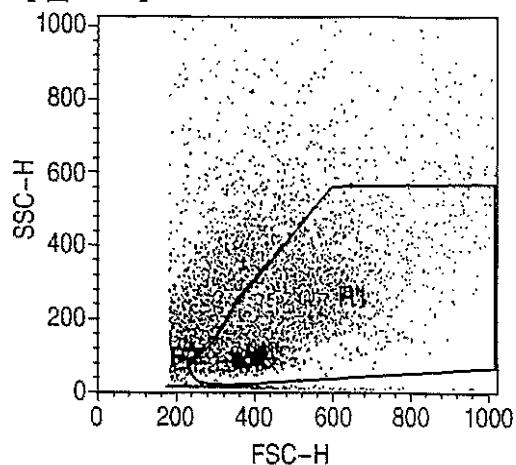
【図 1 I】

**FIG. 1I**

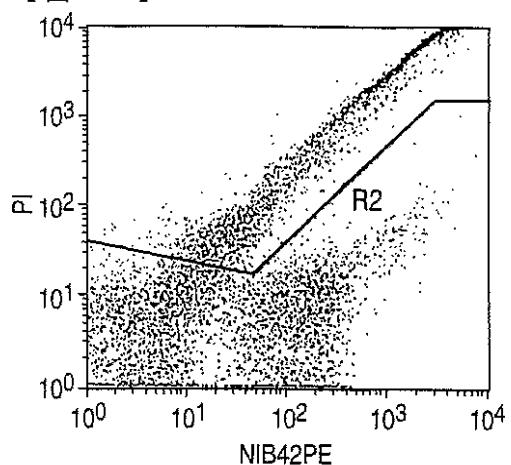
【図 1 J】

**FIG. 1J**

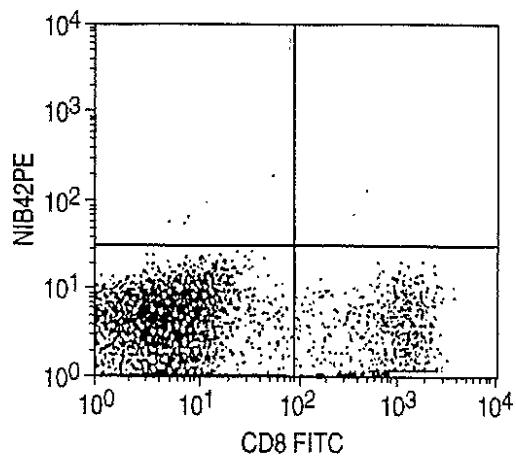
【図 1 K】

**FIG. 1K**

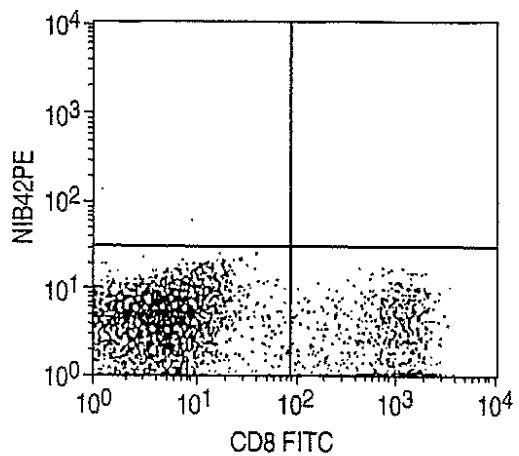
【図 1 L】

**FIG. 1L**

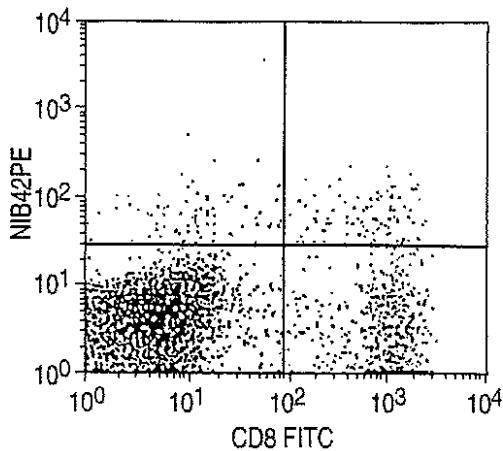
【図 1 M】

**FIG. 1M**

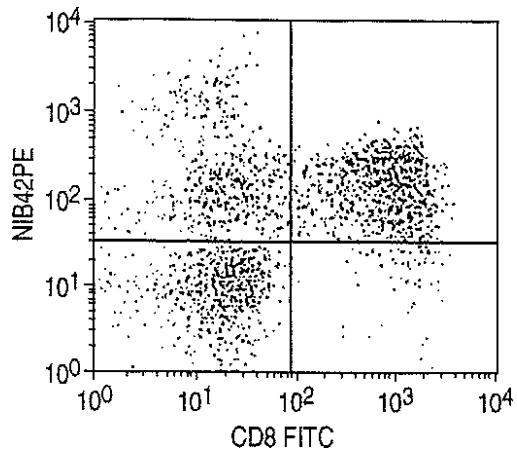
【図 1 N】

**FIG. 1N**

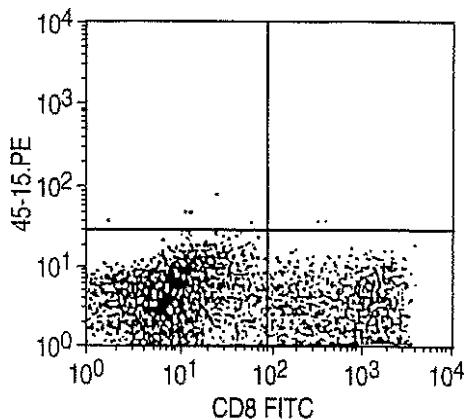
【図 1 O】

**FIG. 1O**

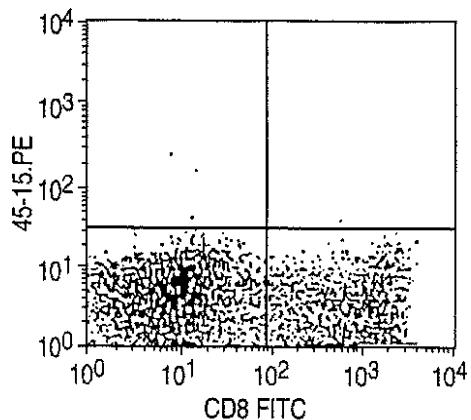
【図 1 P】

**FIG. 1P**

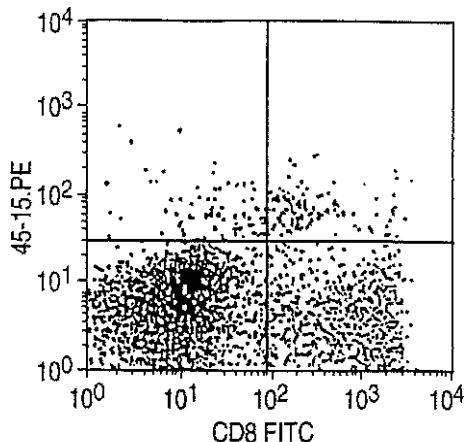
【図 2 A】

**FIG. 2A**

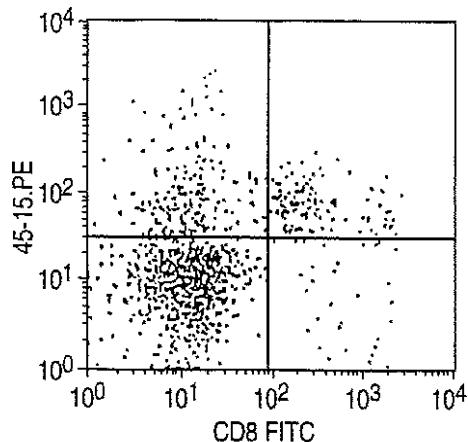
【図 2 B】

**FIG. 2B**

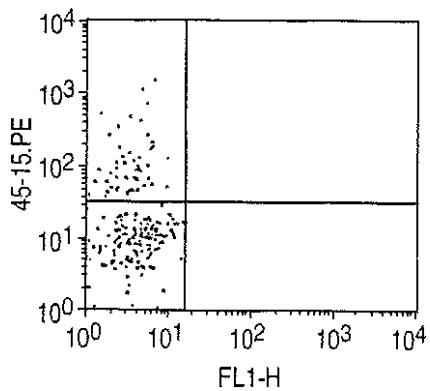
【図 2 C】

**FIG. 2C**

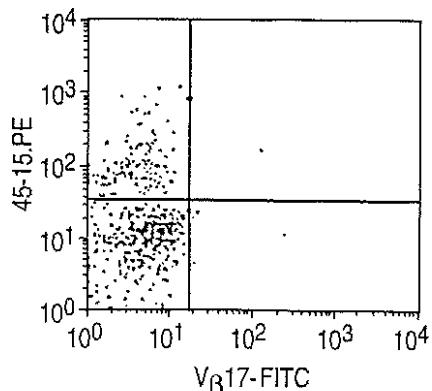
【図 2 D】

**FIG. 2D**

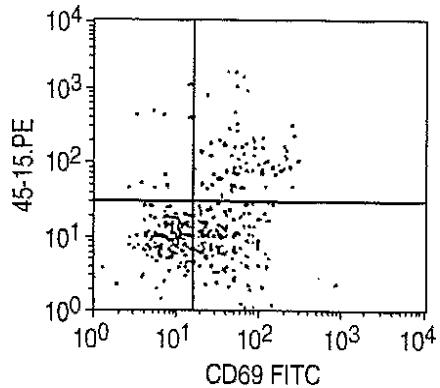
【図 2 E】

**FIG. 2E**

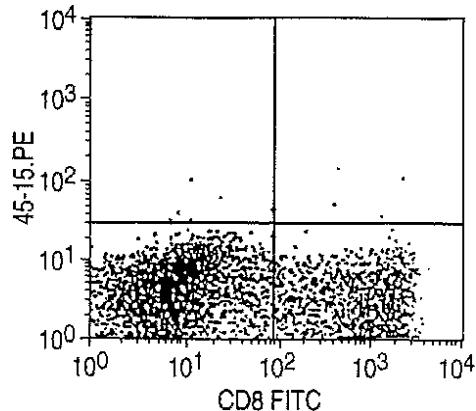
【図 2 F】

**FIG. 2F**

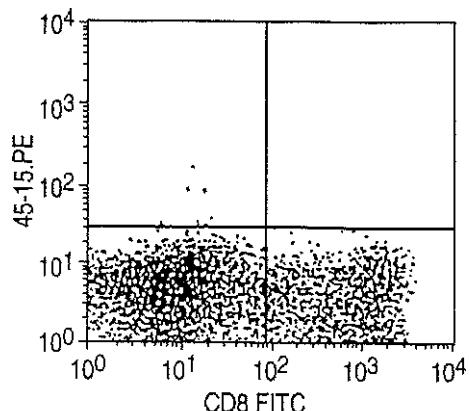
【図 2 G】

**FIG. 2G**

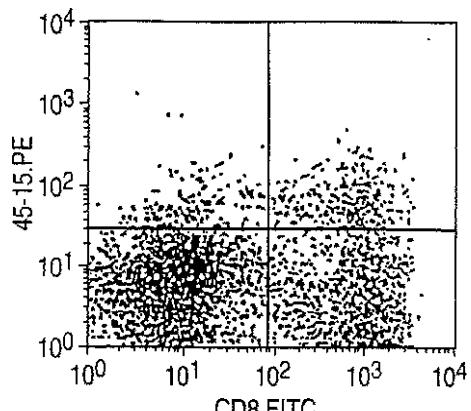
【図 2 H】

**FIG. 2H**

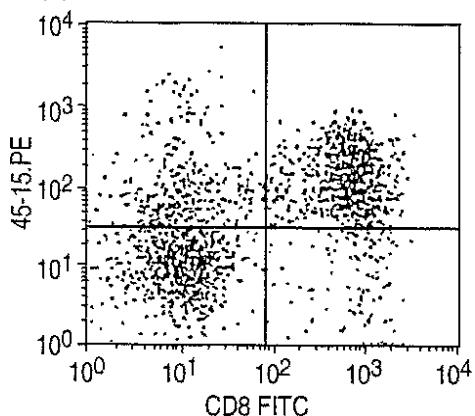
【図 2 I】

**FIG. 2I**

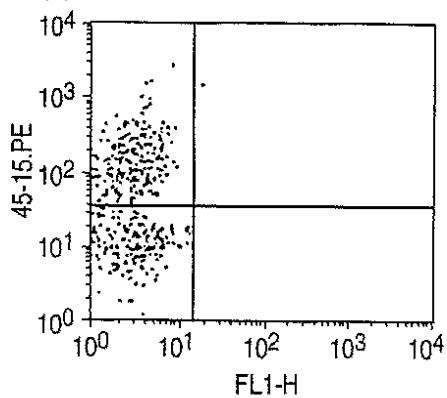
【図 2 J】

**FIG. 2J**

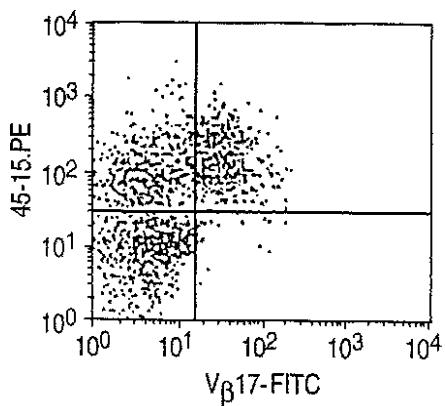
【図 2 K】

**FIG. 2K**

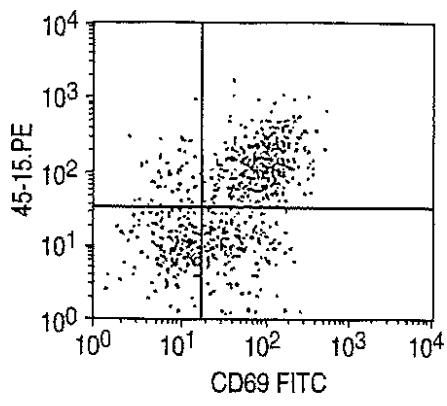
【図 2 L】

**FIG. 2L**

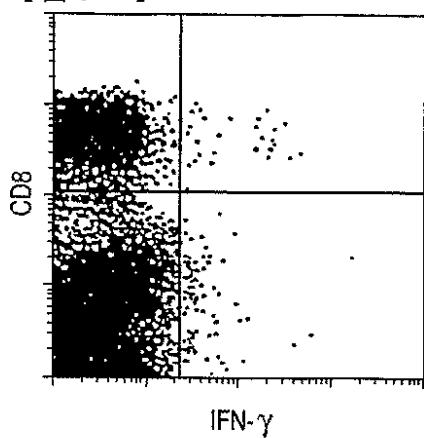
【図 2 M】

**FIG. 2M**

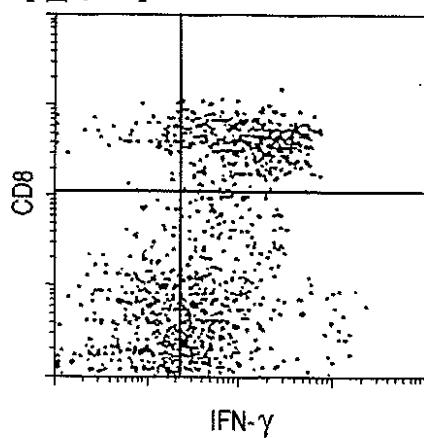
【図 2 N】

**FIG. 2N**

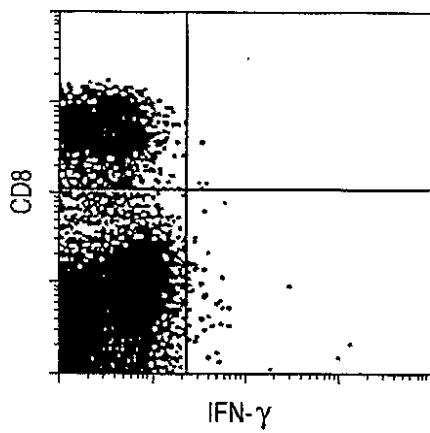
【図3A】

**FIG. 3A**

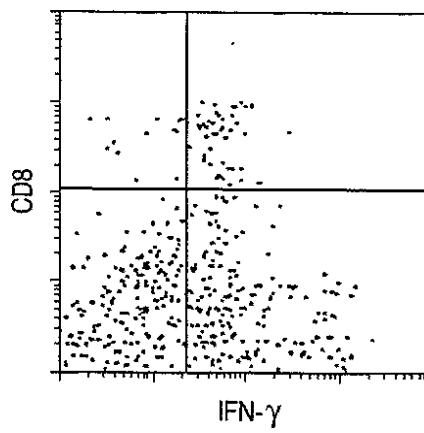
【図3B】

**FIG. 3B**

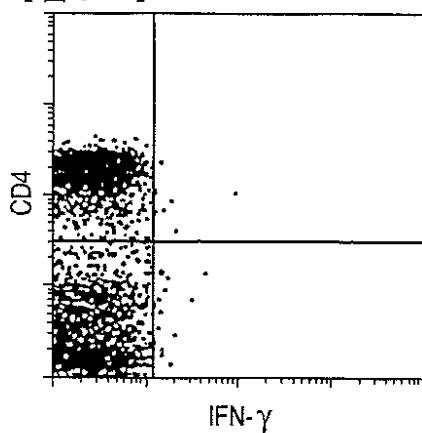
【図3C】

**FIG. 3C**

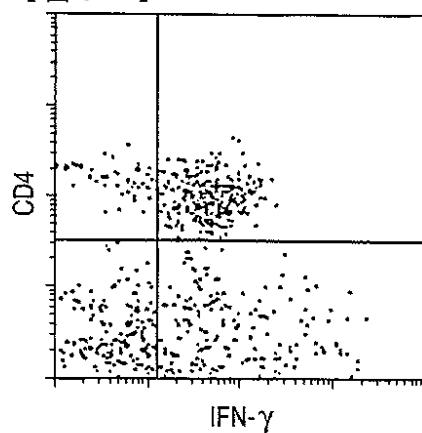
【図3D】

**FIG. 3D**

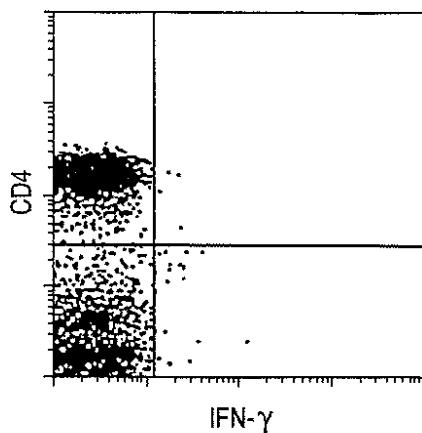
【図 3 E】

**FIG. 3E**

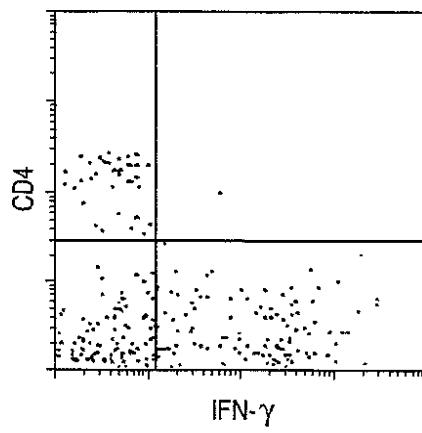
【図 3 F】

**FIG. 3F**

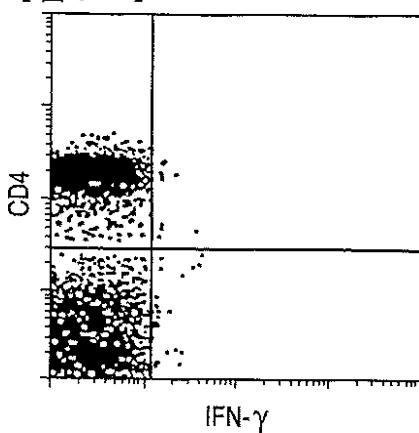
【図 3 G】

**FIG. 3G**

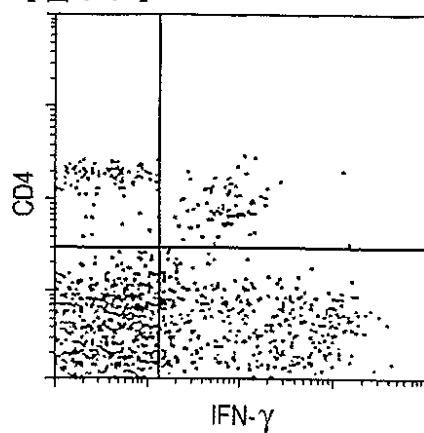
【図 3 H】

**FIG. 3H**

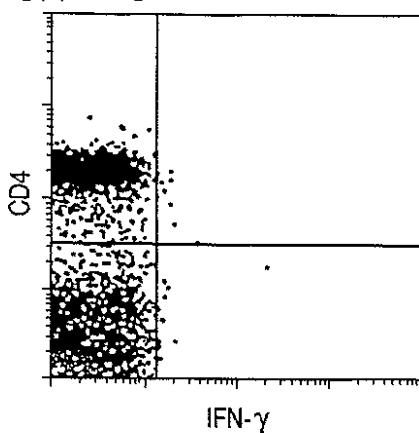
【図3I】

**FIG. 3I**

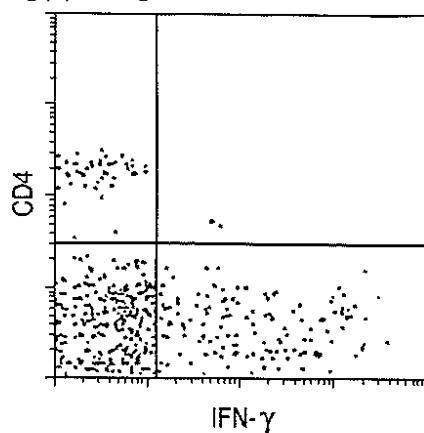
【図3J】

**FIG. 3J**

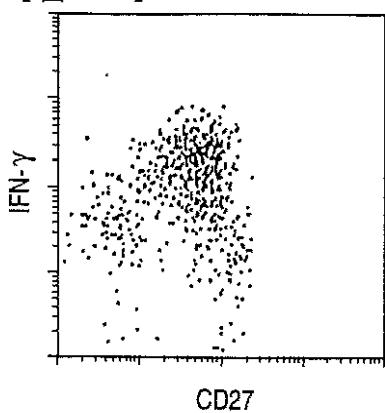
【図3K】

**FIG. 3K**

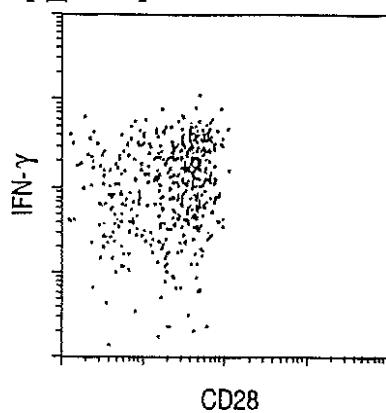
【図3L】

**FIG. 3L**

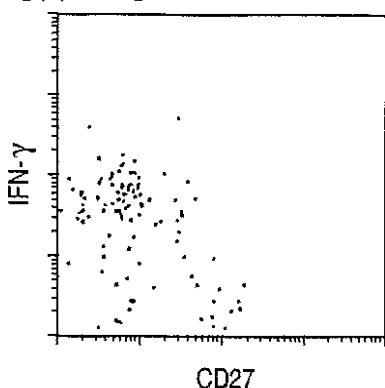
【図 4 A】

**FIG. 4A**

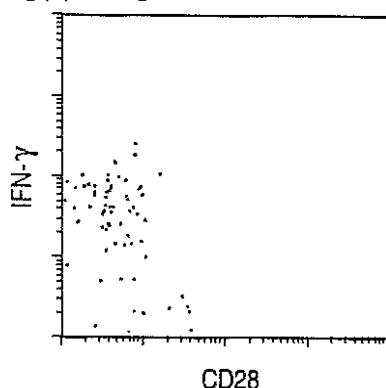
【図 4 B】

**FIG. 4B**

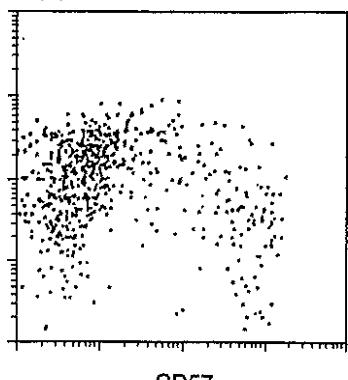
【図 4 C】

**FIG. 4C**

【図 4 D】

**FIG. 4D**

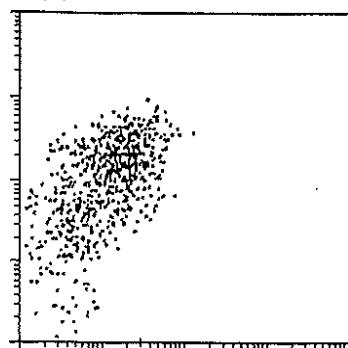
【図 4 E】



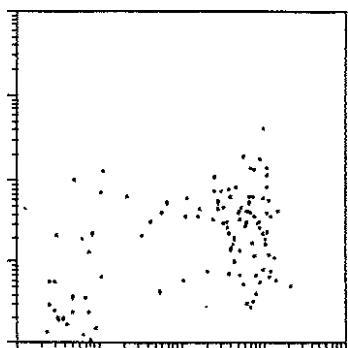
CD57

FIG. 4E

【図 4 F】

 $V\beta 17$ **FIG. 4F**

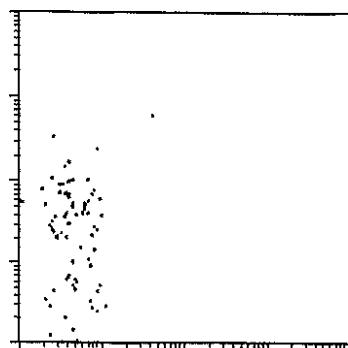
【図 4 G】



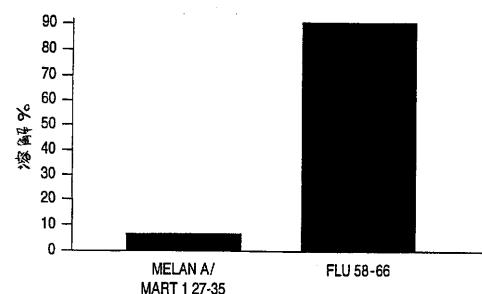
CD57

FIG. 4G

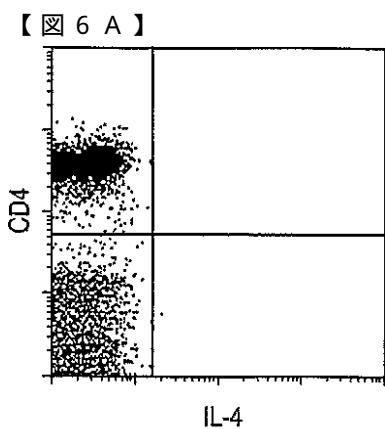
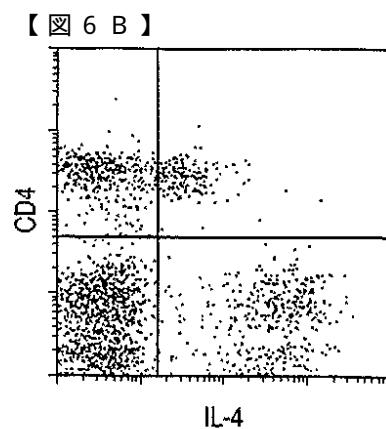
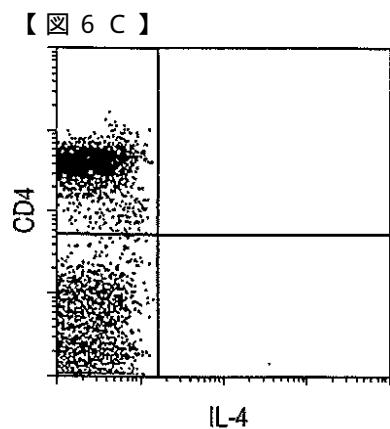
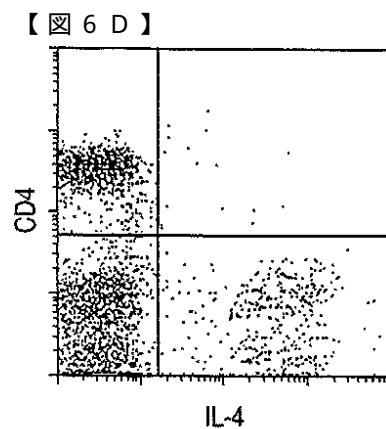
【図 4 H】

 $V\beta 17$ **FIG. 4H**

【図 5】

MELAN A/
MART 1 27-35

FLU 58-66

**FIG. 6A****FIG. 6B****FIG. 6C****FIG. 6D**

フロントページの続き

(72)発明者 ミルテニイ , シュテファン
ドイツ国 ベルギッシュ グラッドバッハ デー - 51429 , フリードリッヒ エバーート シ
ュトラーセ 68

(72)発明者 シュミツツ , ユルゲン
ドイツ国 ベルギッシュ グラッドバッハ デー - 51429 , フリードリッヒ エバーート シ
ュトラーセ 68

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特表平08-504574 (JP, A)

国際公開第97/045735 (WO, A1)

Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cel
l-surface affinity matrix. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.92, pp.1921-1925, 1995 , 19
95年

Fluorescence-activated cytometry cell sorting based on immunological recognition. , Cli
nical Biochemistry, Vol.28, pp.39-40, 1995. , 1995年

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

PubMed