

(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2004-529083

(P2004-529083A)

(43) 公表日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	Z
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	Z N A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	Y

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2002-557416 (P2002-557416)	(71) 出願人	503259510 アンスティテュ・ネケール フランス、エフ-75730 パリ、セデ ックス・15、リュ・ドゥ・ボジラル、 156
(86) (22) 出願日	平成14年1月22日 (2002.1.22)	(74) 代理人	100064746 弁理士 深見 久郎
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月18日 (2003.7.18)	(74) 代理人	100085132 弁理士 森田 俊雄
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/000240	(74) 代理人	100083703 弁理士 仲村 義平
(87) 国際公開番号	W02002/056909	(74) 代理人	100096781 弁理士 堀井 豊
(87) 国際公開日	平成14年7月25日 (2002.7.25)	(74) 代理人	100098316 弁理士 野田 久登
(31) 優先権主張番号	01/00834		
(32) 優先日	平成13年1月22日 (2001.1.22)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多糖細菌抗原およびウイルスカプシドのタンパク質構造への免疫応答を誘導する手段

## (57) 【要約】

本発明は、B M<sup>+</sup> D<sup>+</sup> C D 2 7<sup>+</sup> 細胞のサブ集団を特異的に刺激して、前記細胞からのT細胞非依存性抗菌応答をもたらすようにするための、医薬的に許容しうるキャリアー中の免疫原組成物に関する。多糖細菌（連鎖球菌、髄膜炎菌、肺炎双球菌、またはインフルエンザ菌）によって、またはタンパク質カプシドウイルス（ポリオウイルス、脳心筋炎ウイルス、インフルエンザウイルス）によって感染した、または感染しやすい患者における、T細胞非依存性抗菌免疫応答の生成のための使用にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

多糖抗原および/またはウイルスカプシドのタンパク質構造への免疫応答を得るのに適した免疫原組成物において、 $M^+ D^+ 27^+$  サブ集団の B 細胞（これには、胚中心中になく B 細胞のこのようなサブ集団の細胞も含まれる）に対して特異的な表面の少なくとも 1 つのマーカの治療的有効量を、医薬的に許容しうるキャリアー中に含むことを特徴とする組成物。

## 【請求項 2】

このキャリアーが、塩溶液、リンゲル液、リン酸塩緩衝塩溶液から成る群から選ばれる、請求項 1 に記載の免疫原組成物。

10

## 【請求項 3】

そのほかにアジュバントも含んでいる、請求項 1 または 2 に記載の免疫原組成物。

## 【請求項 4】

免疫原性共役体を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか 1 つに記載の免疫原組成物。

## 【請求項 5】

$M^+ D^+ 27^+$  サブ集団の B 細胞の受容体に対して特異的な表面のマーカ、特に CD 21、DC 27 に会合した Ig D、および CD 1c から選ばれるマーカを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の免疫原組成物。

## 【請求項 6】

T 細胞非依存性免疫応答を得るのに適した量の、請求項 1 ~ 5 のうちのいずれか 1 つに記載の免疫原組成物を含む、T 細胞非依存性抗菌感染に対する保護を得るためのワクチン。

20

## 【請求項 7】

前記免疫原組成物が共役体を含んでいる、請求項 6 に記載のワクチン。

## 【請求項 8】

T 細胞非依存性免疫応答を得るのに適した作用物質が、リポソームに共有結合によって固定されている、請求項 6 に記載のワクチン。

## 【請求項 9】

細菌多糖抗原およびウイルスカプシドのタンパク質構造への免疫応答を、ヒトを含む恒温動物にもたらすための薬剤の調製のための、請求項 1 ~ 5 のうちのいずれか 1 つに記載の免疫原組成物の使用。

30

## 【請求項 10】

前記免疫原組成物が、体重 1 kg あたり約 0.01  $\mu$ g ~ 約 10  $\mu$ g の免疫原剤の用量で個人に投与される、請求項 9 に記載の使用。

## 【請求項 11】

細菌多糖抗原およびウイルスカプシドのタンパク質構造への免疫応答を、ヒトを含む恒温動物にもたらすための薬剤の調製のための、請求項 6 ~ 8 のうちのいずれか 1 つに記載のワクチンの使用。

## 【請求項 12】

連鎖球菌、肺炎双球菌、髄膜炎菌、またはインフルエンザ菌による感染に対する保護のための薬剤の調製のための、請求項 6 ~ 8 のうちのいずれか 1 つに記載のワクチンの使用。

40

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 のうちのいずれか 1 つに記載の免疫原組成物と、医薬的に許容しうるキャリアーとを含む医薬組成物。

## 【請求項 14】

ワクチン接種を必要とする状態、あるいは多糖抗原による感染状態に対するワクチン接種の有効性のインビトロ診断方法において、 $M^+ D^+ 27^+$  サブ集団の B 細胞の採血における検出および/または定量化を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 15】

有利には突然変異率のレベルにおいても、該クローン性増殖のレベルにおいても、前記免

50

疫応答に特異的に関わるVH遺伝子の分析を含むことを特徴とする、請求項14に記載のインビトロ診断方法。

【請求項16】

免疫不全患者の採血に対して実施し、このテストの結果と、同じ多糖抗原への自然の免疫応答を示す被験者の採血の結果とを比較することを特徴とする、請求項14または15に記載のインビトロ診断方法。

【請求項17】

約10mlの採血を用いることを特徴とする、請求項16に記載のインビトロ診断方法。

【請求項18】

B<sup>+</sup>M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>細胞の作用の特異的阻害によって、被験者における自己免疫応答に対して阻害作用を有する薬剤の調製のための、請求項1～5のうちのいずれか1つに記載の免疫原組成物の使用。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、感染性作用物質に対する、ヒトを含む恒温動物の免疫化の分野に関する。より詳しくは本発明は、多糖ユニットを有するカプセル化された細菌によって、および/またはウイルスカプシドのタンパク質構造によって引き起こされた感染および疾患に対する免疫応答の開始および/または強化のための手段に関する。 20

【背景技術】

【0002】

本発明の技術的背景

多糖抗原への免疫応答は、人生の最初の数年の間に徐々に成長し(Hidalgo, Hら、「再発性感染を有する子供における、前および後免疫化抗体滴定(Pre and post-immunization antibody titers in children with recurrent infections)」、Ann. All. Asthma. Immunol., 1996年、第76巻:341~346頁)、主としてIgG2に関わっている。2歳未満の子供および老人は、多糖ユニットを有するカプセル化された細菌に対して防御することはできないが、一方で、これらの人々は、T細胞依存性(タンパク質)抗原に応答しうる。臨床的結果をもたらすこの現象は、今日まで完全に解明されているわけではない。 30

【0003】

ところで、肺炎双球菌、髄膜炎菌、インフルエンザ菌、および連鎖球菌は、菌株によって様々なユニットを含む多糖カプセルを有する胚である。したがって例えば、肺炎双球菌の様々な84の血清型が同定された。ところでこの胚は、肺疾患、髄膜炎、副鼻腔炎、および細菌性耳炎の主要原因である。これらの疾患のうち、肺炎双球菌の肺炎では、フランスにおいて毎年約5,000人が死亡し、そのうちの90%が65歳以上の患者であり、5歳未満の子供の場合、世界中で毎年百万人が死亡する(Lancet、社説、1999年、第354巻、2011頁; Shann, F、「肺炎双球菌ワクチン:もう1度制御試験をすべき時だ(Pneumococcal vaccine: time for another controlled trial)」、Lancet、1998年、第351巻:1600~1601頁; Siber, G.R.、「肺炎双球菌病:新世代ワクチンへの展望(Pneumococcal disease: Prospects for a new generation of vaccines)」、Science、1994年、第265巻:1385~1387頁)。 40

【0004】

以前は例外的であった、肺炎双球菌の抗生物質への耐性は、その後ますます頻繁に発生し、最も利用されている抗生物質であるペニシリンおよびマクロライドの菌株の20~35%に達する。このことは、抗肺炎双球菌およびまた抗髄膜炎菌のワクチン接種の問題を、 50

最も重要なものになっている。

【0005】

最初のワクチンは、ウイルスのカプセルの多糖抗原に対して向けられたが、これらは、T細胞非依存性B応答を刺激した。血清型の90%をカバーすることを目指した14価、ついで23価のこれらのワクチンは、20年前は有効であるとして提供されていた。ところで今や(上記Shann、1998年)、これらは敗血症型に対して一部しか保護しないこと、およびこれらは、とびぬけて最も頻繁に起こる非敗血症型においても有効性を示さないことさえ知られており、これらは特に2歳未満または50歳以上の患者の場合不活性であることが分かったこと(Ortqvist, Aら、「中年および老年の人々の肺炎の予防における23価の肺炎双球菌カプセル多糖ワクチンのランダム試験(Randomised trial of 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in prevention of pneumonia in middle-aged and elderly people)」、Lancet、1998年、第352巻:399~403頁)、および最良の場合でも、作用時間がわずかであることが知られている。その結果、薬効がなく、有効期間が非常に限定され、2歳未満または約50歳以上の患者の場合、ウイルスのカプセルの多糖抗原に対して向けられた従来のワクチンの場合は、多数回の再ワクチン接種が必要になる。

10

【0006】

これらの理由すべてによって、世界中のワクチン行政は混乱したままである。イタリア、スペイン、およびベルギーの衛生当局は、体系的なワクチン接種プログラムを開発したが、ドイツ、オランダ、およびフランスの衛生当局は、フランスがワクチンのヨーロッパでの主要生産者であるにもかかわらず、このことについてほとんど完全に無関心である(上記Lancet、社説、1999年)。

20

【0007】

しかしながら、若い患者および老年患者における、特に肺炎双球菌および髄膜炎菌の感染の予防および治療に対するほぼ失敗したこの状況は、公衆衛生の主要な問題になっている。

【0008】

したがっていくつかの戦略が可能であるように思われる(上記Siber、1994年)

30

【0009】

・ 明らかに確立された有効性を有する抗ヘモフィルスBワクチンのモデルに対する共役ワクチンは、それぞれ抗原タンパク質と組合わされた最も頻繁に起こる7または9血清型に関しており、したがって、T細胞非依存性Bリンパ球を刺激して、はるかに強力な免疫応答を得ることができる。しかしながらこれらは、生産技術および生産費用のかなり大きい問題を提起する。その理由は、各多糖抗原が、適切な濃度で抗原タンパク質と選択的に組合わされなければならない、その結果、このように構成されたワクチンは現実には、複数の、実際には7つの異なるワクチンの混合物であり、このことは、技術的に実施が非常に難しいからである。さらにはこのようなワクチンを用いた場合、ほかの問題も浮上する。したがって、必然的に高いタンパク質抗原の用量が、過酷な反応を誘導しうる。さらには、様々なサブワクチン間の抗原競合の問題にも直面する。しかしながらまた特に、主要な問題は、抗原タンパク質、ジフテリアまたはテタニー毒素、または髄膜炎菌の外部包膜のタンパク質の選択の難しさという問題である(上記Siber、1994年;上記Shann、1998年)。

40

【0010】

・ これに代わる解決法は、多糖抗原を目指すことをあきらめ、肺炎双球菌酵素またはタンパク質、ニューモリシン、ニューラミニダーゼ、オートリシン、ヒアルロニダーゼ、A表面のタンパク質、A表面の付着因子などを用いることから成る。ところで現在まで、これらの選択に基づく免疫化試験はどれも、その有効性の実験的証明が行なわれていない(

50

上記 Siber、1994年；上記 Shann、1998年）。

【0011】

・ 考察された3つ目の解決法は、従来のワクチンとともに、Bポリクローナル活性化をもたらす抗-CD40抗体を注射することであろう（上記 Shann、1998年）。

【0012】

しかしながらこれらのどれも、上に挙げられた衛生上の問題へ十分に満足すべき回答を示していない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0013】

今や意外にも、次のようにして、多糖抗原およびウイルスカプシドのタンパク質構造への免疫応答を誘導するか、および/または刺激するか、あるいはまたこれを負の調節に付することができることが発見された。すなわち、B細胞のサブ集団、すなわちB<sup>M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup></sup>細胞（これには、胚中心中にないB細胞のこのようなサブ集団の細胞も含まれる）を、刺激するか、またはそれぞれ特異的に阻害し、有利には標的を定めて、これがT細胞非依存性抗菌応答をもたらすようにすることによってである。

【0014】

したがって、固有の免疫応答を欠いているか、または該免疫応答が不十分である（これは2歳未満の子供、ならびに65歳以上の老人の場合である）患者においてこのような免疫応答を開始させるか、および/または強化するための手段、ならびに自然の免疫応答の作用下でも、本発明にしたがって、すなわち細菌多糖抗原およびウイルスカプシドのタンパク質構造に対しての、免疫応答の誘導および/または刺激の作用下でも、適切な免疫応答が行なわれているかどうかをテストする手段が作製された。

20

【0015】

本発明は、新規免疫原およびワクチンの概念、これに関するワクチン、ならびに本発明によるワクチン接種を必要とする状態、あるいはこれに付された患者における本発明のワクチン接種の有効性の診断のためのテストプロトコルを目的とする。本発明はまた、自己免疫応答の阻害手段の調製への、特別な前記免疫原の概念の適用も目的とする。

【課題を解決するための手段】

30

【0016】

発明の概要

したがって、多糖ユニットを有するカプセル化細菌によって、および/またはウイルスカプシドのタンパク質構造によって起こされた感染および疾患に対する、ヒトを含む恒温動物の免疫化のための本発明による手段は、一方で、独創的なワクチン手段、他方で、本発明によるワクチン接種を必要とする状態の評価のため、および/または本発明によるワクチン接種の、ある一定の被験者に対して実施された採血への有効性の評価のための診断手段を含んでいる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

40

発明の詳細な説明

本発明は、添付図面を参照して、次にさらに詳細に例証される。

【0018】

本発明の基本となる理論的原理は、従来のT-B相互作用の不存在下に規定されたBサブ集団のIgの遺伝子の突然変異である。

【0019】

Bリンパ球集団は、ヒトの場合、次の4つのサブ集団を含む（Klein, Uら、1998年、J. Exp. Med. 第188巻；1679～1689頁）：

・ 第一のサブ集団はナチュラル（naïf）細胞から成り、これらは常にCD27<sup>-</sup>およびIgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>（M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>-</sup>）であり、これらは骨髄に由来し、Bリンパ球の

50

約60%を占める。これらは、 $CD5^+$  (約15%について) または  $CD5^-$  (約45%について) であってもよい。

【0020】

・ その他の3つのものは、記憶細胞から成る。これらは残りの40%を占め、すべて  $CD27^+$  であり、約15%の細胞がアイソタイプ交換 ( $M^-D^-27^+$ ) を行っており、約25%がこれを行っていない (約15%については  $M^+D^+27^+$ 、約10%については  $M^+D^-27^+$ )。

【0021】

したがってBリンパ細胞の約40%を占めるこの記憶区画が、マウスの場合数パーセントにすぎないことに注目することは興味深い。マウスとは逆に、ヒトは、その胚中心において、すべてのB  $M^+27^+$  細胞、 $D^+$  も  $D^-$  も変異しうる。

10

【0022】

一方で、 $CD40$  リガンド (L) が、T細胞依存性応答におけるT-B相互作用の鍵分子であることは知られている。X染色体上に位置する  $CD40L$  上の断節性突然変異を伴なう、高IgM症候群に冒されたヒト男性患者およびこの遺伝子に対してノックアウトされたマウスは、胚中心を形成せず、T-B相互作用がないので、重鎖のアイソタイプを交換せず、免疫グロブリンのこれらの遺伝子を変異せず、循環IgGをほとんど有していない。

【0023】

他方で、本発明の発明者らは、高IgM症候群に冒されたこのようなヒト男性患者の  $M^+D^+27^+$  集団を既知の技術によって単離し、これらの体細胞突然変異の頻度は、そこでは患者によって多少なりとも正常であったことを証明した。非常に驚くべきこれらの結果に直面して、本発明者らは、正常な成人において変異された細胞の約40%を占めるこの  $M^+D^+27^+$  集団が、成長し、胚中心の不存在にもかかわらず多様化するという仮説をうち出した。

20

【0024】

さらにもう一方で、本発明の発明者らはまた、 $M^+D^+27^+$  細胞は、ヒトの場合、誕生の時には臍帯のB細胞の約1%を占め、約300bpの1配列あたり約0.5の突然変異率を示すことがあり (可変)、一方成年被験者の場合、これらはその免疫グロブリン遺伝子を多様化し、B細胞区画の約5~25%を占め、1配列あたり5~10突然変異 (可変)

30

【0025】

したがって本発明によれば、この集団の成長は、T細胞非依存性抗原への応答の出現と平行していることが確立された。これから次のような仮説が生じる。すなわち、これらの細胞は、多糖カプセルを有する細菌、連鎖球菌、肺炎双球菌、髄膜炎菌、またはインフルエンザ菌、およびCMHの分子によって示すことができない糖残基を有する多糖カプセル化細菌への免疫応答の原因でありうるという仮説、およびこれらはまた、本質的にT細胞非依存性応答を開始させる反復カプシド構造を有するウイルス、例えばポリオウイルス、インフルエンザウイルス、脳心筋炎ウイルス、およびその他のウイルスへの応答の基礎でもありうるという仮説である (Bachmann, M. F. ら、「ウイルス構造の、抗体応答およびウイルス血清型形成への影響 (The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation)」、Immunol. Today、1996年、第17巻 (12) : 553~558頁)。

40

【0026】

実際に、本発明者らは、高い率の突然変異を伴って、B  $M^+D^+27^+$  細胞集団の強い膨張を示す患者の人々が、様々な種類の肺感染症、またはIgG置換された免疫不全症患者において一般に見られるORL感染症に対して、ほかの人々よりもさらに良く保護されることを発見した。

【0027】

50

最後に、抗細菌多糖ワクチンへの応答が、脾臓摘出された患者において現れないかぎり (Molrine, D.ら、「無脾症患者における多糖ワクチンへの正常なIgGおよび損傷IgM応答 (Normal IgG and impaired IgM responses to polysaccharide vaccines in asplenic patients)」、J. Inf. Dis., 1999年、第179巻: 513~517頁)、脾臓、特にその辺縁ゾーンは、これらのM<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>細胞が生産または貯蔵される場所になりうると認めることができる。

#### 【0028】

なんらかの理論によって縛られたいわけではないが、該被験者が生涯に会う様々な種類の外的攻撃に対応する2つの区画において、ヒトを含む恒温動物のB細胞の成長モデルが、納得しうるものであると考えられる。したがってとりわけヒトは、次の2つのB細胞系を成長させたのであろう。1つは、胸腺依存性ペプチド抗原への強い親和性を伴って応答するために、胚中心において多様化するものであり、もう1つは、腸と組み合わせられたリンパ組織 (通常GALTと呼ばれている) のものと類似しており、多くの種 (特にウサギ、ヒツジ、ウシ) における個体発生の中に成長し、胚中心とは独立して多様化可能であり、このような細胞が活性である被験者に、T細胞非依存性抗原に対する保護を確保しうるものである。

10

#### 【0029】

これを行なうために、本発明の実施によって得られた結果を考慮に入れた。これらの結果によれば、高いM<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>細胞率を有し、かつ多様化Ig受容体を有する高IgM患者は、非高IgMであるにもかかわらずIgG置換を規則的に受けているその他の患者よりも、感染に対してよりよく抵抗する。

20

#### 【実施例1】

#### 【0030】

下記の関連実験は、本発明のいくつかの側面を例証するために用いられているものであり、本発明を限定するものと考えべきではない。

B I g M<sup>+</sup> I g D<sup>+</sup> C D 2 7<sup>+</sup> 細胞フラックスの分離およびの血球計算

ミニマクス (MiniMACS) (ミルテニー・ピオテック (Miltenyi Biotech)) 装置を用いて、および次の反応体: 1) 抗ヒト-FITC (カルタグ (Caltag)) I g D およびピオチニル化抗ヒト-C D 2 7 (アンセル (Ansell)) プラスストレプトアビジン-トリカラー (Streptavidine-TriColor) (カルタグ); および2) 抗I g D - F I T C、抗ヒト-P E C D 2 7 (コールター-イムノテック (Coulter-Immunotech)) のうちの1つを用いて、これらの細胞の磁気分離によって95~98%でB細胞リッチにされた、フィコール-イソパック (Ficol1-isopaque) で精製された細胞の懸濁液に対する2色染色によって、B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>細胞の選別が実施された。本発明者ら自身の観察によれば、低いパーセンテージで存在するC D 2 7<sup>+</sup>集団の染色が、時にはC D 2 7 - トリカラーを用いて人工的に強化されていることから考えて、X H I M患者の細胞の選別に対しては、この後者の組み合わせが好ましいであろう。

30

#### 【0031】

B記憶I g D<sup>-</sup> C D 2 7<sup>+</sup>細胞の不存在は、抗C D 1 9 - P C 5 (コールター-イムノテック)、抗I g D - F I T C、および抗C D 2 7 - P Eを用いる染色によって、フィコールで精製されたP B M Cに対して追跡された。3色分析が、C D 1 9 - P C 5にポジティブなB細胞に対して実施された。もう1つの特徴決定は、抗I g D - F I T C、抗ヒト-P E I g M (カルタグ)、およびピオチニル化抗C D 2 7で染色された、C D 1 9リッチにされたB細胞に対して実施され、ついでストレプトアビジン-トリカラーが行なわれた。3色分析は、パリヤーC D 2 7 - トリカラーに対してポジティブな細胞に対して実施された。細胞I g D<sup>+</sup> C D 2 7<sup>+</sup>がI g Mとともに実験されていることから考えて (データは示されていない)、この集団は、I g M<sup>+</sup> I g D<sup>+</sup> C D 2 7<sup>+</sup> (または省略形M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>) と名付けられる。

40

50

## 再配列 V H 3 - 2 3 遺伝子セグメントの配列の分析

ゲノム DNA から、K プロテイナーゼによる消化によって選別された B  $D^+ 27^+$  細胞が抽出された。再配列 V H 3 - 2 3 遺伝子セグメントは、約 3,000 細胞から、P f u ターボ (T u r b o) (スタタジーン (S t a t a g e n e)) ポリメラーゼによって、半ネスト (s e m i - n e s t e d) A C P 戦略にしたがって増幅された。1 回目の増幅のために、V H 3 - 2 3 の頭部プライマー (5' - G G C T G A G C T G G C T T T T C T T G T G G - 3') および 3' J H プライマー混合物 (3:1 の比における 5' - T G A G G A G A C G G T G A C C A G G G - 3' および 5' - T G A G G A G A C G G T G A C C G T G G - 3') が用いられた (95 で 45 秒、64 で 60 秒、72 で 90 秒、25 サイクルで)。2 回目の増幅は、同じ 3' J H プライマー混合物および V H 3 - 2 3 イントロンプライマー (5' - G T G G A A T G G A T A A G A G T G A - 3') を用いて、第一反応混合物の 1/10 に対して実施された (95 で 45 秒、55 で 60 秒、72 で 90 秒、25 サイクルで)。基本的な A C P の誤差の値は、臍帯血に由来する B  $D^+ 27^-$  細胞に対して、同じ実験条件において、同じ試料サイズ (すなわち 3,000 細胞) を用いて測定された。ゲル上で精製された A C P 生成物は、A C P 生成物のクローンキットゼロプラントトポ P C R (Z e r o b l u n t T O P O P C R) (インビトロジェン (I n v i t r o g e n)) を用いてクローンされた。V H 3 - 2 3 に対して陽性なコロニーの配列は、サイクル配列決定キットビッグダイ (B i g D y e) (パーキン - エルマー (P e r k i n - E l m e r)) を用いて得られ、遺伝子分析器 A B I 3 10 を用いて分析された。得られた配列は、288 塩基対 (b p) (G l u 1 ~ C y s 9 2) 上の胚系統の遺伝子 V H 3 - 2 3 と比較された。

## 【0032】

これらの材料および方法を用いて、B  $M^+ D^+ 27^+$  細胞のゲノム DNA から増幅された、再配列 V H 3 - 2 3 配列上の体細胞突然変異を分析した。患者 (Z . A .) は、M  $D^+ 27^-$  集団に対して同じ条件下において測定された、ベースに近い突然変異レベルを示した。この患者は、今回の血液サンプリングの3年前に骨髄移植を受け、拒絶反応を示したことから考えて、特別な医療的過去を有している。その他の患者はすべて、年齢にかかわらず、下記のような一人を除いて、対照幼児において観察されたものと同様な突然変異レベルを示した (総配列について 0.5 ~ 1.7%、変異配列について 0.9 ~ 1.9%、V 配列 1 つあたり 0 ~ 15 の突然変異を伴う)。すなわちこの人は、その若い年齢から考えて (C . Q . 5 歳) かなり驚くべきことに、対照成人のものに近い突然変異の頻度を示した (総配列について 2.2%、変異配列について 3.27%、V 配列 1 つあたり 0 ~ 18 の突然変異を伴う) (表 1 および図 1 参照)。配列全体の分析は、グループ分けおよび集合を伴う突然変異の正常な分布、および C D R における置換の突然変異への選択を明らかにした。すべての患者において、配列の大部分は、様々な V H - D - J H 結合を示した。このことは、特異的 V H 3 - 2 3 クローン性増殖の不存在を示した。

## 【0033】

## 【表 1】

表1. XHIM患者の末梢血 IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> のB細胞中の再配列VH3-2 3 遺伝子における体細胞突然変異

	ドナー	年齢 (歳)	B D <sup>+</sup> M <sup>+</sup> 27 <sup>+</sup> 細胞 の%	配列数		突然変異			
				全体	変異されたもの	範囲	数	頻度/総配列 (%)	頻度/変異配列 (%)
XHIM 患者	C.O.	5	1	28	19 (67%)	0-18	179	2.2	3.27
	C.R.	7	1.5	18	16 (89%)	0-19	90	1.7	1.9
	L.P.	7	2	19	13 (68%)	0-12	61	1.1	1.62
	A.N.	7	2	18	9 (50%)	0-7	27	0.52	↑
	L.Ch.	8	1	27	16 (60%)	0-10	41	0.52	0.89
	Z.A.	15	2	24	12 (50%)	0-1	12	0.17	0.34
	B.M.	16	4	23	10 (43%)	0-15	40	0.8	1.38
	F.F.	21	60	20	19 (95%)	0-9	75	1.3	1.37
	D1	4	7	15	8 (54%)	0-14	45	1	1.95
	D2	5	7	19	17 (89%)	0-13	78	1.5	1.7
健康な 対照	D3	16	7	14	13 (93%)	0-19	190	3.22	3.47
	D4	成人	10	23	19 (83%)	0-22	182	2.75	3.34
	C1		1	17	11 (64%)	0-2	12	0.24	0.37
臍帯血	C2		1	25	5 (20%)	0-2	6	0.08	0.4
	C3		1	16	4 (25%)	0-1	4	0.08	0.34
	(B D <sup>+</sup> 27細胞)			44	12 (27%)	0-2	14	0.1	

10

20

30

40

50

【0034】

M<sup>+</sup> D<sup>+</sup> 27<sup>+</sup> 集団において得られた、変異されていない配列の様々な割合(5~60%)は、これが低い頻度で存在する時に選別された集団の様々な純度に対応しうるであろう。この集団は、M<sup>+</sup> D<sup>+</sup> 27<sup>+</sup> 細胞が多数存在する時にかなり減少した(例えば60%のB M<sup>+</sup> D<sup>+</sup> 27<sup>+</sup> 細胞を有する患者F.F.は、95%の変異V配列を有していた。表

1 参照)。対照臍帯血の3つの試料によれば、 $M^+ D^+ 27^+$  集団における突然変異の頻度は、2つのケースにおいてベースに近く、1つのケースではわずかに上回った(ベースレベルの2倍)。

【0035】

したがって  $M^+ D^+ 27^+$  細胞のこの特別な集団は、これに固有の分化経路を有することが証明された。この集団は、独特でかつこれ自体が特異的に用いられうるあるいくつかの受容体を有する。当業者は、本明細書に含まれている教示および当業者の固有の知識に基づいて、必要に応じて反復試験を実施して、B細胞のこのサブ集団に固有の表面のマーカ―を選択することができる。本発明の手段によるこれの動態化および/または刺激によって、該患者に有益な治療をもたらすことができる。

10

【0036】

非限定的な例として、このようなマーカ―は、CD21、およびCD27に会合したIgDであってもよい。同様に、もう1つのマーカ―、すなわちこれらの細胞上に強力に発現されたCD1cは、ワクチン刺激に役立つことも発見された。

【0037】

この集団が独立してそのIgの遺伝子を変異するという決定的な観察事項から考えて、本発明による免疫化技術において用られるワクチン接種手段は、該クローンの特異的増殖を誘導し、このようにして突然変異率を増すことによって、生成された抗体をかなり改良することができる。

【0038】

本発明によるワクチンは、共役体を含む免疫原組成物を含んでいてもよい。前記ワクチンの1つの実施態様によれば、T細胞非依存性免疫応答をもたらしうる作用物質は、リポソームに共有結合によって固定されうる。

20

【0039】

このようにして用いられる免疫原組成物は、医薬組成物中において、医薬的に許容しうるキャリアーと組合わされてもよい。

【0040】

他方、本発明に基づいた診断手段によって、血中に存在する特別なB細胞のこの集団の同定および/または定量化が可能になり、ワクチン接種の有効性をテスト/診断することが可能になる。実際には、これを行なうために、突然変異率のレベルでも、該クローン性増殖のレベルでも、これらの応答に特異的に関わるVH遺伝子の分析を実施する。

30

【0041】

このような診断の実施のために、白血球が抽出された非凝固血約10mlの採取に対して操作を行なうことができ、一方、殺菌試験または検査は、当業者に知られている方法にしたがって実施される。

【0042】

さらにはここで考察されている抗菌および/または抗ウイルス応答において特異的なB細胞のこの集団の役割から考えて、B細胞のこの集団の異常な増殖が、あるいくつかの自己免疫の出現において観察される。さらにこの場合、血液細胞のこの集団の定量化によって、これらの異常な集団の存在および/または重要性を非常に簡単に診断することができる。

40

【0043】

今度は、ワクチン接種の枠内で考察されているB細胞のこのサブ集団の増殖を誘導する代わりに、この集団に対して特異的な阻害分子を用いて、これらの病理学におけるこれらの細胞の増殖を阻害することも同様に可能である。当業者は、その選択を行なうために、 $M^+ D^+ 27^+$  細胞のサブ集団のこのような特異的阻害分子を追求し、テストすることができる。この点に関して、さらに、ある割合のBリンパ腫が、これらの自己免疫症候群の間に出現し、これらのリンパ腫の表現型は、多くの場合  $M^+ D^+ 27^+$  細胞の表現型に対応することが分かったということにも注目しなければならない。したがって本発明はまた、過形成期間中、あるいは腫瘍期間中にこれらの細胞の成長を調節するための手段

50

も目的とする。これらの手段は、 $B\ M^+ D^+ 27^+$ 細胞のサブ集団の特異的阻害剤に基づく。

【0044】

本発明はしたがってまた、細菌多糖抗原およびウイルスカプシドのタンパク質構造への自己免疫応答を阻害するか、または負の調節をするための組成物であって、 $B\ M^+ D^+ 27^+$ 細胞のサブ集団に特異的な有効量の阻害分子を含む組成物も目的とする。

【0045】

刺激または動態化のためにも、前記特異的B細胞の本発明による阻害のためにも、例えば前記 $M^+ D^+ 27^+$ 集団を特異的に刺激することができる分子とともに、髄膜炎菌、肺炎双球菌等の細菌多糖の皮内注射を実施することができる。

10

【0046】

実際に、専ら例としてのみであるが、治療される個人の体重1kgあたり約0.01 $\mu$ g～約10 $\mu$ gの免疫原組成物の用量が適切である。

【0047】

この免疫原組成物のキャリアーは、なんであっててもよく、特に塩溶液、リンゲル液、またはリン酸塩緩衝塩溶液であっててもよい。実際、この免疫原組成物は、有利にはアジュバントを含んでいる。

【0048】

前記免疫原組成物は、免疫原共役体を含んでいてもよく、これは、例えば体重1kgあたり約0.01 $\mu$ g～約10 $\mu$ gの免疫原剤の用量で個人に投与されてもよい。

20

【0049】

2～60歳のヒトの患者の場合でさえ、本発明にしたがって作製された注射可能な組成物によって、用いられる特異的受容体に応じて、刺激または動態化、あるいは治療される患者において免疫応答を誘導する $B\ M^+ D^+ 27^+$ 細胞の阻害を有効に強化することができる。

【産業上の利用可能性】

【0050】

本発明による概念の独創性は、上記の抗菌および一部抗ウイルス応答の原因であるB細胞が実際、非常に多様化された受容体とともに、最も若い年齢（幼児の場合、1歳前）から既に存在しており、これらの集団の特異的マーカーによって、これらを刺激することができ、したがって組合わされていない多糖抗原を用いて非常に幼い子供を保護することができることから成っている。これは、今まで無かったことである。

30

【0051】

さらには、本発明によるこれらの生成物および手段に特有の毒性を疑う理由はない。結論として、本発明によって、ヒトを含む恒温動物、特に2歳未満の幼児、および65歳以上の老人において、 $B\ M^+ D^+ 27^+$ 細胞を特異的に動態化する適切なワクチン量をこれらの人々に投与することによって、T細胞非依存性抗菌免疫応答を誘導または強化することができることが証明された。本発明による免疫化手段の投与は、当業者がベクターまたはキャリアー、ならびに用いられるアジュバントを、ケースバイケース適応させるかぎり、従来経路、特に非限定的に静脈内、腹腔内、皮内、筋肉内の注射によって、ならびにその他の従来経路によって実施されてもよい。当業者は、これを行なうために自分自身の知識に頼り、投与方法および推奨される量を調整するために試験を実施することができるようになる。

40

【0052】

本発明によって同様に、所望であれば、これらの $B\ M^+ D^+ 27^+$ 細胞の作用を特異的に阻害することもできる。

【0053】

インビトロで、B細胞のこの同じサブ集団は、多糖抗原による感染状態を診断するために用いることができ、同様に、例えばELISA法にしたがって、これらのテストの結果を、平行してテストされた同じ多糖抗原に自然の免疫応答を示す被験者の採血と比較する

50

ことによって、本発明にしたがって治療された免疫不全患者の採血に対する、上記のようなワクチン接種の有効性をテストするためにも用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】対照ドナーおよびX H I M患者に由来する再配列V H 3 - 2 3 遺伝子セグメントにおける突然変異の分布を表わす。

【0055】

この図面において各ヒストグラムは、一定の間隔において示された突然変異数を現わすV H 3 - 2 3 の配列のパーセンテージを表わしている。顕著な突然変異プロフィールから考えて、患者C . Q . は、その他のX H I M患者から分けて考察された。一方、ベースレベルに近い突然変異の頻度を有する患者Z . A . は、この分析には含まれなかった。各グループにおいて分析されたV配列数は、子供、n = 3 3 ; 対照成人、n = 3 7 ; X H I M患者、n = 1 2 5 ; 患者C . Q . 、n = 2 8であった。

10

【図2】I g の遺伝子の超変異を生じるヒトB細胞の成長に対して提案された図式を表わす。

【0056】

この図面において、経路Iは、胚中心(C G)において生成されるT細胞依存性応答に対応し、一方、経路I Iは、NKまたはT細胞の通常でない補助を含みうるT細胞非依存性応答に対応するものとして提案されている。脾臓辺縁ゾーン(Z M)またはパイエル板中の同等の部位、またはリンパ節は、B細胞の活性化部位であろう。I g の遺伝子の超変異は、これら2つの経路の各々において起こる。

20

## 【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
25 juillet 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/056909 A2

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : A61K 39/39 (74) Mandataire : LEBOYER, Jean-Jacques; Cabinet Leboyer, 12, rue du Helder, F-75009 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/00240 (81) États désignés (national) : AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 22 janvier 2002 (22.01.2002) (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 01/00834 22 janvier 2001 (22.01.2001) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : INSTITUT NECKER [FR/FR]; 156, rue de Vaugirard, F-75730 Paris Cedex 15 (FR).
- (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : REY-NAUD, Claude-Agnès [FR/FR]; 156, rue de Vaugirard, F-75730 Paris Cedex 15 (FR). WEILL, Jean-Claude [FR/FR]; 156, rue de Vaugirard, F-75730 Paris Cedex 15 (FR).
- Publiée : — sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE TO POLYSACCHARIDE BACTERIAL ANTIGENS AND TO PROTEIN STRUCTURES OF VIRUS CAPSIDS

(54) Titre : MOYENS POUR INDUIRE UNE REPONSE IMMUNE AUX ANTIGENES BACTERIENS POLYSACCHARIDIQUES ET AUX STRUCTURES PROTÉIQUES DES CAPSIDES DE VIRUS

(57) Abstract: The invention concerns an immunogenic composition, in a pharmaceutically acceptable carrier, for specifically stimulating a sub-population of B M<sup>1</sup>D<sup>1</sup>CD27<sup>+</sup> cells so as to provide T-independent anti-bacterial response in said cells. The invention also concerns the use for producing T-independent anti-bacterial immune responses in subjects infected or susceptible of being infected by polysaccharide bacteria (streptococcus, meningococcus, pneumococcus, hemophilus influenza) or by protein capsid viruses (poliovirus, encephalomyocarditis virus, influenza virus).(57) Abrégé : L'invention concerne une composition immunogène, dans un support pharmaceutiquement acceptable, pour la stimulation spécifique d'une sous-population des cellules B M<sup>1</sup>D<sup>1</sup>CD27<sup>+</sup> de manière à procurer une réponse anti-bactérienne T-indépendante de la part des dites cellules. Utilisation pour la production de réponses immunes anti-bactériennes T-indépendantes chez des sujets infectés ou susceptibles d'être infectés par des bactéries polysaccharidiques (streptocoque, méningocoque, pneumocoque, hémophilus influenzae) ou par des virus à capsides protéiques (poliovirus, virus de l'encéphalomyocardite, virus de l'influenza).

WO 02/056909 A2

MOYENS POUR INDUIRE UNE RÉPONSE IMMUNE AUX ANTIGÈNES  
BACTÉRIENS POLYSACCHARIDIQUES ET AUX STRUCTURES  
PROTÉIQUES DES CAPSIDES DE VIRUS

5

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne le domaine de l'immunisation des animaux à sang chaud, y compris l'homme, contre des agents infectieux. Elle concerne plus particulièrement des moyens pour le déclenchement et/ou le renforcement des réponses immunes contre les infections et les maladies provoquées par des bactéries encapsulées à motifs polysaccharidiques et/ou par les structures protéiques des capsides de virus.

10

ARRIÈRE-PLAN TECHNOLOGIQUE DE L'INVENTION

La réponse immune aux antigènes polysaccharidiques se développe graduellement au cours des premières années de la vie (Hidalgo, H. et al., Pre and post-immunization antibody titers in children with recurrent infections, Ann. All. Asthma. Immunol., 1996, 76:341-346) et implique principalement les IgG2. Les enfants âgés de moins de 2 ans et les personnes âgées ne peuvent se défendre contre les bactéries encapsulées à motifs polysaccharidiques, alors que ces individus peuvent répondre aux antigènes T-dépendants (protéiques). Ce phénomène, qui a des conséquences cliniques n'a pas été complètement élucidé à ce jour.

Or, le pneumocoque, le méningocoque, l'hémophilus influenzae et les streptocoques sont des germes à capsule polysaccharidique à motifs variables selon les souches. A titre d'exemple, on a ainsi identifié 84 sérotypes différents du pneumocoque. Or ce germe est la principale cause de pneumopathies, méningites, sinusites et otites bactériennes. Parmi ces affections, les pneumonies à pneumocoque représenteraient près de 5000 décès par an en France, dont 90 % chez des sujets de plus de 65 ans, et 1 million de décès par an dans le monde chez les enfants de moins de 5 ans (Lancet, éditorial, 1999, 354:2011; Shann, F., Pneumococcal vaccine: time for another controlled trial, Lancet, 1998, 351:1600-1601; Siber, G.R., Pneumococcal disease: Prospects for a new generation of vaccines, Science, 1994, 265:1385-1387).

35

Les résistances aux antibiotiques du pneumocoque, autrefois exceptionnelles, sont désormais de plus en plus fréquentes, et atteignent 20 à 35 % des souches pour les antibiotiques les plus utilisés, pénicillines et macrolides, ce qui ramène au premier plan le problème des vaccinations antipneumococciques et également antiméningococciques.

Les premiers vaccins étaient dirigés contre les antigènes polysaccharidiques des capsules des virus, et ils sollicitaient une réponse B, T-indépendante. Ces vaccins 14-, puis 23-valents, qui visaient à couvrir 90 % des sérotypes, avaient été présentés comme efficaces il y a 20 ans. Or, on sait maintenant (Shann, 1998, supra) qu'ils ne protègent que partiellement contre les formes septicémiques, et même qu'ils n'ont pas montré d'efficacité dans les formes non septicémiques, qui sont de loin les plus fréquentes, et qu'ils se sont en particulier avérés être inactifs chez des sujets de moins de 2 ans ou de plus de 50 ans (Örtqvist, A. et al., Randomised trial of 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in prevention of pneumonia in middle-aged and elderly people, *Lancet*, 1998, 352:399-403) et que, dans les meilleurs des cas, leur durée d'action est faible. Il en résulte une inefficacité ou une durée d'efficacité très limitée, nécessitant de multiples revaccinations, dans le cas des vaccins traditionnels dirigés contre les antigènes polysaccharidiques des capsules des virus chez des sujets de moins de 2 ans ou de plus de 50 ans environ.

Pour toutes ces raisons, la politique vaccinale dans le monde reste confuse. Alors que les autorités sanitaires d'Italie, d'Espagne et de Belgique ont développé des programmes de vaccination systématique, celles d'Allemagne, des Pays-Bas et de France, s'en sont à peu près complètement désintéressées (*Lancet*, éditorial, 1999, supra), alors même que la France est le principal producteur européen de vaccins.

Cette situation de quasi-échec pour la prévention et le traitement des infections, notamment à pneumocoques et méningocoques, chez les sujets jeunes et les sujets âgés, constitue pourtant un problème majeur de santé publique.

Plusieurs stratégies sont alors apparues possibles (Siber, 1994, supra):

- Les vaccins conjugués, sur le modèle du vaccin anti-Hémophilus B, dont l'efficacité est clairement établie, concernent les 7 ou 9 sérotypes les plus fréquents, couplés chacun à une protéine antigénique, et permettent ainsi

d'obtenir une réponse immunologique beaucoup plus forte, en sollicitant les lymphocytes B, T-indépendants. Ils posent cependant des problèmes considérables de technologie et de coût de production, car chaque antigène polysaccharidique doit être couplé sélectivement à la protéine antigénique en une concentration appropriée, si bien que le vaccin ainsi constitué est en réalité un mélange de plusieurs, en pratique 7, vaccins différents, ce qui est techniquement très difficile à réaliser. De plus, avec de tels vaccins, d'autres problèmes surgissent. C'est ainsi que la dose d'antigène protéique, nécessairement élevée, peut induire des réactions sévères. De plus, on est confronté à un problème de compétition antigénique entre les divers sous-vaccins. Mais aussi, et surtout, un problème majeur est celui de la difficulté du choix des protéines antigéniques, toxines diphtériques ou tétaniques ou protéines de l'enveloppe extérieure du méningocoque (Siber, 1994, supra; Shann, 1998, supra).

• Une solution alternative consiste à renoncer à viser les antigènes polysaccharidiques et à utiliser les enzymes ou protéines pneumococciques, pneumolysine, neuraminidase, autolysine, hyaluronidase, protéine de surface A, adhésine de surface A, etc.,. Or, jusqu'à maintenant, aucun des essais d'immunisation s'appuyant sur ces choix n'a fait la preuve expérimentale de son efficacité (Siber, 1994, supra; Shann, 1998, supra).

• Une troisième solution envisagée serait d'injecter simultanément avec des vaccins classiques des anticorps anti-CD40, susceptibles d'entraîner une activation polyclonale B (Shann, 1998, supra).

Aucune d'entre elles n'a cependant apporté des réponses pleinement satisfaisantes à la problématique sanitaire rappelée plus haut.

On a maintenant trouvé de manière inattendue que l'on peut induire et/ou stimuler, ou encore soumettre à une régulation négative une réponse immune aux antigènes polysaccharidiques et aux structures protéiques des capsides de virus en stimulant ou respectivement inhibant spécifiquement une sous-population de cellules B, à savoir la sous-population de cellules B  $M^+D^{+27^+}$ , y compris les cellules d'une telle sous-population de cellules B qui ne sont pas dans un centre germinatif, avantageusement de manière ciblée pour qu'elle apporte une réponse anti-bactérienne T-indépendante.

On a ainsi élaboré des moyens pour déclencher et/ou renforcer une telle réponse immune chez des sujets démunis de réponse immune propre,

ou chez lesquels la réponse immune concernée est insuffisante - ce qui est le cas des enfants de moins de deux ans ainsi que des personnes âgées de plus de 65 ans -, ainsi que des moyens pour tester si une réponse immune appropriée est intervenue, aussi bien sous l'effet d'une réponse immune naturelle que sous l'action de l'induction et/ou stimulation d'une réponse immune conformément à la présente invention, c'est-à-dire à l'encontre des antigènes polysaccharidiques bactériens et des structures protéiques des capsides de virus.

L'invention a pour objets un nouveau concept immunogène et vaccinal, un vaccin y relatif, ainsi qu'un protocole de test pour le diagnostic soit des états nécessitant une vaccination selon l'invention, soit de l'efficacité d'une vaccination selon l'invention chez un sujet qui y a été soumis. L'invention a également pour objet l'application du dit concept immunogène particulier à la préparation de moyens pour l'inhibition d'une réponse auto-immune.

#### RÉSUMÉ DE L'INVENTION

Les moyens selon l'invention pour l'immunisation des animaux à sang chaud, y compris l'homme, contre les infections et les maladies provoquées par des bactéries encapsulées à motifs polysaccharidiques et/ou par les structures protéiques des capsides de virus, comportent ainsi, d'une part un moyen vaccinal original, d'autre part des moyens diagnostiques pour la l'évaluation des états nécessitant une vaccination selon l'invention et/ou pour l'évaluation de l'efficacité d'une vaccination selon l'invention sur des prélèvements sanguins effectués sur un sujet donné.

#### BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

L'invention est illustrée ci-après plus en détail, en référence aux planches de dessins annexées, dans lesquelles:

Fig. 1 représente la distribution de mutations dans des segments de gène VH3-23 réarrangés provenant de donneurs témoins et de patients XHIM.

Dans cette figure, chaque histogramme représente le pourcentage de séquences de VH3-23 manifestant le nombre de mutations indiqué dans un intervalle donné. Etant donné son profil de mutation remarquable, le patient

WO 02/056909

PCT/FR02/00240

5

C.Q. a été considéré séparément des autres patients XHIM, tandis que le patient Z.A. dont la fréquence des mutations était proche du niveau de base n'a pas été inclus dans cette analyse. Le nombre de séquences V analysées dans chaque groupe était: enfants, n=33; adultes témoins, n=37; patients XHIM, n=125; patient C.Q., n=28.

Fig. 2 représente un schéma proposé pour le développement de cellules B humaines conduisant à une hypermutation de gène des Ig.

Dans cette figure, la voie I correspond à des réponses T-dépendantes se produisant dans les centres germinatifs (CG), tandis que la voie II est proposée comme correspondant à des réponses T-indépendantes qui peuvent comporter l'assistance non-conventionnelle de cellules NK ou T. La zone marginale splénique (ZM) ou des sites équivalents dans les plaques de Peyer ou les ganglions lymphatiques pourraient être le site d'activation des cellules B. Une hypermutation de gènes des Ig a lieu dans chacune de ces deux voies.

#### DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

Le principe théorique qui est à la base de la présente invention est la mutation des gènes des Ig d'une sous-population B définie en l'absence de collaboration T-B classique.

La population lymphocytaire B comprend, chez l'homme, quatre sous-populations (Klein, U. et al., 1998, J. Exp. Med. 188:1679-1689):

- La première consiste en des cellules naïves, toujours CD27<sup>-</sup> et IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> (M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>-</sup>), qui proviennent de la moelle osseuse et représentent environ 60 % des lymphocytes B. Elles peuvent être CD5<sup>+</sup> (pour environ 15 %) ou CD5<sup>-</sup> (pour environ 45 %).
- Les trois autres consistent en des cellules à mémoire, qui représentent les 40 % restants, et qui sont toutes CD27<sup>+</sup>, avec environ 15 % de cellules qui ont effectué la commutation isotypique (M<sup>-</sup>D<sup>-</sup>27<sup>+</sup>) et environ 25 % qui ne l'ont pas effectuée (M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup> pour environ 15 % et M<sup>+</sup>D<sup>-</sup>27<sup>+</sup> pour environ 10 %).

Il est intéressant de noter que ce compartiment mémoire, qui représente ainsi environ 40 % des lymphocytes B, n'en représente que quelques pour cent chez la souris. Contrairement à celle-ci, l'homme est

WO 02/056909

PCT/FR02/00240

6

capable de muter dans ses centres germinatifs toutes les cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>, aussi bien D<sup>+</sup> que D<sup>-</sup>.

D'une part il est connu que le CD40 ligand (L) est la molécule-clé de l'interaction T-B dans les réponses T-dépendantes. Les patients humains mâles atteints du syndrome d'hyper IgM, avec une mutation mutilante sur le CD40 L situé sur le chromosome X et les souris knock-out pour ce gène, ne forment pas de centres germinatifs et, faute de collaboration T-B, ne commutent pas les isotypes des chaînes lourdes, ne mutent pas leurs gènes des immunoglobulines, et ne possèdent pratiquement pas d'IgG circulantes.

D'autre part, les inventeurs de la présente invention ont isolé par des techniques connues la population M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup> de tels patients humains mâles atteints du syndrome d'hyper IgM et ils ont montré que la fréquence des mutations somatiques y était plus ou moins normale suivant les patients. Face à ce résultat extrêmement surprenant, ils ont émis l'hypothèse que cette population M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>, qui représente environ 40 % des cellules mutées chez l'adulte normal, se développe et se diversifie malgré l'absence de centre germinatif.

D'autre part encore, les inventeurs de la présente invention ont également pris en compte le fait que les cellules M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup> représentent chez l'homme, à la naissance environ 1 % des cellules B du cordon ombilical, et peuvent montrer un taux de mutations d'environ 0,5 par séquence (variable) d'environ 300 pb, tandis que pour des sujets à l'âge adulte elles ont diversifié leurs gènes d'immunoglobulines et représentent environ 5 à 25 % du compartiment B, avec 5 à 10 mutations par séquence (variable).

On a alors établi selon la présente invention que le développement de cette population est parallèle à l'apparition des réponses aux antigènes T-indépendants, d'où l'hypothèse que ces cellules pouvaient être responsables des réponses immunes aux bactéries à capsules polysaccharidiques, streptocoques, pneumocoques, méningocoques, hémophilus influenzae et autres bactéries encapsulées polysaccharidiques, dont les résidus saccharidiques ne peuvent être présentés par les molécules du CMH, et qu'elles pouvaient également être à la base de la réponse à des virus à structure capsidique répétitive, qui déclenchent une réponse essentiellement T-indépendante, tels que notamment le poliovirus, le virus de la grippe, le virus de l'encéphalomyocardite, et autres (Bachmann, M.F. et

al., The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation, *Immunol. Today*, 1996, **17**(12):553-558).

Effectivement, les inventeurs ont observé que ceux des patients qui présentent une forte expansion de la population de cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>, avec un taux élevé de mutations, sont mieux protégés que les autres contre les différents types d'infections pulmonaires ou d'infections ORL généralement observées chez les patients immunodéficients substitués aux IgG.

Enfin, dans la mesure où la réponse aux vaccins anti-polysaccharidiques bactériens ne se manifeste pas chez des patients splénectomisés (Molrine, D. et al., Normal IgG and impaired IgM responses to polysaccharide vaccines in asplenic patients, *J. Inf. Dis.*, 1999, **179**:513-517), on peut admettre que la rate, et notamment sa zone marginale, pourrait être le lieu où sont produites ou stockées ces cellules M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>.

Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, on estime plausible un modèle de développement des cellules B d'un animal à sang chaud, y compris l'homme, en deux compartiments correspondant aux différents types d'agressions extérieures auxquelles le sujet concerné sera confronté durant sa vie. L'homme, entre autres, devrait avoir ainsi développé deux systèmes B, l'un pouvant se diversifier dans les centres germinatifs afin de répondre avec une forte affinité aux antigènes peptidiques thymodépendants, et l'autre semblable à celui des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (couramment dénommés GALT) et développé au cours de l'ontogénèse chez de nombreuses espèces (notamment le lapin, le mouton, les bovins), pouvant se diversifier de façon indépendante des centres germinatifs et pouvant assurer aux sujets chez lesquels de telles cellules sont actives une protection contre les antigènes T-indépendants.

On a, pour ce faire, pris en compte des résultats procurés par la mise en oeuvre de la présente invention, selon lesquels des malades Hyper IgM ayant un taux de cellules M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup> élevé et portant un récepteur d'Ig diversifié résistent mieux aux infections que ne le font d'autres malades non Hyper IgM recevant pourtant régulièrement des substitutions d'IgG.

Les expérimentations relatées ci-après servent à illustrer des aspects de la présente invention et ne doivent en aucune manière être considérées comme limitant celle-ci.

- 5 Analyse par séparation et cytométrie de flux de cellules B IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>
- Un triage de cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup> a été effectué par tachage bicolore sur des suspensions de cellules purifiées au Ficoll-isopaque enrichies en cellules B à 95-98% par séparation magnétique des cellules au moyen du système MiniMACS (Miltenyi Biotech), et l'un des réactifs suivants: 1) IgD anti-humain-FITC (Caltag) et CD27 anti-humain biotinylé (Ansell) plus Streptavidine-TriColor (Caltag); et 2) anti-IgD-FITC, CD27 anti-humain-PE (Coulter-Immunotech). On préférerait cette dernière combinaison pour le triage de cellules de patients XHIM, étant donné que la coloration des populations CD27<sup>+</sup> présentes à un faible pourcentage était quelquefois artificiellement renforcée avec le CD27-TriColor, d'après nos propres observations.
- L'absence de cellules B mémoire IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> a été suivie sur PBMC purifiée au Ficoll par coloration avec de l'anti-CD19-PC5 (Coulter-Immunotech), anti-IgD-FITC et anti-CD27-PE. Une analyse à trois couleurs a été effectuée sur des cellules B positives au CD19-PC5. Une autre caractérisation a été réalisée sur des cellules B enrichies en CD19, colorées avec de l'anti-IgD-FITC, IgM anti-humain-PE (Caltag) et anti-CD27 biotinylé, suivie par Streptavidine-TriColor. Une analyse en trois couleurs a été effectuée sur des cellules positives au CD27-TriColor barrière. Etant donné que les cellules IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> co-expriment l'IgM (données non représentées), cette population est dénommée IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (ou en abrégé M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>).

Analyse de séquences de segments de gène VH3-23 réarrangés.

- De l'ADN génomique a été extrait de cellules B D<sup>+</sup>27<sup>+</sup> triées par digestion par la protéinase K. Des segments de gène VH3-23 réarrangés ont été amplifiés à partir d'approximativement 3000 cellules via une polymérase Pfu Turbo (Statagene), selon une stratégie d'ACP semi-nidifiée (semi-nested). Pour le premier round d'amplification, une amorce de tête de VH3-23 (5'-GGCTGAGCTGGCTTTTCTTGIGG-3') et un mélange d'amorces 35 3'<sup>H</sup> (5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGG-3' et 5'-TGAGGAGACGGTGACC-

GTGG-3' dans un rapport de 3:1) ont été utilisés (45 s à 95°C, 60 s à 64°C, 90 s à 72°C sur 25 cycles). Le second round d'amplification a été mis en oeuvre sur 1/10 du premier mélange réactionnel au moyen du même mélange d'amorces 3'JH et d'une amorce intronique VH3-23 (5'-  
5 CTGGAATGGATAAGAGTGA-3') (45 s à 95°C, 60 s à 55°C, et 90 s à 72°C sur 25 cycles). La valeur de l'erreur d'ACP de fond a été déterminée dans les mêmes conditions expérimentales sur des cellules B D<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>-</sup> provenant de sang du cordon, avec la même taille d'échantillon (soit 3000 cellules). Les produits d'ACP purifiés sur gel ont été clonés au moyen du kit de clonage de  
10 produits d'ACP Zero blunt TOPO PCR (Invitrogen). Les séquences des colonies positives au VH3-23 ont été obtenues au moyen du kit de séquençage à cycles BigDye (Perkin-Elmer) et analysées avec un analyseur génétique ABI310. Les séquences obtenues ont été comparées au gène VH3-23 de lignée germinale sur 288 paires de bases (pb) (de Glu1 à Cys92).

15 En mettant en oeuvre ces matériels et méthodes, on a analysé des mutations somatiques sur des séquences de VH3-23 réarrangés, amplifiées à partir d'ADN génomique de cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>. Un patient (Z.A.) présentait un niveau de mutation proche de la base, déterminée dans les mêmes conditions expérimentales sur la population M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>; ce patient  
20 avait un passé médical particulier, étant donné qu'il avait reçu et rejeté une greffe de moelle osseuse trois ans avant le présent échantillonnage sanguin. Tous les autres patients, quel que soit leur âge, présentaient un niveau de mutation semblable à celui observé chez des enfants témoins (0,5 - 1,7 % pour les séquences totales et 0,9 - 1,9 % pour les séquences mutées, avec 0-15  
25 mutations par séquence V), sauf un qui, de façon assez frappante étant donné son jeune âge (C.Q., 5 ans), présentait une fréquence de mutations proche de celle d'un adulte témoin (2,2 % pour les séquences totales, 3,27 % pour les séquences mutées, 0-18 mutations par séquence V) (voir Tableau I et Fig. 1). L'analyse d'ensemble des séquences a révélé une distribution normale  
30 des mutations avec un groupement ou agrégation et une sélection pour les des mutations de remplacement dans les CDR. Chez tous les patients, la plupart des séquences présentaient différentes jonctions VH-D-JH, ce qui indiquait l'absence d'une expansion clonale VH3-23 spécifique.

Tableau 1. Mutations somatiques dans des gènes VH3-23 réarrangés dans des cellules B de sang périphérique IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> de patients XHIM

Donneur	Age (ans)	% de cellules B CD27 <sup>+</sup>	Nombre de séquences		Mutations	Mutations		fréquences/séquences mutées (%)	fréquences/séquences mutées (%)
			Total	Mutées		gamma	nombre		
<b>Patients XHIM</b>									
C.O.	5	1	26	15 (57%)	0-10	179	2,2	3,27	
C.R.	7	1,5	18	16 (89%)	0-13	90	1,7	1,9	
L.P.	7	2	19	13 (68%)	0-12	61	1,1	1,82	
A.N.	7	2	16	9 (56%)	0-7	27	0,52	1	
L.C.	8	1	27	16 (59%)	0-10	41	0,52	0,89	
Z.A.	15	2	24	12 (50%)	0-1	12	0,17	0,34	
B.M.	16	4	29	10 (34%)	0-15	40	0,6	1,35	
F.F.	21	60	20	19 (95%)	0-9	75	1,3	1,37	
<b>Témoins sains</b>									
D1	4	7	15	6 (40%)	0-14	45	1	1,95	
D2	5	7	16	17 (88%)	0-13	78	1,5	1,7	
D3	19	7	14	13 (93%)	0-19	150	3,22	3,47	
D4	adulte	10	23	19 (83%)	0-22	182	2,75	3,24	
<b>Sang du cordon ombilical</b>									
C1		1	17	11 (64%)	0-2	12	0,24	0,37	
C2		1	25	5 (20%)	0-2	6	0,08	0,4	
<b>Bases</b>									
C3		1	16	4 (25%)	0-1	4	0,08	0,54	
<b>(Cellules B D'27)</b>									
			44	12 (27%)	0-2	14	0,1		

La proportion variable de séquences non-mutées obtenues dans la population  $M^+D^+27^+$  (5 à 60 %) pourrait correspondre à la pureté variable de la population triée lorsqu'elle est présente à une basse fréquence. Cette proportion était considérablement réduite lorsque des cellules  $M^+D^+27^+$  étaient présentes en grand nombre (par exemple, le patient F.F. avec 60 % de cellules B  $M^+D^+27^+$  avait 95 % de séquences V mutées; voir Tableau I). D'après trois échantillons de sang de cordon ombilical témoins, la fréquence des mutations dans la population de  $M^+D^+27^+$  était proche de la base dans deux cas, et légèrement au-dessus dans un cas (deux fois le niveau de base).

On a ainsi montré que cette population particulière de cellules B  $M^+D^+27^+$  a une voie de différenciation qui lui est propre. Elle présente un certain nombre de récepteurs qui lui sont uniques et qui à leur tour peuvent être utilisés spécifiquement. L'homme du métier est apte à sélectionner, sur la base des enseignements contenus ici et de ses connaissances propres, au besoin en effectuant des essais itératifs, des marqueurs de surfaces propres à cette sous-population de cellules B, dont la mobilisation et/ou la stimulation par les moyens selon l'invention est apte à procurer un traitement bénéfique pour les patients concernés.

A titre indicatif, et non limitatif, de tels marqueurs peuvent être le CD21 et l'IgD associé au CD27. On a également trouvé qu'un autre marqueur, le CD1c exprimé fortement sur ces cellules peut servir à des stimulations vaccinales.

Etant donné l'observation critique selon laquelle cette population mute ses gènes de l'Ig de façon indépendante, les moyens de vaccination mis en oeuvre dans la technique d'immunisation selon l'invention sont aptes à améliorer considérablement les anticorps produits, en induisant la prolifération spécifique des clones concernés et en augmentant ainsi le taux de mutation.

Un vaccin selon l'invention peut comporter une composition immunogène contenant un conjugué. Selon une forme de réalisation du dit vaccin, l'agent apte à procurer une réponse immune T-indépendante peut être fixé par covalence à des liposomes.

La composition immunogène ainsi mise en oeuvre peut être combinée avec un support pharmaceutiquement acceptable dans une composition pharmaceutique.

D'autre part, des moyens diagnostiques fondés sur la présente invention, permettant l'identification et/ou la quantification de cette population de cellules B particulières présente dans le sang, permettent de tester/diagnostiquer l'efficacité d'une vaccination. En pratique, on effectue  
5 pour ce faire l'analyse des gènes VH spécifiquement engagés dans ces réponses, aussi bien au niveau de leur taux de mutation qu'au niveau de l'expansion du clone concerné.

Pour la mise en oeuvre d'une tel diagnostic, on peut opérer sur des prélèvements d'environ 10 ml de sang non coagulé, duquel on a extrait les  
10 leucocytes, tandis que les essais ou les contrôles bactéricides sont pratiqués selon des méthodes connues de l'homme du métier.

De plus, étant donné le rôle de cette population de cellules B spécifique dans les réponses antibactériennes et/ou antivirales considérées ici, l'expansion anormale de cette population de cellules B s'observe dans  
15 certaines manifestations auto-immunes. Là encore, la quantification de cette population de cellules sanguines permet de diagnostiquer très simplement la présence et/ou l'importance de ces populations anormales.

Au lieu, cette fois-ci, d'induire la prolifération de cette sous-population de cellules B considérée dans le cadre d'une vaccination, on peut  
20 également, au moyen de molécules inhibitrices spécifiques pour cette population, inhiber la prolifération de ces cellules dans ces pathologies. L'homme du métier est apte à rechercher et tester, pour en faire la sélection, de telles molécules inhibitrices spécifiques de la sous-population de cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>. A ce propos, il faut en outre noter qu'une certaine proportion  
25 de lymphomes B émergent au cours de ces syndromes auto-immuns et que le phénotype de ces lymphomes s'est avéré correspondre souvent à celui des cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>. L'invention vise donc également des moyens pour réguler la croissance de ces cellules soit dans la période d'hyperplasie, soit dans la période tumorale, ces moyens reposant sur des inhibiteurs  
30 spécifiques de la sous-population de cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>.

L'invention a par conséquent également pour objet une composition pour inhiber ou réguler négativement une réponse auto-immune aux antigènes polysaccharidiques bactériens et aux structures protéiques des capsides de virus, comprenant une quantité efficace de molécules inhibitrices  
35 spécifiques pour la sous-population de cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>.

Tant pour la stimulation ou mobilisation que pour l'inhibition selon l'invention des dites cellules B spécifiques, on peut par exemple procéder par injection intradermique de polysaccharide bactérien méningococcique, pneumococcique, etc., avec des molécules aptes à stimuler spécifiquement ladite population M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>.

En pratique, et à titre d'exemple uniquement, une dose de composition immunogène d'environ 0,01 µg à environ 10 µg par kilogramme de poids corporel de l'individu traité est appropriée.

Le support de la composition immunogène peut être quelconque, notamment une solution salée, la solution de Ringer ou une solution salée tamponnée au phosphate. En pratique, la composition immunogène comporte avantageusement un adjuvant.

Ladite composition immunogène peut comporter un conjugué immunogène et elle peut être administrée à un individu, par exemple, à une dose d'agent immunogène d'environ 0,01 µg à environ 10 µg par kilogramme de poids corporel.

Même chez les patients humains âgés de 2 à 60 ans, les compositions injectables élaborées conformément à l'invention permettent de renforcer efficacement, en fonction des récepteurs spécifiques utilisés, soit la stimulation ou mobilisation soit l'inhibition des cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup> inductrices d'une réponse immune chez le patient traité.

L'originalité du concept selon l'invention consiste à considérer que les cellules B responsables de la réponse antibactérienne et partiellement antivirale explicitées plus haut sont de fait déjà présentes dès le plus jeune âge (avant 1 an chez les enfants) avec des récepteurs bien diversifiés et que l'on peut à l'aide des marqueurs spécifiques de ces populations les stimuler et protéger ainsi les très jeunes enfants avec des antigènes polysaccharidiques non couplés, ce qui n'était pas le cas jusqu'à maintenant.

Il n'y a par ailleurs pas de raison de suspecter une toxicité particulière aux produits et aux moyens selon la présente invention.

En conclusion, on a montré selon l'invention qu'il est possible d'induire ou de renforcer une réponse immunitaire anti-bactérienne T-indépendante chez les animaux à sang chaud, y compris l'homme, et plus particulièrement chez les jeunes enfants de moins de 2 ans et chez les personnes âgées de plus de 65 ans, en leur administrant une quantité

vaccinale appropriée susceptible de mobiliser spécifiquement les cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>. L'administration des moyens d'immunisation selon l'invention peut s'effectuer par injection par les voies classiques, notamment mais non exclusivement par voie intraveineuse, intrapéritonéale, intradermique, 5 intramusculaire, ainsi que par d'autres voies traditionnelles d'administration, pour autant que les vecteurs ou supports, ainsi que les adjuvants utilisés soient adaptés au cas par cas, par l'homme du métier qui recourt pour ce faire à ses connaissances propres et peut être amené à pratiquer des essais en vue de la mise au point d'un mode d'administration et des quantités 10 préconisées.

L'invention permet également, si on le souhaite, d'inhiber spécifiquement l'action de ces cellules B M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>.

In vitro, cette même sous-population de cellules B peut être utilisée pour diagnostiquer un état infectieux par antigènes polysaccharidiques, et 15 également pour tester l'efficacité d'une vaccination telle que susdite sur un prélèvement de sang d'un sujet immunodéficient traité selon l'invention, par comparaison des résultats des tests, par exemple selon une méthodologie ELISA, avec des prélèvements de sang de sujets manifestant une réponse immune naturelle aux mêmes antigènes polysaccharidiques et testés en 20 parallèle.

REVENDICATIONS

1. Composition immunogène apte à procurer une réponse immune aux antigènes polysaccharidiques et/ou aux structures protéiques des capsides des virus, caractérisée en ce qu'elle comporte, dans un support pharmaceutiquement acceptable, une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un marqueur de surface spécifique pour les cellules B de sous-population M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>, y compris les cellules d'une telle sous-population de cellules B qui ne sont pas dans un centre germinatif.
2. Composition immunogène selon la revendication 1, dans laquelle le support est choisi dans le groupe consistant en une solution salée, la solution de Ringer et une solution salée tamponnée au phosphate.
3. Composition immunogène selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle la composition immunogène comprend en outre un adjuvant.
4. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comporte un conjugué immunogène.
5. Composition immunogène selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte des marqueurs de surface spécifiques pour les récepteurs des cellules B de sous-population M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>, notamment des marqueurs choisis parmi le CD21, l'IgD associé au CD27 et le CD1c.
6. Vaccin pour procurer une protection contre les infections antibactériennes T-indépendantes, comprenant une quantité de la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 apte à procurer une réponse immune T-indépendante.
7. Vaccin selon la revendication 6, dans lequel ladite composition immunogène comporte un conjugué.

WO 02/056909

PCT/FR02/00240

16

8. Vaccin selon la revendication 6, dans lequel l'agent apte à procurer une réponse immunitaire T-indépendante est fixé par covalence à des liposomes.
- 5 9. Utilisation de la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la préparation d'un médicament pour procurer aux animaux à sang chaud, y compris l'homme, des réponses immunitaires aux antigènes polysaccharidiques bactériens et aux structures protéiques des capsides de virus.
- 10 10. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle ladite composition immunogène est administrée à un individu à une dose d'agent immunogène d'environ 0,01 µg à environ 10 µg par kilogramme de poids corporel.
- 15 11. Utilisation du vaccin selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 pour la préparation d'un médicament pour procurer aux animaux à sang chaud, y compris l'homme, des réponses immunitaires aux antigènes polysaccharidiques bactériens et aux structures protéiques des capsides de virus.
- 20 12. Utilisation du vaccin selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 pour la préparation d'un médicament pour la protection contre une infection par streptocoques, pneumocoques, méningocoques ou hémophilus influenzae.
- 25 13. Composition pharmaceutique comprenant une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et un support pharmaceutiquement acceptable.
- 30 14. Procédé de diagnostic in vitro, soit des états nécessitant une vaccination, soit de l'efficacité d'une vaccination contre un état infectieux par antigènes polysaccharidiques, caractérisé en ce qu'il comporte la détection et/ou la quantification dans un prélèvement sanguin de cellules B de sous-population M<sup>+</sup>D<sup>+</sup>27<sup>+</sup>.
- 35

WO 02/056909

PCT/FR02/00240

17

15. Procédé de diagnostic in vitro selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comporte l'analyse des gènes VIH spécifiquement engagés dans ladite réponse immune, avantageusement tant au niveau de leur taux de mutation qu'au niveau de l'expansion du clone concerné.
16. Procédé de diagnostic in vitro selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisé en ce qu'on le met en oeuvre sur un prélèvement de sang d'un sujet immunodéficient et on compare les résultats du test avec ceux de prélèvements de sang de sujets manifestant une réponse immune naturelle aux mêmes antigènes polysaccharidiques.
17. Procédé de diagnostic in vitro selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'on utilise un prélèvement de sang d'environ 10 ml.
18. Utilisation de la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la préparation d'un médicament ayant une action d'inhibition sur la réponse auto-immune chez un sujet, par inhibition spécifique de l'action des cellules  $BM^+D^+27^+$ .

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
25 juillet 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/056909 A3(51) Classification internationale des brevets<sup>1</sup> :  
A61K 39/39, C12Q 1/02, 1/68,  
G01N 33/53, A61P 31/00, 37/00 // A61K 39/02, 39/085,  
39/09, 39/95, 39/102, 39/12(74) Mandataire : LEBOYER, Jean-Jacques; Cabinet  
Leboyer, 12, rue du Helder, F-75009 Paris (FR).(21) Numéro de la demande internationale :  
PC/1/FR02/00240(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.(22) Date de dépôt international :  
22 janvier 2002 (22.01.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GI, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/00834 22 janvier 2001 (22.01.2001) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : INSTI-  
TUT NECKER [FR/FR]; 156, rue de Vaugirard, F-75730  
Paris Cedex 15 (FR).Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : REY-  
NAUD, Claude-Agnès [FR/FR]; 156, rue de Vaugirard,  
F-75730 Paris Cedex 15 (FR). WEILL, Jean-Claude  
[FR/FR]; 156, rue de Vaugirard, F-75730 Paris Cedex 15  
(FR).(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 30 octobre 2003En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.(54) Title: METHOD FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE TO POLYSACCHARIDE BACTERIAL ANTIGENS AND  
TO PROTEIN STRUCTURES OF VIRUS CAPSIDS(54) Titre : MOYENS POUR INDUIRE UNE RÉPONSE IMMUNE AUX ANTIGÈNES BACTÉRIENS POLYSACCHARI-  
DIQUES ET AUX STRUCTURES PROTÉIQUES DES CAPSIDES DE VIRUS(57) Abstract: The invention concerns an immunogenic composition, in a pharmaceutically acceptable carrier, for specifically stim-  
ulating a sub-population of B M<sup>D</sup>CD27<sup>+</sup> cells so as to provide T-independent anti-bacterial response in said cells. The invention  
also concerns the use for producing T-independent anti-bacterial immune responses in subjects infected or susceptible of being in-  
fected by polysaccharide bacteria (streptococcus, meningococcus, pneumococcus, hemophilus influenza) or by protein capsid viruses  
(poliovirus, encephalomyocarditis virus, influenza virus).(57) Abrégé : L'invention concerne une composition immunogène, dans un support pharmaceutiquement acceptable, pour la sti-  
mulation spécifique d'une sous-population des cellules B M<sup>D</sup>CD27<sup>+</sup> de manière à procurer une réponse anti-bactérienne T-indé-  
pendante de la part des dites cellules. Utilisation pour la production de réponses immunes anti-bactériennes T-indépendantes chez  
des sujets infectés ou susceptibles d'être infectés par des bactéries polysaccharidiques (streptocoque, méningocoque, pneumocoque,  
hémophilus influenzae) ou par des virus à capsides protéiques (poliovirus, virus de l'encéphalomyocardite, virus de l'influenza).

WO 02/056909 A3

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internet-based Application No PCT/FR 02/00240
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K39/39 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 A61P31/00 A61P37/00 //A61K39/02, A61K39/085, A61K39/09, A61K39/95, A61K39/102, A61K39/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KLEIN U ET AL: "Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (Memory) B cells." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 188, no. 9, 2 November 1998 (1998-11-02), pages 1679-1689, XP002182727 cited in the application the whole document --- ---	14-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2003		Date of mailing of the international search report 02/04/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-0010		Authorized officer Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/FR 02/00240
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANGYE S G ET AL: "Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 188, no. 9, 2 November 1998 (1998-11-02), pages 1691-1703, XP002182726 page 1701, right-hand column	14-17
X	AGEMATSU K: "Memory B cells and CD27." HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, vol. 15, no. 2, April 2000 (2000-04), pages 573-576, XP001031446	14-17
L	the whole document L: Art. 33(3) PCT	1-13,18
L	WO 99 64603 A (LEES ANDREW ;MOND JAMES J (US); JACKSON H M FOUND MILITARY MED (US) 16 December 1999 (1999-12-16) page 3 -page 5 L: Art. 33(3) PCT	1-13,18
L	AGEMATSU K ET AL: "B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 27, no. 8, August 1997 (1997-08), pages 2073-2079, XP001031448 ISSN: 0014-2980 paragraph *03.5! L: Art. 33(3) PCT	1-13,18
A	AGEMATSU K ET AL: "Absence of IgD-CD27+ memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 102, no. 4, 15 August 1998 (1998-08-15), pages 853-860, XP002182728	
A	WO 96 12190 A (BRENNAN PATRICK J ;BRENNER MICHAEL B (US); BRIGHAM & WOMENS HOSPIT) 25 April 1996 (1996-04-25)	
P,X	WELLER S ET AL: "CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 3, 30 January 2001 (2001-01-30), pages 1166-1170, XP002182729 the whole document	14-17
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 02/00240

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	FAILI A ET AL: "AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line." NATURE IMMUNOLOGY, vol. 3, no. 9, September 2002 (2002-09), pages 815-821, XP008014204 ISSN: 1529-2908	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FR 02/00240
--

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(d) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: —  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**see additional sheet (FURTHER INFORMATION FROM PCT/ISA/210)**
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**       The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.  
PCT/FR 02/00240

Continuation of Box I.2

Claims 1-4, 6-13 and 18 relate to compositions having an IgM+IgD+CD27+ B cell-specific surface marker. This definition encompasses a large number of possible determinants, but the application provides support under PCT Article 6 and disclosure under PCT Article 5 only for a small number of markers. Therefore, it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search has thus been directed to the parts of the claims that appear to be supported and adequately disclosed, i.e. the parts relating to the markers CD21, CD1c and IgD combined with CD27 as mentioned in Claim 5.

Similarly, the search relating to Claims 14-17 was directed to the methods for detecting or quantifying one of the markers CD21, CD1c and IgD combined with CD27, as mentioned in Claim 5.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority, the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report or in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 02/00240

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9964603	A	16-12-1999	AU 4559499 A 30-12-1999
			CA 2331258 A1 16-12-1999
			EP 1086231 A2 28-03-2001
			JP 2002517249 T 18-06-2002
			WO 9964603 A2 16-12-1999
			US 6432679 B1 13-08-2002
			US 2002119529 A1 29-08-2002
WO 9612190	A	25-04-1996	US 5853737 A 29-12-1998
			US 5679347 A 21-10-1997
			US 6238676 B1 29-05-2001
			AT 212129 T 15-02-2002
			AU 694299 B2 16-07-1998
			AU 4277996 A 06-05-1996
			CA 2202680 A1 25-04-1996
			DE 69525058 D1 21-02-2002
			EP 1170592 A1 09-01-2002
			EP 0786088 A2 30-07-1997
			JP 10510142 T 06-10-1998
			WO 9612190 A2 25-04-1996
			US 2002009465 A1 24-01-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande internationale No PCT/FR 02/00240
<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 A61K39/39 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 A61P31/00 A61P37/00 //A61K39/02, A61K39/085, A61K39/09, A61K39/95, A61K39/102, A61K39/12		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Bases de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KLEIN U ET AL: "Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (Memory) B cells." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 188, no. 9, 2 novembre 1998 (1998-11-02), pages 1679-1689, XP002182727 cité dans la demande le document en entier --- -/--	14-17
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour le fin de la liste des documents	
<input checked="" type="checkbox"/>	Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe	
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
27 mars 2003		02/04/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 345-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Teyssier, B

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No  
 PCT/FR 02/00240

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TANGYE S G ET AL: "Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 188, no. 9, 2 novembre 1998 (1998-11-02), pages 1691-1703, XP002182726 page 1701, colonne de droite	14-17
X	AGEMATSU K: "Memory B cells and CD27." HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, vol. 15, no. 2, avril 2000 (2000-04), pages 573-576, XP001031446	14-17
L	le document en entier L: Art. 33(3) PCT	1-13,18
L	WO 99 64603 A (LEES ANDREW ;MOND JAMES J (US); JACKSON H M FOUND MILITARY MED (US) 16 décembre 1999 (1999-12-16) page 3 -page 5 L: Art. 33(3) PCT	1-13,18
L	AGEMATSU K ET AL: "B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 27, no. 8, août 1997 (1997-08), pages 2073-2079, XP001031448 ISSN: 0014-2980 alinéa '03.5! L: Art. 33(3) PCT	1-13,18
A	AGEMATSU K ET AL: "Absence of IgD-CD27+ memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 102, no. 4, 15 août 1998 (1998-08-15), pages 853-860, XP002182728	
A	WO 96 12190 A (BRENNAN PATRICK J ;BRENNER MICHAEL B (US); BRIGHAM & WOMENS HOSPIT) 25 avril 1996 (1996-04-25)	
P,X	WELLER S ET AL: "CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 3, 30 janvier 2001 (2001-01-30), pages 1166-1170, XP002182729 le document en entier	14-17

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 02/00240

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	FAILI A ET AL: "AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line." NATURE IMMUNOLOGY, vol. 3, no. 9, septembre 2002 (2002-09), pages 815-821, XP008014204 ISSN: 1529-2908 -----	

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR 02/00240**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n°<sup>es</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2.  Les revendications n°<sup>es</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3.  Les revendications n°<sup>es</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°<sup>es</sup>.
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°<sup>es</sup>.

**Remarque quant à la réserve**

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Demande internationale No. PCT/FR 02 00240

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-4, 6-13 et 18 portent sur des compositions comportant un marqueur de surface spécifique des cellules B IgM+IgD+CD27+. Cette définition recouvre un grand nombre de déterminants possibles alors qu'un fondement au sens de l'article 6 PCT ou un exposé au sens de l'article 5 PCT ne peut être trouvé que pour quelques marqueurs, ce qui ne permet pas une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux marqueurs CD21, CD1c et IgD associée au CD27, comme mentionnés à la revendication 5.

De même, la recherche concernant les revendications 14-17 a été limitée aux procédés portant sur la détection ou la quantification de l'un des marqueurs CD21, CD1c et IgD associée au CD27, comme mentionnés à la revendication 5.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No  
PCT/FR 02/00240

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9964603	A	16-12-1999	AU 4559499 A	30-12-1999
			CA 2331258 A1	16-12-1999
			EP 1086231 A2	28-03-2001
			JP 2002517249 T	18-06-2002
			WO 9964603 A2	16-12-1999
			US 6432679 B1	13-08-2002
			US 2002119529 A1	29-08-2002
			WO 9612190	A
US 5679347 A	21-10-1997			
US 6238676 B1	29-05-2001			
AT 212129 T	15-02-2002			
AU 694299 B2	16-07-1998			
AU 4277996 A	06-05-1996			
CA 2202680 A1	25-04-1996			
DE 69525058 D1	21-02-2002			
EP 1170592 A1	09-01-2002			
EP 0786088 A2	30-07-1997			
JP 10510142 T	06-10-1998			
WO 9612190 A2	25-04-1996			
US 2002009465 A1	24-01-2002			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100109162

弁理士 酒井 将行

(72)発明者 レノー, クロード - アグネス

フランス、エフ - 7 5 7 3 0 パリ、セデックス・1 5、リュ・ドゥ・ボジラル、1 5 6

(72)発明者 バイル, ジャン - クロード

フランス、エフ - 7 5 7 3 0 パリ、セデックス・1 5、リュ・ドゥ・ボジラル、1 5 6

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ03 QQ42 QR32 QR62 QS25 QS39

4C085 AA03 AA38 EE05 FF14 GG02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004529083A5</a>	公开(公告)日	2005-06-02
申请号	JP2002557416	申请日	2002-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	氛研究所芥蓝		
申请(专利权)人(译)	研究所 - Nekeru		
[标]发明人	レノークロードアグネス バイルジャンクロード		
发明人	レノー,クロード-アグネス バイル,ジャン-クロード		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/085 A61K39/095 A61K39/102 A61K39/39 A61P31/00 A61P37/00 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/095 A61K39/085 A61K39/102 A61K39/39 A61K2039/55516 A61K2039/55555 G01N33/56972 Y02A50/466		
FI分类号	A61K39/39 A61K39/00.Z C12Q1/02.ZNA C12Q1/68.A G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063 /QS25 4B063/QS39 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/EE05 4C085/FF14 4C085/GG02		
代理人(译)	森田俊夫 堀井裕 酒井 将行		
优先权	2001000834 2001-01-22 FR		
其他公开文献	JP2004529083A		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种药物组合物，其用于特异性刺激BM+D+CD27+细胞的亚群，以从所述细胞产生非T细胞依赖性抗菌反应。它涉及可接受载体中的免疫原性组合物。感染或易感染多糖细菌（链球菌，脑膜炎球菌，肺炎球菌或流感）或蛋白衣壳病毒（脊髓灰质炎病毒，脑心肌炎病毒，流感病毒）的患者的T细胞 它还涉及用于产生独立的抗菌免疫应答的用途。