

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年1月12日(2006.1.12)

【公表番号】特表2001-523443(P2001-523443A)

【公表日】平成13年11月27日(2001.11.27)

【出願番号】特願2000-520799(P2000-520799)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/06 (2006.01)

A 6 1 K 35/14 (2006.01)

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 E

A 6 1 K 35/14 Z

A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 43/00

A 6 1 K 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成17年11月4日(2005.11.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

多くの自己免疫疾患において、組織損傷は、元の組織に対する抗体の産生によって引き起こされる。この抗体は自己抗体と言われている。哺乳動物によって産生され、哺乳動物自体の組織に対する結合部位を持つためである。この異常のうちいくつかは、循環する抗体量の特有な漸増と漸減を有し、やがて徴候に変化をもたらす。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

インターロイキン-2(IL-2)は、これまで抗原非特異的T促成遺伝子細胞の産生で重要な役割を果たすと考えられている。マウスに与えられる抗-IL-2抗体(移植片対宿主病の誘導物と一致する)はSLEの特色をもたらす(Via, C.S. et al. (1993), International Immunol. 5:565-572)。IL-2が抑制の産生において直接的または間接的に重要であるかどうか議論されている(Fast, L.D. (1992), J. Immunol. 149:1510-1515; Hirohata, S. et al. (1989), J. Immunol. 142:3104-3112; Baylor, C.E. (1992), Advances Exp. Med. Biol. 319:125-135)。最近、IL-2は、CD4+T細胞中で非分解メカニズムによりHI V複製を促成するCD8+細胞を誘発することがわかった。この効果はサイトカイン仲介であるが、特定のサイトカインは同定されていない(Kinter, A.L. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92:10985-10989; Barker, T.D. et al. (1996), J. Immunol. 156:4478-4483)。IL-2のT細胞産生はSLEで減少する(Horwitz, D.A. et al. (1997), Dubois' Lupus Erythematosus, 5th Ed. (1997), pp. 83-96, D.J. Wallace et al. ed

s., Williams and Wilkins, Baltimore).

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

図4A、4Bおよび4Cによって示されるのは、抗体産生におけるCD8+T細胞の調節効果である。(A)健康人のIgG産生の抑制におけるNK細胞とCD8+細胞の相乗作用。CD4+細胞およびB細胞を抗CD2で刺激し、CD8+細胞およびNK細胞の効果を調べた。NKおよびCD8+細胞の組み合わせは、我々が以前報告した(Gray, J.D. et al., (1998), J Immunol 160: 2248-2254; Gray, J.D. et al., (1994), J Exp Med 180; 1937-1942)抗CD2誘発性IgG産生を顕著に阻害した。(B)NK細胞およびCD8+細胞はSLEにおけるIgG合成を促進する。活動性SLEの患者由来のCD4+細胞および正常人由来の休止B細胞とを、抗CD2で刺激した。SLE CD8+細胞によるIgG産生の促進は、NK細胞の添加により顕著に増加した。(C)SLEにおけるCD8+T細胞機能のサイトカインによる正常化。図4Bに示す研究と平行して、この患者のCD4+T細胞を、CD8+T細胞の存在下または非存在下、抗CD2で刺激した。指示された場合にIL-2(10U/ml)および/またはTGF-(2pg/ml)を加えた。これらサイトカインにより、CD8+細胞の助力効果が喪失し、その細胞がIgG産生の75%を阻害した。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

「患者」とは、処置の対象となる哺乳動物を意味するが、ヒトが好ましい。ある場合において、本発明方法は、実験動物、獣医学分野、疾患モデル動物にも使用され、これらの動物には、限定ではないが、マウスラット、ハムスターなどのゲッシ類および霊長類がある。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

本発明では、患者から血液細胞を取り出す。一般に、標準的な方法で患者から末梢血単核細胞(PBMC)を取り出す。「末梢血単核細胞」すなわち「PBMC」とは、リンパ球(T細胞、B細胞、NK細胞など)および単球を意味する。詳しく下記するように、阻害組成物の主要な作用は、CD8+T細胞がIgG産生を抑制することである。好ましくは、PBMCのみを採取する。赤血球または多形核白血球を患者に残すようにするか、これらを患者にもどす。これは既知の方法、例えば、白血球分析法(leukopheresis)で行う。一般に5から7リットルの白血球分析法の工程がなされる。患者からPBMCを基本的に採取するには、他の血液成分を戻す。細胞サンプルの採取は、ヘパリンなど抗凝固剤の存在下で、既知方法により行われるのが好ましい。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

好ましい態様において、P B M Cを洗い、血清タンパク質および溶性血液成分、例えば自己抗体、阻害剤などを既知方法で取り出す。一般に、生理媒質または緩衝液が加えられて、遠心法が行なわれる。必要に応じて繰り返す。P B M Cを生理培養液、好ましくはA I M - V 血清不含培地 (Technologie) に再懸濁するが (血清がかなりの量の阻害剤を含有するので)、Hanksバランス塩溶液 (H B B S) や生理塩緩衝液 (P B S) も使用される。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

好ましい態様において、P B M Cは1以上の細胞型を富ます。例えば、P B M CはC D 8 + T細胞またはC D 4 + T細胞を富ます。このことは既知である (Gray et al.(1998), J. Immunol. 160:2248, 出典明示により本明細書の一部とする。)。一般に、これは市販の免疫吸収カラムを用いるか、研究的方法で行なわれる (P B M Cをナイロンウールカラムに加え、溶出の非接着細胞をC D 4、C D 1 6、C D 1 1 b、C D 7 4に対する抗体で処理し、免疫磁気ビードで処理して、C D 8 + T細胞に富んだ集団とする)。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

細胞に必要な前処理を一旦ほどこしてから、細胞を阻害組成物で処置する。「処置」とは、細胞を阻害組成物と共に十分な時間でインキュベートし、I gおよび自己抗体産生を阻害する能力が、特に患者にもどしたときに、発生するようにすることを意味する。インキュベーションは一般に生理的温度で行なわれる。上記したように、阻害が起きるのは、処置細胞によるI g産生の直接的抑制の結果か、患者リンパ様臓器におけるI g産生を下方調節する調節細胞の誘導の結果である。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

「阻害組成物」、「I g産生阻害組成物」または「体液性阻害組成物」は、自発的I gおよび自己抗体産生を阻害し得る組成物を意味する。一般に、これらの組成物はサイトカインである。適切な阻害組成物には、限定でないが、I L - 2、T G F - 、C D 2アクチベーター、例えば、抗C D 2抗体およびC D 2リガンド、L F A - 3、およびこれらの混合物や組合せ物がある。好ましい阻害組成物はI L - 2とT G F - の混合物である。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

阻害組成物での処置に加えて、いくつかの態様においては、細胞を活性化するためにマ

イトジェンの使用が望まれる。すなわち、多くの残留相細胞は大量のサイトカイン受容体含有していない。コンカナバリンAなどのマイトジェンを使用すると細胞が刺激されて、サイトカイン受容体が産生し、本発明方法をさらに効果的にする。ConAなどのマイトジェンを用いるとき、既知方法で知られているように、その濃度範囲は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ から約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。さらに、既知方法のように、ConAを離す成分、例えばメチルマンノシドと共に細胞を洗うのが望ましい。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

好ましい態様において、移植前に全または活動性TGF- β の量も検査できる。記載のように、TGF- β は移植後に活性化される潜在的前駆物質としてつくられる。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

処置は必要に応じて繰り返される。例えば、週1回、または一週間に数回、例えば、2週間に3-5回なされる。一般に、自己免疫疾患の症状の改善はなんらかの期間、好ましくは少なくとも数カ月続く。その間に、患者が症状の再発を感じると、その時点で処置が繰り返される。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

我々は、SLEまたはRAの患者由来のPBLにより産生される構成的および刺激TGF- β 1を測定し、正常対照の値と比較した。培養上清中に検出されるサイトカインは、イソ型(アイソフォーム)1、2および3を認識するmAbで中和されたが、イソ型2および3に対するmAbではされず、結果としてTGF- β 1の産生を確認する。正常対照と比較して、活動性TGF- β 1の構成的産生はSLEで有意に減少した(14 ± 4 対 $56 \pm 21 \text{ pg/ml}$ 、 $p = 0.02$ 、図5)。抗CD2刺激活性TGF- β 1も減少した(87 ± 22 対 $399 \pm 103 \text{ pg/ml}$ 、 $p = 0.003$)。RAにおいて、構成的TGF- β 1の平均値は、SLE($19 \pm 5 \text{ pg/mg}$)と同様であり、抗CD2により刺激された後は正常とSLEの中間値であった($197 \pm 54 \text{ pg/ml}$)。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

先に、我々は、NK細胞がTGF- β の主なリンパ球源であり、このサイトカインを活性形に構成的に産生する唯一のリンパ球集団であることを証明した(Gray, J. D. et al., (1988), J. Immunol. 169:2248-2254)。従って、NK細胞由来TGF- β の構成的産生はSLEで減少しているとの発見は、興味深かった。我々はまたIL-2およびTNF- α の両方が活動性TGF- β の産生を促進できることを知った。これらのサイトカインの

両方の産生は、SLEで減少する(Gray J. D. et al., (1994), J Exp Med 180:1937-1942)。しかし、殆どの患者において、外来性IL-2およびTNF- α はTGF- β の産生を正常まで回復できなかった(実施例2)。IL-10産生はSLEで増加し(Llorente, L. et al. (1993), Eur Cytokine Network 4:421)、増加したレベルと疾病活動性の相関関係は報告されている(Houssiau, F. A. et al. (1995), Lupus 4:393-395; Haglwar, E. et al. (1996), Arthritis Rheum 39:379)。IL-10はIL-2、TNF- α およびTNF- β 産生を阻害できる(実施例2およびMoore, K. W. et al. (1993), Ann Rev Immunol 11:165-190)。活動性TGF- β の産生が軽いおよび活動性の疾病の患者で減少し、IL-10の拮抗によってのみ産生欠失を部分的に回復できたということは(実施例2)、増加したIL-10産生が、それ自体、SLEでの活動性TGF- β 1の減少したリンパ球産生の説明となり得ないことを示す。いくつかの機構が恐らく関与する。成熟体の活性化形態への潜伏性前駆体の細胞外変換における1つまたはそれ以上の欠失が、この異常性を説明し得る。