

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6612258号
(P6612258)

(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)

(51) Int.Cl.	F I				
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N	33/53	Z N A Y		
CO 7 K 7/08 (2006.01)	CO 7 K	7/08			
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N	33/53	N		
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	GO 1 N	33/564	B		
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P	3/10			

請求項の数 11 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-564014 (P2016-564014)	(73) 特許権者	591100596
(86) (22) 出願日	平成27年4月21日 (2015.4.21)		アンステイチュ ナショナル ドウ ラ
(65) 公表番号	特表2017-519970 (P2017-519970A)		サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ
(43) 公表日	平成29年7月20日 (2017.7.20)		ディカル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/058588		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(87) 国際公開番号	W02015/162124		ユ・ドウ・トルビアック 101
(87) 国際公開日	平成27年10月29日 (2015.10.29)	(73) 特許権者	500026533
審査請求日	平成30年1月25日 (2018.1.25)		アンステイチュ・キュリ
(31) 優先権主張番号	14305595.2		INSTITUT CURIE
(32) 優先日	平成26年4月22日 (2014.4.22)		フランス国 05 セデクス パリー リ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ユ ドウ ルム 26

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の診断のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者が自己免疫疾患を有するか又は自己免疫疾患を有する若しくは発症するリスクがあるかどうかを決定するための、或いは、自己免疫疾患の重症度を評価する又は自己免疫疾患の転帰を予測するための *in vitro* 方法であって、患者から得られた生物学的サンプルにおける免疫抗 I L - 2 応答を検出又は定量する工程を含み、ここで 自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス (S L E)、関節リウマチ (R A)、シェーン グレン症候群 (S J O) 及び自己免疫性多発性筋炎 (J O 1) からなる群より選択される *in vitro* 方法。

【請求項2】

- 抗 I L - 2 自己抗体を産生する B 細胞；
- 抗 I L - 2 抗体；
- I L - 2 特異的 T 細胞

の1つ以上の検出又は定量によって、免疫抗 I L 2 応答が証明される、請求項1に記載の *in vitro* 方法。

【請求項3】

抗 I L - 2 自己抗体を産生する B 細胞又は抗 I L - 2 抗体の検出又は定量によって、免疫抗 I L 2 応答が証明され、該自己抗体が中和抗 I L - 2 自己抗体である、請求項1又は2に記載の *in vitro* 方法。

【請求項4】

患者が自己免疫疾患を有するか、又は自己免疫疾患を有する若しくは発症するリスクがあるかどうかを決定するための方法である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の in vitro 方法。

【請求項 5】

自己免疫疾患の重症度を評価するための方法である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の in vitro 方法。

【請求項 6】

自己免疫疾患の転帰を予測するための方法である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の in vitro 方法。

【請求項 7】

治療目的で外因性投与された IL - 2 に対する応答を予測 / 調整するための方法である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の in vitro 方法。

【請求項 8】

1 型糖尿病 (T 1 D)、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、シェーグレン症候群及び自己免疫性多発性筋炎患者の抗 IL 2 抗体又は IL - 2 特異的 T 細胞によって特異的に認識されるペプチドであって、アミノ酸配列が、
L T R M L T F K F Y M P K K A (配列番号 1)、又は
E F L N R W I T F S Q S I I S (配列番号 2)
からなる、ペプチド。

【請求項 9】

生物学的サンプルにおける T 細胞媒介性免疫応答を検出するための in vitro 方法であって、請求項 8 に記載のペプチドを検出に使用する、in vitro 方法。

【請求項 10】

ヒト又は動物の体の疾患の治療的処置の方法において使用するための、請求項 8 に記載のペプチドであって、
ヒト又は動物の体の疾患が、1 型糖尿病 (T 1 D)、全身性エリテマトーデス (S L E)、関節リウマチ (R A)、シェーグレン症候群 (S J O) 及び自己免疫性多発性筋炎 (J O 1) からなる群より選択される、ペプチド。

【請求項 11】

請求項 8 に記載のペプチドを有効成分として含み、そして、医薬賦形剤を含む、ヒト又は動物の体の疾患の治療的処置の方法において使用するための医薬組成物であって、
ヒト又は動物の体の疾患が、1 型糖尿病 (T 1 D)、全身性エリテマトーデス (S L E)、関節リウマチ (R A)、シェーグレン症候群 (S J O) 及び自己免疫性多発性筋炎 (J O 1) からなる群より選択される、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、自己免疫疾患の診断方法、ペプチド、及び自己免疫疾患の処置に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

1 型糖尿病 (T 1 D) の生理病理学は、調節性 T 細胞 (T r e g 細胞) ホメオスタシス及びそれ故に免疫寛容を損なうインターロイキン - 2 (I L - 2) 経路における複数の欠陥に係る。

【0003】

処置がより有効であり得る前駆症状の段階にの間に、有リスク被験体に提供され得る新規な免疫療法の数が増加している特に今日では、T 1 D を有するヒトにおいて、進行中の自己免疫の新規バイオマーカーの開発が早急に必要とされている。新規バイオマーカーは、T 1 D を発症する高いリスクのそのような個体をより良好に定義することを助けること

10

20

30

40

50

ができるだろう。

【0004】

今日、(T1Dの発症に先行する)IAA自己抗体(以下、自己抗体)の測定と、膵臓細胞に対する並びに感受性HLA-DQ8及びDQ2アレルの存在に対するT細胞応答とが、T1Dの診断に使用されている。

【0005】

特許文献1には、タンパク質マーカーのアディポネクチン及びレプチンのレベルを測定することによって、1型糖尿病と2型糖尿病とを区別するための組成物及び方法が記載されており、前記タンパク質マーカーは、1型糖尿病、2型糖尿病及び/又は糖尿病性障害を患っている患者のサンプルでは、コントロール被験体のサンプルと比較して、差次的に存在することが開示されている。特許文献1には、これらのタンパク質マーカーを検出することによって、1型糖尿病、2型糖尿病及び/又は糖尿病性障害の診断の補助として使用され得る方法及びキットも開示されている。患者サンプルにおけるこれらのタンパク質マーカーの単独又は組み合わせでの測定は、診断医が、1型糖尿病、2型糖尿病及び/又は糖尿病性障害の程度に関する推定診断と相関させ得る情報を提供する。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2005/094200号

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の概要

本発明者らは、中和能力を有する抗IL-2自己抗体(IL-2AAb)がT1Dに関連することを発見した。本発明者らは更に、T1Dだけではなく、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、シェーグレン症候群及び自己免疫性筋炎患者においても、IL-2自己抗体が高頻度で存在することを発見した。

【0008】

本発明者らはまた、T1Dでは、IL-2自己反応性T及びB細胞の存在によって証明されるように、IL-2に対する免疫寛容が喪失していることを観察した。

30

【0009】

本発明者らは更に、T1Dにおける自己反応性抗IL-2 T細胞応答が、主に1つの特定のエピトープに対するものであることを発見した。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の目的は、T1D及び他の自己免疫疾患の新規バイオマーカーを提供することである。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1a及びbはそれぞれ、ELISAによって測定した、異なる患者群における抗hIL-2 IgG自己抗体の血清力価、及び異なる患者群におけるhIL-2Aについて陽性的カットオフを確立するために、健常ドナーのプール及びT1D患者のプールを用いて行われる。パネルc及びdは、抗IL2自己抗体についてのELISAの結果を示し、図dは、ELISAによるIL-2自己抗体の定量実験におけるカットオフを決定するために使用したROC曲線を示す。

40

【図2】図2は、健常ドナー、T2D患者及び5つの自己免疫疾患において、ヒトIL-2を用いて実施した競合ELISAアッセイの結果を示す。結果は、ヒトIL-2の量に応じたELISAシグナル阻害の割合として表されている。

【図3】図3a及びbはそれぞれ、ELISPOTAッセイの結果を表す。細胞10⁶個当たりのIL-2特異的IgGスポットの数は、マウス(NOD又はB6)及び細胞組織

50

(脾臓又は骨髄)の性質の種類に応じて示されている。

【図4】図4 a及びbはそれぞれ、異なる患者群における抗hIL-2 IgG自己抗体の血清力価、及び異なる患者群におけるhIL-2 A陽性患者の割合を表す。

【図5】図5は、CBAによって測定した、IL-2由来ペプチドに応じた、脾細胞の上清中のIFN-g産生を表す。

【図6】図6は、ELISPOTアッセイの結果を表す。異なるIL-2ペプチド及び他のコントロールペプチドを用いたPBMCの刺激後における、バックグラウンド除去後のPBMC 10⁶個当たりのIFN-スポット形成細胞(SFC)の数が示されている。

【図7】図7は、ELISAアッセイにおける異なるマウス系統のIL-2/IL-2 A複合体の血清力価の結果を示す。 10

【図8】図8 a及びbは、多重粒子ベースのフローサイトメトリーによるIL-2自己抗体の定量の結果を示す。結果は、異なるマウス系統における、及び血清を様々な量のmIL-2と共にプレインキュベーションする競合アッセイにおける、蛍光強度として表されている。

【図9】図9は、中和アッセイにおけるIL-2自己抗体の中和能力の評価結果を示す。結果は、血清希釈の関数として、コントロールと比較したCTL-2細胞の増殖%として表されている。

【図10】図10は、増殖アッセイによるIL-2特異的T細胞の定量の結果を示す。

【図11】図11は、IL-2で刺激し、hIL-2 AAb-HD血清又はhIL-2 AAb+T1D血清と共にプレインキュベーションした調節性T細胞におけるSTAT5のリン酸化を示す。 20

【発明を実施するための形態】

【0012】

好ましい実施態様の説明

自己免疫疾患を有する患者、特にT1D、全身性エリテマトーデス及び関節リウマチ患者は、高頻度のIL-2 AAbを示す。したがって、hIL-2自己抗体は、このような疾患のバイオマーカーである。

【0013】

したがって、本出願の主題は、患者が自己免疫疾患を有するか、又は自己免疫疾患を有する若しくは発症するリスクがあるかどうかを決定するための、或いは、自己免疫疾患の重症度を評価するか又は自己免疫疾患の転帰を予測するためのin vitro方法であって、患者から得られた生物学的サンプルにおける免疫抗IL2応答を検出又は定量する工程を含む、in vitro方法である。 30

【0014】

免疫抗IL2応答は、

- 抗IL2自己抗体を産生するB細胞；
- 抗IL2抗体；
- IL-2特異的T細胞

の1つ以上の検出によって証明され得る。 40

【0015】

パラメータの好ましい組み合わせは、

- 抗IL2自己抗体を産生するB細胞と、抗IL2抗体、
- 抗IL2抗体と、IL-2特異的T細胞、並びに
- IL-2特異的T細胞と、抗IL2自己抗体を産生するB細胞

である。

【0016】

本出願の主題は、特に、患者が自己免疫疾患を有するか、又は自己免疫疾患を有する若しくは発症するリスクがあるかどうかをin vitroで決定するための方法であって、患者から得られた生物学的サンプルにおける自己抗体の存在を検出又は定量する工程を含み、該 50

自己抗体が抗 I L 2 自己抗体、特に中和抗 I L 2 自己抗体である、方法である。

【 0 0 1 7 】

例えば、治療的処置として I L 2 を受けている患者から得られた生物学的サンプルにおける中和抗 I L 2 自己抗体の存在の定量は、投与される I L 2 の量を調整し、I L 2 処置に対する患者の応答を予測することを可能にする。

【 0 0 1 8 】

本発明の別の主題は、患者における自己免疫疾患の転帰を予測するための方法であって、患者から得られた生物学的サンプルにおける自己抗体の存在を検出又は定量する工程を含み、該自己抗体が抗 I L 2 自己抗体、特に中和抗 I L 2 自己抗体である、方法である。

【 0 0 1 9 】

自己免疫疾患は、好ましくは、1型糖尿病 (T 1 D)、全身性エリテマトーデス (S L E)、関節リウマチ (R A)、シェーグレン症候群 (S J O) 及び多発性筋炎 (p o y m y o s i t i s) (J O 1) からなる群より選択され、特に1型糖尿病である。

【 0 0 2 0 】

本方法において使用され得るサンプルは、例えば、血漿、血清、全血、末梢血単核細胞 (P B M C)、サイタフェレーシス材料、脾臓細胞、リンパ節細胞及び骨髄、培養免疫細胞の上清 (s u p e r n a t a n t)、好ましくは血清及び P B M C である。

【 0 0 2 1 】

生物学的サンプルにおける抗 I L - 2 抗体を産生する B 細胞の存在の検出は、当技術分野で周知の方法 (例えば B 細胞 E L I S P O T) にしたがって、又はフローサイトメトリーによって、好ましくは B 細胞 E L I S P O T にしたがって、行われ得る。

【 0 0 2 2 】

生物学的サンプルにおける自己抗体の存在の検出は、当技術分野で周知の方法、例えば E L I S A、競合 E L I S A 又は改変した E L I S A (例えば、ビオチンにカップリングされたペプチド/タンパク質を使用するもの、又は I L - 2 / 抗 I L - 2 抗体複合体を検出するように改変されたもの)、I L - 2 応答性細胞、I L - 2 依存性細胞株を使用する I L - 2 中和、例えば C T L L - 2 ベースのアッセイ、多重粒子ベースのフローサイトメトリー、液相免疫沈降、電気化学発光、ラジオイムノアッセイ、及び好ましくは免疫酵素法によって行われ得る。

【 0 0 2 3 】

生物学的サンプルにおける抗 I L - 2 抗体を産生する B 細胞の存在の定量は、当技術分野で周知の方法 (例えば B 細胞 E L I S P O T) にしたがって又はフローサイトメトリーによって、行われ得る。

【 0 0 2 4 】

このような好ましい方法は、例えば、

- 患者のサンプル (有利には、P B M C) を提供し、B 細胞 E L I S P O T を実施して、抗 I L - 2 抗体を産生する B 細胞を測定することに存する。

【 0 0 2 5 】

生物学的サンプルにおける自己抗体の存在の定量はまた、E L I S A、競合 E L I S A 又は任意の改変した E L I S A (例えば、ビオチンにカップリングされたペプチド/タンパク質を使用するもの)、I L - 2 応答性細胞、I L - 2 依存性細胞株を使用する I L - 2 中和、例えば C T L L - 2 ベースのアッセイ、多重粒子ベースのフローサイトメトリー、液相免疫沈降、電気化学発光、ラジオイムノアッセイ等の当該分野で周知の方法、及び好ましくは免疫酵素法によって、行われ得る。

【 0 0 2 6 】

このような好ましい方法は、例えば、

- 患者のサンプル (有利には、血清) を提供し、E L I S A 試験を実施して、抗 I L - 2 抗体を測定すること

- サンプル (有利には、患者の血清) を提供し、競合 E L I S A 試験を実施して、抗 I L - 2 抗体を測定すること

10

20

30

40

50

- サンプル（有利には、患者の血清）を提供し、IL-2 / 抗IL-2 抗体免疫複合体を測定するように設計されたELISAを実施すること
 - サンプル（有利には、患者の血清）を提供し、多重粒子ベースのフローサイトメトリー試験を実施して、抗IL-2 抗体を測定すること
 - サンプル（有利には、患者の血清）を提供し、IL-2 応答性細胞及び/又はIL-2 依存性細胞株を使用するIL-2 中和試験、例えばCTL-2 ベースのアッセイを実施して、抗IL-2 抗体の存在を評価すること
- に存する。

【0027】

本発明の目的はまた、治療目的で外因性投与されたIL-2 に対する応答を予測/調整するための方法であって、患者から得られた生物学的サンプルにおける免疫抗IL-2 応答を検出又は定量する工程を含む方法である。

【0028】

外因性投与されたIL-2（例えば、Proleukin（登録商標）など）に対する患者の応答を予測するために、前記方法は、好ましくは、

- 患者から得られた生物学的サンプルを提供すること
- 当技術分野で周知の方法、例えばELISA、競合ELISA又は任意の改変したELISA（例えば、ビオチンにカップリングされたペプチド/タンパク質を使用するもの）、IL-2 応答性細胞、IL-2 依存性細胞株を使用するIL-2 中和、例えばCTL-2 ベースのアッセイ、多重粒子ベースのフローサイトメトリー、液相免疫沈降、電気化学発光、ラジオイムノアッセイ、及び好ましくは免疫酵素法のいずれかを使用して、抗IL-2 抗体（自己抗体、又は外因性投与されたIL-2 に対して検出された抗体）の存在を検出すること
- 又は或いは、例えば、複合体を検出するための特定のELISA、又は複合体の解離工程を含むELISAを使用して、IL-2 / 抗IL-2 循環複合体の存在を検出すること

に存する工程を含み、

- 例えば前記技術のために確立されたカットオフよりもELISAによって得られたAUの値が高い、抗IL-2 抗体が存在する場合には、患者に投与すべきIL-2 の量を、所望の免疫応答に応じて適合すべきである。

【0029】

外因性投与されたIL-2 に対する処置された患者の応答を調整するために、前記方法は、好ましくは

- 処置された患者から得られた生物学的サンプルを提供すること
- 抗IL-2 抗体の存在を定量すること

に存する工程を含み、

- 抗IL-2 抗体が、各技術のために定義されたカットオフよりも高い場合には、投与されるIL-2 の量を増加させなければならず、反対に、IL-2 抗体がカットオフ値未満である場合には、投与されるIL-2 の量を改変してはならない。

【0030】

或いは、外因性投与されたIL-2 に対する処置された患者の応答を調整するために、すなわち調節性T細胞の割合を増加させるために低用量IL-2 を使用して、又は或いはNK及びCD8+ T細胞の割合を増加させるために高用量IL-2 を使用して、前記方法を所望の生物学的応答に適合させられるだろう。

【0031】

例えば、調節性T細胞の割合を増加させるためにIL-2 を投与する場合には、Tregの固定した増加（例えば、IL-2 投与後における血中の調節性T細胞の割合の20%の増加）を得るために、抗IL-2 抗体を有する患者において、投与されるIL-2 の量は調整されるべきである。このIL-2 用量調整から利益を受け得る処置の例は、低用量（8週間の 0.3×10^6 、 1×10^6 又は 3×10^6 IU/m²体表面、その後4週間の中

10

20

30

40

50

断)又は超低用量IL-2(5日間の 0.5×10^5 、 1×10^5 又は 2×10^5 IU/m²/日)でIL-2を投与する移植片対宿主病の処置であり得る;

【0032】

Tr egの割合の固定した増加を得るために、抗IL-2抗体を有する患者のIL-2投与が適合され得る処置の別の例は、T1D(5日間の(1×10^6 又は 3×10^6 IU/m²/日)でIL-2を投与し得る場合)又は自己免疫性血管炎(9日間又は16日間のウォッシュアウトによって隔てられた 3×10^6 IU/日の5日間の4サイクルとしてIL-2を投与し得る)である。

【0033】

前記方法は、好ましくは、

- 処置された患者から得られた生物学的サンプルを提供すること、抗IL-2抗体の存在を検出すること、IL-2を患者に注射すること、及び3回の毎日のIL-2注射後に得られる調節性T細胞の割合の増加に基づいて最適用量を規定することに存する工程を含むであろう。

【0034】

例えば、NK細胞又はCD8+T細胞の割合を増加させるためにIL-2を投与する場合には、これらの集団の固定した増加を得るために、抗IL-2抗体を有する患者において、投与されるIL-2の量を調整すべきである。このような処置の一例は、異なるスケジュールで、高用量でIL-2を投与する(例えば:最大14回の用量で15分間の静脈内注入によって8時間ごとに 6×10^5 IU/Kgで投与する)転移性メラノーマ又は腎細胞ガンの処置である。

【0035】

前記方法は、好ましくは、

- 処置された患者から得られた生物学的サンプルを提供すること、抗IL-2抗体の存在を検出すること、IL-2を患者に注射すること、及び3回の毎日IL-2注射後に得られたNK細胞又はCD8+T細胞の割合の増加に基づいて最適な用量を規定することに存する工程を含むであろう。

【0036】

前述のように、本発明者らは更に、T1Dにおける自己反応性抗IL-2 T細胞応答が任意のIL-2由来ペプチドに対するものであり、主に1つの特定のエピトープに対するものであることを発見した。

【0037】

これが、本発明の目的が、T1D、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、シェーグレン症候群及び自己免疫性多発性筋炎患者の抗IL2抗体又はIL-2特異的T細胞によって特異的に認識される任意のペプチドであって、IL-2に由来し、特に式I



(式中、

R1は、N末端アミノ酸の遊離又は置換第一級アミノ官能基を表し、

R2は、C末端アミノ酸のカルボキシル官能基の遊離又は置換ヒドロキシル基を表す)のIL-2由来ペプチドであるペプチドを含む理由である。

【0038】

本明細書で使用される用語「ペプチド」は、少なくとも6個のアミノ酸であって、50個未満のアミノ酸、好ましくは40個未満のアミノ酸、より好ましくは30個未満のアミノ酸、特に25個未満のアミノ酸、より具体的には20個未満のアミノ酸を有するアミノ酸配列を有するアミノ酸産物を指す。

【0039】

本発明の目的はまた、このようなペプチドの機能保存的変異体を含む。

【0040】

本明細書で使用される「機能保存的変異体」は、ペプチドの全体的なコンフォメーション及び機能の変化を伴わずに(上記を参照のこと)、ペプチドの所定のアミノ酸残基が変

10

20

30

40

50

更（挿入、欠失又は置換）されているものを指す。このような変異体は、欠失、挿入及び／又は置換などのアミノ酸変化を有するペプチドを含む。「欠失」は、ペプチドにおける１個以上のアミノ酸の欠如を指す。「挿入」は、ペプチドにおける１個以上のアミノ酸の付加を指す。「置換」は、ペプチドにおける別のアミノ酸残基による１個以上のアミノ酸の置換を指す。

【 0 0 4 1 】

典型的には、所定のアミノ酸は、類似の特性（例えば、極性、水素結合ポテンシャル、酸性、塩基性、疎水性、芳香族など）を有するアミノ酸で置換される。保存的と示されているもの以外のアミノ酸はペプチドが異なり得るので、類似の機能の任意の２つのペプチド間のタンパク質又はアミノ酸配列類似性の割合は変動し得、例えば、アライメントスキーム（例えば、類似性がMEGALIGNアルゴリズムに基づくクラスタ法）にしたがって決定した場合に 70% ~ 90% であり得る。「機能保存的変異体」はまた、BLAST又はFASTAアルゴリズムによって決定した場合に少なくとも 60%、好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 85%、更に好ましくは少なくとも 90% のアミノ酸同一性を有するポリペプチドであって、それと比較されるネイティブなペプチド又は親ペプチドと同じ又は実質的に類似の特性又は機能を有するポリペプチドを含む。アミノ酸の 80% 超、好ましくは 85% 超、好ましくは 90% 超が同一であり、又はより短い配列の全長にわたって約 90% 超、好ましくは 95% 超が類似（機能的に同一）である場合、２つのアミノ酸配列は、「実質的に相同」又は「実質的に類似」である。好ましくは、類似配列又は相同配列は、例えば、GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) パイルアッププログラム、又は配列比較アルゴリズム、例えば B L A S T、F A S T A などのいずれかを使用してアラインメントによって同定される。

【 0 0 4 2 】

本発明の目的はまた、このようなペプチドの機能保存的の化学誘導体を含む。「機能保存的の化学誘導体」はまた、式 I のペプチドの好ましくは R 1 及び R 2 官能基で、又は側鎖アミノ若しくはカルボキシル官能基で化学的に改変されたペプチドを含む。

【 0 0 4 3 】

本発明の好ましいペプチドは、

- L T R M L T F K F Y M P K K A 配列番号 : 1
- E F L N R W I T F S Q S I I S 配列番号 : 2

又はこのようなペプチドの機能保存的変異体である。

【 0 0 4 4 】

変異体に関して、免疫学の当業者に公知のように、天然ペプチド鎖の改変が可能であるが、しかしながら、免疫原性ペプチドの免疫学的特性の性質は改変しない。したがって、前述のように、ネイティブなペプチドのこのエピトープ部位の免疫学的特性を保持しつつ、これらの天然配列と高度に相同な I L - 2 ペプチドの誘導体も挙げられ得る。それらの相同性領域は、5 ~ 40 残基、例えば 8 ~ 40 残基又は 8 ~ 35 残基、好ましくは 10 ~ 35 残基、しかし 12 ~ 35 残基、特に 12 ~ 30 残基、具体的には 15 ~ 30 残基、より具体的には 15 ~ 25 残基で変動し得る。

【 0 0 4 5 】

改変が免疫原性を相当には減少させないことを条件に、化学基（メチル、アセチルなど）を付加することによって、又は立体化学的改変（D型アミノ酸の使用）によって、I L - 2 ペプチド誘導体は、改変残基を含有し得る。サイトカインペプチド誘導体は、I L - 2 ペプチドのように、I L - 2 と相互作用する抗体を誘導すべきである。

【 0 0 4 6 】

本発明の I L - 2 ペプチド誘導体は、それらを構成するアミノ酸において１つ以上の改変、例えば１個以上のアミノ酸の欠失、置換、付加又は官能化（例えば、アシル化）を、これらの改変が上述の枠組み（免疫学的特徴）内にとどまる程度まで含み得る。例えば、一般に、イソロイシン残基によるロイシン残基の置換は、このような特性を改変しない；

10

20

30

40

50

改変は、一般に、アミノ酸の40%未満、特に30%未満、好ましくは20%未満、特に具体的には天然ペプチドのアミノ酸の10%未満に関するべきである。改変ペプチドによって誘導される抗体は、ネイティブなサイトカインに対して活性であることが重要である。

【0047】

これらの改変は当業者の範囲内であり、当業者であれば、簡単な試験によって改変の発生を確認し得る。このような改変誘導体の免疫原性は、マウスの免疫化後にELISA (ELISAによって試験される抗原は、サイトカイン全体又は免疫サイトカインペプチドである)によって、又はサイトカインレセプター結合遮断試験によって、評価され得る。可能な改変は、好ましくは、8個未満のアミノ酸、有利には6個未満のアミノ酸、具体的には4個未満のアミノ酸、特に3個以下のアミノ酸、例えば2個又は1個の単一アミノ酸に影響を与える。

10

【0048】

本発明の主題はまた、少なくとも1つの上記サイトカインペプチド又はサイトカインペプチド誘導体を含むことを特徴とする化合物である。このような化合物は、線状形態で、若しくは枝付き燭台構造の形態で、又は担体タンパク質と混合カップリングされて、同一のペプチド/誘導体の繰り返し、又は異なるペプチド/誘導体の組み合わせを含み得る。このような化合物はまた、環化形態で提供され得る。したがって、本発明のIL-2ペプチド又はIL-2ペプチド誘導体は、例えば、特に良好なコンフォメーションを提供するより長いアミノ酸配列に挿入され得るか、又は外因性Tエピトープと組み合わされて得る(タンパク質又はDNA免疫化にかかわらず)。

20

【0049】

それらは、有利には、例えばKLHなどの担体タンパク質と共有様式で連結され得る。

【0050】

本発明のこれらのIL-2ペプチド又はIL-2誘導体は、天然IL-2の他のエピトープとの相同性を含まない任意のタンパク質配列に含められ得る。例えば、それらは、環状構造をペプチドに付与するためにシステインが末端に単に付加されたレセプターに結合する部位であり得る。別の例は、破傷風毒素のTエピトープの配列によって囲まれたペプチドである。更に別の例は、レセプター結合部位の配列に対応するペプチドを含み得るが、それらのアゴニスト効果を回避するために、特定のアミノ酸がそれらのD型異性体によって置換されている。

30

【0051】

免疫応答を増加させるために、本発明のIL-2ペプチド又はIL-2誘導体は、担体タンパク質にカップリングされ得る。考えられるカップリング方法及び担体タンパク質は、ターゲットペプチドに応じて異なり得る：それらは、例えば、当業者に周知の化学的方法、例えばカルボジイミド、グルタルアルデヒド又はビス-ジアゾ化ベンジジンカップリングによるものによってペプチドにコンジュゲートされたキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)タンパク質及び破傷風トキソイド(TT)であり得る。これらのカップリングの実施は、例えばリジン、ヒスチジン、チロシン又はシステイン残基などのアミノ酸を配列に付加又は組み込むことによって容易になり得る。化学的又は遺伝学的にかかわらず、(熱帯熱マラリア原虫、KLHなどに由来する)外因性Tエピトープにカップリングされたこのようなペプチド化合物もまた、本発明の範囲内である。

40

【0052】

本発明のペプチドは、特に、化学合成又は遺伝子工学又は任意の他の適切な方法によって生産され得る。ジスルフィド架橋を作るために、システインのような1個以上のアミノ酸を鎖の末端に必要な応じてグラフトする環状ペプチドの合成により、これらのペプチドフラグメントがタンパク質の三次元構造中に有する二次構造の部分に戻ることが可能となる。

【0053】

本発明のペプチドは、有利な特性を有する。それらは、T細胞によって特異的に認識される。したがって、それらは、T細胞によって媒介される進行中の免疫応答を検出するた

50

めに使用され得る。それらはまた、ヒトにおいて臨床目的に使用されるネイティブな形態又は突然変異 I L - 2 形態の I L - 2 に対する寛容を誘導するために使用され得る。これらの特性は、実験の部において以下に説明される。それらは、薬物としての上記本発明のペプチドの使用を正当化する。

【 0 0 5 4 】

それらは、患者由来の I L - 2 抗体を生成するためのワクチンとして特に使用され得る。

【 0 0 5 5 】

本発明の好ましいペプチドは、

- L T R M L T F K F Y M P K K A 配列番号 : 1

- E F L N R W I T F S Q S I I S 配列番号 : 2

又はこのようなペプチドの機能保存的変異体である。

【 0 0 5 6 】

生物学的サンプルにおける当該ペプチド特異的 T 細胞の存在の検出は、当技術分野で周知の方法、例えば *in vitro* における当該ペプチドとの遭遇時の T 活性化の測定によって行われ得る。T 細胞活性化の測定は、チミジン取り込みによる T 細胞増殖の測定、又は E L I S A、ルミネックス若しくはフローサイトメトリーによるサイトカイン産生の測定などの方法によって行われ得る。

【 0 0 5 7 】

生物学的サンプルにおける I L - 2 特異的 T 細胞の存在の定量は、当技術分野で周知の方法、例えばチミジン取り込みによる T 細胞増殖の測定、又は E L I S P O T、E L I S A、ルミネックス若しくはフローサイトメトリーによるサイトカイン産生の測定によって行われ得る。

【 0 0 5 8 】

このような好ましい方法は、例えば、

- 患者のサンプル（有利には、P B M C）を提供し、I L - 2 配列由来ペプチドのライブラリーを使用して *in vitro* T 細胞活性化アッセイを実施し、E L I S P O T によって I F N - g 産生を測定すること

- 患者のサンプル（有利には、P B M C）を提供し、I L - 2 配列由来ペプチドのライブラリーを使用して *in vitro* T 細胞活性化アッセイを実施し、サイトメトリービーズアレイ（C B A）によって I F N - g 産生を測定すること

- 患者のサンプル（有利には、P B M C）を提供し、I L - 2 配列由来ペプチドのライブラリーを使用して *in vitro* T 細胞活性化アッセイを実施し、チミジン取り込みを測定すること

に存する。

【 0 0 5 9 】

本発明はまた、ヒト又は動物の体の治療的処置の方法において（すなわち、薬物として）使用するための、任意の I L - 2 由来ペプチドであって、T 1 D、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、シェーグレン症候群及び自己免疫性多発性筋炎患者の抗 I L 2 抗体又は I L - 2 特異的 T 細胞によって特異的に認識され、特に、式 I

R 1 - L T R M L T F K F Y M P K K A - R 2 (I)

（式中、

R 1 は、N 末端アミノ酸の遊離又は置換第一級アミノ官能基を表し、

R 2 は、C 末端アミノ酸のカルボキシル官能基の遊離又は置換ヒドロキシル基を表す）の I L - 2 由来ペプチドであるペプチド

並びにこのようなペプチドの機能保存的変異体に関する。

【 0 0 6 0 】

本発明の好ましいペプチドは、

- L T R M L T F K F Y M P K K A 配列番号 : 1

- E F L N R W I T F S Q S I I S 配列番号 : 2

10

20

30

40

50

又はこのようなペプチドの機能保存的変異体である。

【0061】

より具体的には、IL-2タンパク質又はIL-2由来ペプチド又はそれらの機能保存的変異体、好ましくはIL-2由来ペプチド又はその機能保存的変異体は、ネイティブな形態又は突然変異IL-2形態のIL-2に対する寛容を誘導する臨床目的で使用され得る。

【0062】

これらの特性及び用途はまた、医薬組成物における上記本発明のペプチドの使用を正当化する。

【0063】

医薬として、本発明のIL-2ペプチド又はIL-2誘導体は、ワクチン分野で使用される任意の標準経路（特に、皮下経路による、筋肉内経路による、静脈内経路による又は経口経路による）を意図する医薬組成物に組み込まれ得る。投与は、単回投与で、又はある期間後に1回以上繰り返して、行われ得る。

【0064】

本発明の新規医薬組成物、特にワクチンは、有効量の少なくとも1つのIL-2ペプチド又は好ましくは式Iのペプチド又はそれらの機能保存的変異体と、不活性医薬担体又は賦形剤とから構成される。

【0065】

本出願の主題はまた、有効成分として1つ以上の上記IL-2ペプチド又はIL-2誘導体を含むことを特徴とする治癒的医薬組成物又は予防的医薬組成物である。

【0066】

免疫原性剤は単独でコンディショニングされ得るか、又は賦形剤と混合され得るか、又はアジュバントとしての薬学的に許容し得る賦形剤と混合され得る。本出願の主題は、より具体的には、免疫原として上記IL-2ペプチド又はIL-2誘導体を含有するワクチンである。

【0067】

本発明の主題はまた、上記組成物を調製するための方法であって、自体公知の方法にしたがって、有効成分又は成分を、許容し得る（特に、薬学的に許容し得る）賦形剤と混合することを特徴とする方法である。

【0068】

本発明の新規組成物は、IL-2に対する寛容を誘導するために使用され得るので、例えば、免疫媒介性疾患の治癒処置及び予防処置の両方において、例えば自己免疫疾患の処置において、及び炎症性疾患の処置において有用である。それらはまた、T1Dの処置において、及びSLEの治療において使用され得る。それらはまた、RA、SJO、JO-1、MSの処置において使用され得る。

【0069】

通常の用量は、被験体及び問題の症状に応じて変化するが、例えば、RA、SJO、JO-1、MSの処置の場合には、ペプチドLTRMLTFKFYMPKKA（配列番号：1）の1～1000µg、特に10～500µgを、皮下経路によって3カ月間月1回、その後、誘導された血清抗体の数の関数として定期的に、例えば2～6カ月ごとであり得る。

【0070】

これが、本発明の目的が、自己免疫疾患の治療的処置の方法において及び炎症性疾患の処置において使用するための、任意のIL-2由来ペプチドであって、T1D、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、シェーグレン症候群及び自己免疫性多発性筋炎患者の抗IL-2抗体又はIL-2特異的T細胞によって特異的に認識され、特に、式I



（式中、

R1は、N末端アミノ酸の遊離又は置換第一級アミノ官能基を表し、

10

20

30

40

50

R 2 は、C 末端アミノ酸のカルボキシル官能基の遊離又は置換ヒドロキシル基を表す) の I L - 2 由来ペプチドであるペプチド
並びにこのようなペプチドの機能保存的変異体でもある理由である。

【 0 0 7 1 】

自己免疫疾患は、好ましくは、T 1 D 及び S L E である。本発明のペプチドはまた、R A、S J O、J O - 1 及び M S の処置において使用され得る。

【 0 0 7 2 】

本発明の好ましいペプチドは、

- L T R M L T F K F Y M P K K A 配列番号： 1
- E F L N R W I T F S Q S I I S 配列番号： 2

である。

【 0 0 7 3 】

抗 I L 2 抗体又は自己抗体を産生する B 細胞は、抗 I L - 2 抗体の製造に使用され得る。当該抗 I L - 2 抗体は、前述のように、研究、診断、又は臨床用途に使用され得る。

【 0 0 7 4 】

抗 I L 2 抗体は、標準的な方法、例えば、対応する B 細胞クローンを不死化し、ハイブリドーマによって産生される抗 I L 2 抗体を回収することによって、又は抗 I L 2 抗体若しくは抗 I L - 2 自己抗体を産生する B 細胞を有する被験体から得られる D N A 産物に基づいてリコンビナント抗体を作製することによって製造され得る。

【 0 0 7 5 】

したがって、本発明の更なる目的は、上記診断用途又は臨床用途における、上記方法にしたがって得られる抗 I L - 2 抗体又は自己抗体の使用である。

【 0 0 7 6 】

以下の実施例は、本発明を例証する。

【 0 0 7 7 】

上記方法を行うための好ましい条件もまた、想定される上記本発明の他の主題に適用される。

【 0 0 7 8 】

以下の実施例を参照することによって、本発明の範囲をより良く理解することができ、以下の実施例の目的は、本発明の利点を説明することである。

【 実施例 】

【 0 0 7 9 】

実験データ

使用したヒト血清及び血漿サンプルを以下に説明する。

【 0 0 8 0 】

1 . 血清サンプルは、健常ドナー (H D ; n = 2 4 9) 及び 2 型糖尿病 (T 2 D ; n = 2 4)、1 型糖尿病 (T 1 D ; コホート 1 は n = 3 9、コホート 2 は n = 1 5 及びコホート 3 は n = 2 1) を患っている患者から得た。

【 0 0 8 1 】

成人健常ドナー、T 2 D 又は T 1 D (コホート 1) 患者は、地域倫理ガイドラインにしたがって、パリ (フランス) の Diabetology Unit of the Pitie Salpetriere Hospital で募集した。健常ドナー及び T 1 D (コホート 2) 患者由来の血清サンプルは、D A S P プログラム (http://www.cdc.gov/labstandards/diabetes_dasp.html) によって提供された。コホート 3 からの健常ドナー及び T 1 D 患者は、地域倫理ガイドラインにしたがって、ミラノ (イタリア) の San Raffaele Institute で募集した。最終分析では、成人 T 1 D 患者のみが含まれていた。

【 0 0 8 2 】

2 . 異なる炎症性 / 自己免疫疾患を患っている患者に対応する健常ドナーは、ルーアン (フランス) の INSERM U905 で募集した。このコホートには、確立された分類基準にしたがって、患者を分類した：抗 d s D N A 自己抗体を有する S L E の場合には ACR 改訂基準

10

20

30

40

50

、抗CCP抗体及び/又はリウマチ因子を有するRAの場合にはARA基準、抗SSA及び/又は抗SSB自己抗体を有する一次シェーグレン症候群の場合には改訂欧州基準、抗tRNAシテターゼJo-1自己抗体を有する重複筋炎の場合にはTrojanov基準、並びに前記。

【0083】

2005 McDonald基準によるMS及びEFNS基準による慢性炎症性脱髄性多発神経障害(CIDP)を患っている患者は、クレティユ(フランス)のHenri Mondor Hospital/UPEC Universityで募集した。MSの再発の場合にはメチルプレドニゾロン(methylprednisolone)の開始前に、及びCIDPの場合には静脈内免疫グロブリン処置の開始前に、血清を採取した。この後ろ向き研究は、倫理基準委員会の承認を受け、フランスの基準にしたがって研究のために匿名データを収集することを患者に通知した。

10

【0084】

異なるガン(メラノーマ、頭頸部、肺、結腸直腸又は乳房)を患っている患者由来の血清は、地域倫理ガイドラインにしたがって、Curie Institut Paris (Dr. S. Saada)のCentre de Ressources Biologiquesから得た。

【0085】

全ての血清サンプルを使用まで-20又は-80に維持した。

【0086】

実施例1. ヒト血清及び血漿サンプルにおける抗ヒトIL-2自己抗体の定量 - 糖尿病

hIL-2 AAbの血清力価をELISAによって評価した。マイクロタイター96ウェルプレート(Medisorp, Nunc)を、 10^5 IU/ml hIL-2を含有する $100 \mu\text{l}$ /ウェルのカーボネートコーティング緩衝液(「IL-2コーティングウェル」)又は緩衝液のみ(「非コーティングウェル」、ブランク)と共に4で一晚インキュベーションした。PBS/2%BSAで2時間ブロッキングした後、プレートを、連続希釈血清サンプル $50 \mu\text{l}$ と共に室温で2時間インキュベーションした。PBS/0.1%Tween20で十分に洗浄した後、HRP結合抗ヒトIgG(1:2,000;Dako)を各ウェルに追加し、プレートを室温で1時間維持した。前述のようにTMB基質を用いて、ペルオキシダーゼ活性を測定した。HRP結合ヤギ抗ラットIgで明らかにした2倍連続希釈のラット抗ヒトIL-2(クローンMQ1-17H12, eBioscience)を使用して、標準曲線を作成した。ブランクの控除後に得られたO.D.値を使用して、各サンプルの任意単位を計算した。ヒト競合アッセイには、hIL-2 AAb-健常ドナー又はhIL-2 AAb+患者由来の血清(1/100、1/200又は1/300希釈)を、漸増濃度のhIL-2と共に室温で1時間プレインキュベーションした。次いで、サンプルをELISAプレートに追加し、プレートを上記のように処理した。

20

30

【0087】

結果:

異なる患者群における抗hIL-2 IgGの血清力価及び異なる患者群におけるhIL-2 A陽性患者の割合の結果を図1a及び1bに示す(実施例の図5a、b)。左のグラフの破線は、陽性の閾値を示す。記号は個々の被験者を表し、横方向のバーは中央値である。* * $P < 0.01$; * * * $P < 0.001$ (フィッシャーの直接確率検定)。hIL-2 AAbを定量するELISA試験には、本発明者らは、95%の特異性で健常ドナーとT1D被験者とを識別することを可能にする、陽性の閾値を24.3 AUの値に固定した。患者としてコホート1、2及び3のT1D被験者($n = 75$);並びにコントロールとしてこれらのコホートの健常ドナー($n = 103$)を使用して、95%信頼区間のROC曲線を用いて、このカットオフを計算した(図1c~d)。

40

【0088】

健常ドナー(4.4%)及びT2D患者(4.2%)において観察された低い割合と比較して、有意に高い割合のT1D患者由来の血清がhIL-2 AAb+であった(それぞれコホート1、2及び3では23.1、33.3及び23.8%)。

【0089】

50

結論

異なるコホート間の抗hIL-2陽性被験者の割合の結果(右のグラフ)は、1型糖尿病では、IL-2自己抗体が高頻度で存在していることを証明している。

【0090】

したがって、抗hIL-2抗体を1型糖尿病のマーカーとして使用し得る。

【0091】

実施例2. ヒトIL-2 Elisa競合アッセイ

マイクロタイター96ウェルプレート(Medisorp, Nunc)を、 10^5 IU/ml hIL-2を含有する100 μ l/ウェルのカーボネートコーティング緩衝液(「IL-2コーティングウェル」)又は緩衝液のみ(「非コーティングウェル」、ブランク)と共に4で一晚インキュベーションした。PBS/2%BSAで2時間ブロッキングした後、プレートを、漸増濃度のhIL-2と共に室温で1時間プレインキュベーションした又はプレインキュベーションしなかった連続希釈血清サンプル50 μ lと共に室温で2時間インキュベーションした。PBS/0.1%Tween 20で十分に洗浄した後、HRP結合抗ヒトIgG(1:2,000;Dako)を各ウェルに追加し、プレートを室温で1時間維持した。前述のようにTMB基質を用いて、ペルオキシダーゼ活性を測定した。HRP結合ヤギ抗ラットIgで明らかにした2倍連続希釈のラット抗ヒトIL-2(クローンMQ1-17H12、eBioscience)を使用して、標準曲線を作成した。ブランクの控除後に得られたO.D.値を使用して、各サンプルの任意単位を計算した。

【0092】

結果を図2に示す。

【0093】

結果は、1型糖尿病、全身性エリテマトーデス及び関節リウマチでは、発色基質のELISAシグナルがhIL-2用量依存的パターンに従い減少することを証明している。したがって、この抗体は、IL-2特異的である。

【0094】

実施例3. マウスによる抗IL-2自己抗体を産生するB細胞の検出 - Elispot

35%エタノールで活性化した後、96ウェルPVD Fプレート(MAIP4510, Millipore)を、70 μ L/ウェルの5 μ g/mL mIL-2(Peprotech)によって4で一晚コーティングした。PBSで洗浄した後、プレートを、無タンパク質ブロッキング緩衝液(Thermo)によって室温で1時間ブロッキングし、次いで、完全RPMI培地によって室温で30分間ブロッキングした。10~18週齢の雌性B6又はNODマウス由来の連続希釈脾臓細胞又は骨髓細胞(完全RPMI培地中、1ウェル当たり細胞 $5 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$ 個)をELISPOTプレートに追加した。一連の実験では、10~18週齢の雌性B6又はNODマウス由来の脾臓細胞を、10 μ g/mL CpG-ODN 1018を含む完全RPMI培地中、細胞 1×10^6 個/mLで6日間培養して、記憶B細胞を増殖させた。次いで、連続希釈CpG前活性化脾細胞(1ウェル当たり細胞 $5 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$ 個)をELISPOTプレートに追加した。18時間培養した後、プレートをPBS/0.25%Tween-20で3回洗浄し、PBSで3回洗浄し、次いで、PBS/2%BSAで希釈したアルカリホスファターゼ-抗マウス-IgG(1:1,000;Sigma-Aldrich)と共に室温で2時間インキュベーションした。次いで、プレートを洗浄し、100 μ L/ウェルの基質(Bio-Rad)を追加して、ホスファターゼ活性を測定した。15分間インキュベーションした後、水道水で十分に洗浄することによって、反応をブロックした。AIDカメラを用いて、スポットをカウントした。

【0095】

結果を図3a及び3bに示す。

【0096】

抗IL-2抗体を産生するBリンパ球は、NODマウスにおいてのみ検出される。

【0097】

結論

10

20

30

40

50

上記結果は、B細胞による抗IL-2抗体の産生を検出するために、ヒトでは、B細胞ELISPOTなどの技術を使用し得ることを証明している。

【0098】

実施例4．ヒト血清及び血漿サンプルにおける抗ヒトIL-2自己抗体の定量 - 他の自己免疫疾患。

血清サンプルは、健常ドナー（HD、n = 249）、T1D（プールした3つのコホートにおいて、n = 75）、多発性硬化症（MS；n = 33）、シェーグレン症候群（SJO；n = 22）、抗JO1陽性多発性筋炎（JO1；n = 16）、関節リウマチ（RA；n = 33）、全身性エリテマトーデス（SLE；n = 20）、慢性炎症性脱髄性多発神経障害（CIPD；n = 51）及びガン（ガン；n = 128）患者から得た。（a）異なるコホートにおける抗hIL-2 IgGの血清力価。破線は、陽性の閾値（実施例1と同じ値に設定）を示す。（b）異なるコホート間の抗hIL-2陽性被験者の割合。記号は個々の被験者を表し、横方向のバーは中央値である。* P < 0.05；*** P < 0.001（フィッシャーの直接確率検定）。

10

【0099】

結果を図4に示す。

【0100】

グラフは両方とも、T1D患者と同様に、SLE、RA、SJO及びJO-1患者が高頻度のhIL-2 AAbを示すことを示している。

【0101】

20

結論

SLE、RA、SJO及びJO-1を有する患者は高頻度のhIL-2 Aを示すので、上記結果は、hIL-2 Aがこのような疾患のバイオマーカーであることを証明している。

【0102】

実施例5．CBAによるIL-2特異的T細胞の定量

DMSO、mIL-2ペプチド（これは、最初のスクリーニングにおいて陽性応答をもたらした）（3及び10 µmol/Lの各ペプチド）、P31ペプチド（3及び10 µmol/L）又はaCD3-CD28コーティングビーズ（1ビーズ：1細胞の比）で72時間刺激した後、10～18週齢の雌性B6（n = 3）又は前糖尿病NOD（n = 7）の脾臓細胞によるIFN-g産生を、CBAによって培養上清中で定量した。記号は、個々のマウスを表す。データは、2回の独立した実験の累積である。

30

【0103】

結果を図5に示す。

【0104】

結果は、mIL-2配列由来の2つのペプチドのみが、B6の脾細胞ではなくNODの脾細胞によるIFN-g産生を誘導し得ることを示している。

【0105】

結論

NODマウスは、（2つの異なるペプチドに対して反応性の）IL-2特異的T細胞を示すので、上記結果は、（IL-2ペプチドによる再刺激後にIFN-g CBAによって検出される）IL-2特異的T細胞をT1Dのバイオマーカーとして使用し得ることを証明している。

40

【0106】

実施例6．ELISPOTによるIL-2特異的T細胞の定量

以下のヒトIL-2ペプチドのライブラリーを調製した：21。

【0107】

【表 1】

ペプチドID	配列
hIL-2 ₁₋₁₅	MYRMQLLSICIALSLA
hIL-2 ₆₋₂₀	LLSCIALSLALVTNS
hIL-2 ₁₁₋₂₅	ALSLALVTNSAPTSS
hIL-2 ₁₆₋₃₀	LVTNSAPTSSSTKKT
hIL-2 ₂₁₋₃₅	APTSSSTKKTQLQLE
Pro ₁₋₁₅	MPTSSSTKKTQLQLE
hIL-2 ₂₆₋₄₀	STKKTQLQLEHLLLD
hIL-2 ₃₁₋₄₅	QLQLEHLLLDLQMIL
hIL-2 ₃₆₋₅₀	HLLLDLQMILNGINN
hIL-2 ₄₁₋₅₅	LQMILNGINNYKNPK
hIL-2 ₄₆₋₆₀	NGINNYKNPKLTRML
hIL-2 ₅₁₋₆₅	YKNPKLTRMLTFKFY
hIL-2 ₅₆₋₇₀	LTRMLTFKFYMPKKA
hIL-2 ₆₁₋₇₅	TFKFYMPKKATELKH
hIL-2 ₆₆₋₈₀	MPKKATELKHLQCLE
hIL-2 ₇₁₋₈₅	TEKHLQCLEEELKP
hIL-2 ₇₆₋₉₀	LQCLEEELKPLEEVL
hIL-2 ₈₁₋₉₅	EELKPLEEVLNLAQS

ペプチドID	配列
hIL-2 ₈₆₋₁₀₀	LEEVLNLAQSKNFHL
hIL-2 ₉₁₋₁₀₅	NLAQSKNFHLRPRDL
hIL-2 ₉₆₋₁₁₀	KNFHLRPRDLISNIN
hIL-2 ₁₀₁₋₁₁₅	RPRDLISNINVIVLE
hIL-2 ₁₀₆₋₁₂₀	ISNINVIVLELKGSE
hIL-2 ₁₁₁₋₁₂₅	VIVLELKGSETTFMC
hIL-2 ₁₁₆₋₁₃₀	LKGSETTFMCEYADE
hIL-2 ₁₂₁₋₁₃₅	TTFMCEYADETATIV
hIL-2 ₁₂₆₋₁₄₀	EYADETATIVEFLNR
hIL-2 ₁₃₁₋₁₄₅	TATIVEFLNRWITFC
Pro ₁₁₁₋₁₂₅	TATIVEFLNRWITFS
hIL-2 ₁₃₆₋₁₅₀	EFLNRWITFCQSIIS
Pro ₁₁₆₋₁₃₀	EFLNRWITFSQSIIS
hIL-2 ₁₄₁₋₁₅₃	WITFCQSIISTLT
Pro ₁₂₁₋₁₃₃	WITFSQSIISTLT
hIL-2 ₁₃₉₋₁₅₃	NRWITFCQSIISTLT
Pro ₁₂₉₋₁₃₃	NRWITFSQSIISTLT

10

20

【 0 1 0 8 】

h I L - 2 又は Proleukin (P r o) ペプチド (1 0 μ M / 各) (これは、最初のプールスクリーニングにおいて陽性応答をもたらした)、細胞内 I A - 2、アデノウイルス溶解物 (A d V) 又は P H A で刺激した後、H D (n = 1 4、黒丸) 又は T 1 D 患者 (n = 1 3、白丸) 由来の P B M C による I F N - g 産生を、E L I S P O T によって定量した。P B M C 1 0 ⁶ 個当たりの I F N - g スポット形成細胞 (S F C) の数を示し、破線は陽性カットオフを示し、灰色の領域は検出不可能な応答 (すなわち、自然発生的なバックグラウンド応答と同一 ; 閾値決定の材料及び方法を参照のこと) を示す。陽性 T 1 D (上の数字) 及び H D (下の数字) の割合を各条件について示し、H D 患者と T 1 D 患者との間で有意に異なる応答をもたらす抗原は太字である (フィッシャーの直接確率検定により P < 0 . 0 3) 。

30

【 0 1 0 9 】

結果を図 6 に示す。

【 0 1 1 0 】

結果は、h I L - 2 配列由来の 1 つのペプチドのみが、H D P B M C ではなく T 1 D P B M C による I F N - g 産生を誘導し得ることを示している。

【 0 1 1 1 】

結果はまた、Proleukin (登録商標) タンパク質の h I L - 2 配列由来のペプチド E F L N R W I T F S Q S I I S (P r o 1 1 6 - 1 3 0 と略す) が、H D P B M C と比較して有意に高頻度の T 1 D P B M C において I F N - g 産生を誘導し得ることを示している。

40

【 0 1 1 2 】

結論

T 1 D 患者は、(1 つのペプチドに対して特異的ではなく多くに対して反応性の) I L - 2 特異的 T 細胞を示すので、上記結果は、(I L - 2 ペプチドによる再刺激後に I F N g E L I S P O T によって検出される) I L - 2 特異的 T 細胞を T 1 D のバイオマーカーとして使用し得ることを証明している。

50

【 0 1 1 3 】

加えて、外因性投与された I L - 2 (この特定の場合にはProleukin) に対する免疫応答を検出するために、h I L - 2 配列由来のペプチド E F L N R W I T F S Q S I I S などのペプチドを使用し得る。

【 0 1 1 4 】

実施例 7 . E L I S A による I L - 2 / I L - 2 A 免疫複合体の定量

マウスを後眼窩洞から採血し、I L - 2 / I L - 2 A A b 免疫複合体の血清力価を E L I S A によって定量した。マイクロタイター 9 6 ウェルプレート (Medisorp, Nunc) を、0 . 5 μg/mL ポリクローナル抗 m I L - 2 (PeproTech) を含有する 1 0 0 μl / ウェルのカーボネートコーティング緩衝液 (p H 9 . 6) と共に 4 で一晩インキュベーションした。P B S / 2 % B S A で 2 時間ブロッキングした後、プレートを、2 連の連続希釈血清 5 0 μl と共に室温で 2 時間インキュベーションした。P B S / 0 . 1 % T w e e n 2 0 で十分に洗浄した後、ビオチン標識抗マウス I g G (1 : 5 , 0 0 0 ; Southern Biotech) を各ウェルに追加し、プレートを室温で 1 時間維持した。続いて、プレートを、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 結合ストレプトアビジン (1 : 2 , 0 0 0 ; Invitrogen) と共に 3 0 分間インキュベーションし、続いて、T M B 基質 (eBioscience 又は BD Biosciences) と共に 1 0 分間インキュベーションした。反応を酸でブロックし、DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter) を用いて、吸光度を 4 5 0 nm で読み取った。

10

【 0 1 1 5 】

結果を図 7 に示す。

20

【 0 1 1 6 】

レジェンド

血清サンプルは、異なるマウス系統 (全てが年齢適合の雌) から得た : B 6、野生型 N O D、N O D . I d d 3 ^{B 6}、I 1 2 - 半接合 N O D : N O D . I d d 3 ^{N O D} / N O D - I L - 2 ^{n u 1 1} (N O D . I 1 2 ⁺ / -)。異なるマウス系統における I L - 2 / I L - 2 A A b 複合体の血清力価 (b)。記号は個々のマウスを表し、横方向のバーは中央値である。n s、非有意。* P < 0 . 0 5 ; ** P < 0 . 0 1 ; *** P < 0 . 0 0 1 (ノンパラメトリックマンホイットニー検定)。

【 0 1 1 7 】

図 1 0 に見られ得るように、N O D マウスは、B 6 マウスよりも高い力価の I L - 2 / I L - 2 A 免疫複合体を示す。

30

【 0 1 1 8 】

結論 :

N O D は、(E L I S A によって検出されたように) 高い力価の I L - 2 / I L - 2 A 免疫複合体を示すので、上記結果は、(本実施例で E L I S A によって検出されたような) I L - 2 / I L - 2 A 免疫複合体を T 1 D のバイオマーカーとして使用し得ることを証明している。

【 0 1 1 9 】

実施例 8 . 多重粒子ベースのフローサイトメトリーによる I L - 2 自己抗体の定量

リコンビナント m I L - 2 をカルボキシル化ビーズ (Bio-Rad Laboratories) に共有結合させた。最初に、ビーズを、製造業者の説明書にしたがって、N - ヒドロキシスクシンイミド (Thermo Fisher) の存在下、1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミドヒドロクロリドによって活性化して、アミン反応性中間体を形成した。活性化ビーズを、回転下、反応混合物中で、1 0 μg/mL m I L - 2 と共に室温で 2 時間インキュベーションした。次いで、ビーズを、製造業者の説明書にしたがってブロッキング及び保存した。市販の抗 m I L - 2 モノクローナル抗体 (クローン JES6-1A12、eBioscience)、ビオチン - 抗ラット I g (BD Biosciences) 及び次いで P E - ストレプトアビジン (Invitrogen) を使用して、カップリングを確認した。m I L - 2 結合ビーズを、暗所において、水平シェーカー上の 9 6 ウェルプレート中で、B 6 マウス又は N O D マウス由来の連続希釈血清と共に室温で 2 時間インキュベーションした。ビーズを P B S / 0 . 0 5

40

50

% Tween - 20 で 2 回洗浄し、ビオチン標識抗マウス Ig G 抗体 (1 : 250 ; Southern Biotech) と共に 1 時間インキュベーションし、洗浄し、PE - ストレプトアビジン (1 : 125 ; Invitrogen) と共に 30 分間インキュベーションし、再度洗浄し、PBS / 0.05% Tween - 20 100 μ L に再懸濁した。次いで、ビーズを LSRII フローサイトメーター (BD Biosciences) によって分析し、データを FlowJo ソフトウェアによって分析した。mIL - 2 A A b 競合アッセイには、B6 マウス又は NOD マウス由来の血清 (1 / 10 希釈) を、漸増濃度の mIL - 2 と共に室温で 2 時間プレインキュベーションした。次いで、mIL - 2 コーティングビーズを追加し、上記のように、多重粒子ベースのフローサイトメトリーによって処理した。

【 0 1 2 0 】

結果を図 8 に示す。

【 0 1 2 1 】

IL - 2 コーティング蛍光ビーズを用いて FACS によって、抗マウス IL - 2 Ig G の力価を定量した。(b) 競合アッセイ : 抗 mIL - 2 陰性 B6 マウス (黒丸) 又は抗 hIL - 2 陽性前糖尿病 NOD マウス (白丸) 由来の血清を、漸増量の遊離リコンビナント mIL - 2 と共に 1 時間プレインキュベーションし、次いで、IL - 2 コーティング蛍光ビーズを用いて FACS によって、抗 mIL - 2 の力価を定量した。記号は個々のマウスを表し、横方向のバーは中央値である。データは、少なくとも 2 回の独立した実験の累積である。

【 0 1 2 2 】

図 8 a に見られ得るように、B6 マウスではなく NOD マウスは、多重粒子ベースのフローサイトメトリーによって検出されたように、高い力価の mIL - 2 A A b を示す。

【 0 1 2 3 】

図 8 b に見られ得るように、多重粒子ベースのフローサイトメトリーによって検出された、NOD マウスの血清中の mIL - 2 A A b は特異的である。

【 0 1 2 4 】

結論 :

多重粒子ベースのフローサイトメトリーは、特定の IL - 2 A A b の検出を可能にするので、上記結果は、(多重粒子ベースのフローサイトメーター、競合多重粒子ベースのフローサイトメトリーによって検出される) IL - 2 A A b を T1D のバイオマーカーとして使用し得ることを証明している。

【 0 1 2 5 】

実施例 9 . 中和アッセイによる IL - 2 自己抗体の中和能力の研究

B6 マウス又は NOD マウス由来の熱不活性化 (56 $^{\circ}$ C で 30 分間) 連続希釈血清を用いて又は用いずに、mIL - 2 不含、1 ng/mL mIL - 2 含有又は 3 IU/mL hIL - 2 含有の完全 RPMI 培地 (Gibco) 中、96 ウェルプレートにおいて、CTL - 2 細胞 (ATCC、マイコプラズマを含まない) を培養した (細胞 104 個 / ウェル) 。48 時間後、培養物を [3 H] - チミジン (1 μ Ci / ウェル) で 18 時間パルスし、液体シンチレーションによってカウントした。

【 0 1 2 6 】

結果を図 9 に示す。

【 0 1 2 7 】

レジェンド

1 ng/mL mIL - 2 及び異なる濃度の B6 (黒丸) 又は NOD (白丸) 血清と共に 3 日間培養した CTL - 2 細胞の増殖。増殖は、コントロール (マウス血清なしで 1 ng/mL mIL - 2 と共に 3 日間培養した CTL - 2) に対する割合として表されている。記号及び曲線は個々のマウスを表し、横方向のバーは中央値である。データは、少なくとも 2 回の独立した実験の累積である。

【 0 1 2 8 】

図 9 に見られ得るように、IL - 2 依存性細胞株 CTL - 2 の増殖は、B6 血清では

10

20

30

40

50

なくNOD血清によってのみ阻害され、これは、NODマウスが中和IL-2AAbを示すことを示している。

【0129】

結論：

CTL-2ベースの中和アッセイは、中和IL-2AAbの検出を可能にするので、上記結果は、(in vitro中和アッセイによって検出される)中和IL-2AAbをT1Dのバイオマーカーとして使用し得ることを証明している。

【0130】

実施例10 増殖アッセイによるIL-2特異的T細胞の定量

12アミノ酸が重複し、(シグナルペプチドを含む)mIL-2配列全体をカバーする15merのペプチドライブラリーを作製した(GL-Biochem)。ペプチド(10mmol/L)を使用まで-20のDMSO中で保存した。10~18週齢の雌性NODマウス由来の脾細胞を、DMSO(ネガティブコントロール)、aCD3-CD28ビーズ(ポジティブコントロール、1ビーズ:1細胞の比、Life Technologies)又はペプチド(10µmol/L)を含有するX-Vivo 15無血清培地(Lonza)中、3連で培養した(細胞4×10⁵個/150µL/ウェル)。96時間後、培養物を[3H]-チミジン(1µCi/ウェル)で18時間パルスし、液体シンチレーションによってカウントした。

【0131】

結果を図10に示す。

【0132】

レジェンド

DMSO、mIL-2ペプチド(これは、最初のスクリーニングにおいて陽性応答をもたらした)(10µmol/L)又はaCD3-CD28コーティングビーズ(1ビーズ:1細胞の比)による96時間の刺激後、10~18週齢の雌性前糖尿病NOD(n=3)脾細胞による増殖(cpm)をチミジン取り込みによって定量した。

【0133】

結果は、NOD脾細胞が、細胞増殖によって、mIL-2配列由来の2つのペプチドに応答することを示している。

【0134】

結論

NODマウスは、(2つの異なるペプチドに対して反応性の)IL-2特異的T細胞を示すので、上記結果は、(IL-2ペプチドによる再刺激後にチミジン増殖アッセイによって検出される)IL-2特異的T細胞をT1Dのバイオマーカーとして使用し得ることを証明している。

【0135】

実施例11 ヒトIL-2中和アッセイ

hIL-2AAb⁻健常ドナー又はahIL-2AAb⁺T1D患者由来の熱不活性化(56で30分間)血清(1/10希釈)を用いて又は用いずに、1IU/mL hIL-2を含有する無SVF RPMI培地(Gibco, France)中、75µL/ウェルで、96ウェルプレートにおいて、健常ドナー由来のPBMCを培養した。5分間の刺激後、培養物を、225µL/ウェルのPBS/2%ホルムアルデヒドによって室温で10分間固定した。PBS/0.2%BSAで洗浄した後、細胞を、100µL/ウェルの氷冷メタノールによって氷上で10分間透過処理した。次いで、細胞をPBS/0.2%BSAで洗浄し、抗CD3 PE-Cy7(クローンUCHT1; 1:200; Beckman-Coulter)、抗CD4 PerCP(クローンRPA-T4 1:100; Ozyme)、抗CD25 PE(クローンM-A251; 1:5; BD Biosciences及びクローン3G10; 1:10; Miltenyi)、抗Foxp3 Alexa488(クローン236A/E7; 1:20; eBiosciences)及び抗pSTAT5 Alexa647(クローン47/Stat5(pY694); 1:20; BD Biosciences)によって4で45分間染色した。細胞を、LSRII又はFortessaフローサイトメーターによって取得し、FlowJoソフトウェアを用いて分析した。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 6 】

結果を図 1 1 に示す。

【 0 1 3 7 】

グラフは、抗 h I L - 2 自己抗体を含有する患者の血清の存在下では、p S T A T 5 T r e g の割合が減少しているが（右のグラフ）、抗 h I L - 2 自己抗体を含まない患者の血清の存在下では減少していない（左のグラフ）ことを示している。

【 0 1 3 8 】

結論

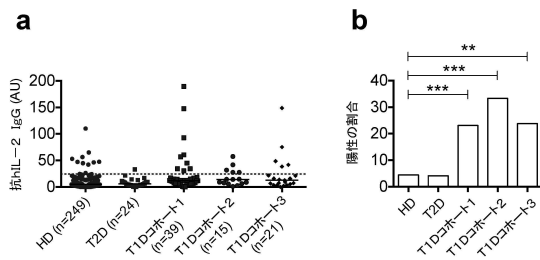
上記結果は、抗 I L - 2 自己抗体が in vitro 中和活性を有し得ることを証明している。

【 0 1 3 9 】

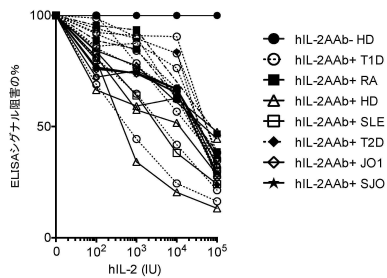
実施例 1 2 . ワクチン

I S A (SEPPIC, Paris) 5 0 % と、K L H (1 0 0 μ g / 用量) にカップリングされたヒト I L 2 由来の合成ペプチド L T R M L T F K F Y M P K K A の水溶液 5 0 % とから構成される油中水型エマルジョンから、ワクチン調製物を製造した。

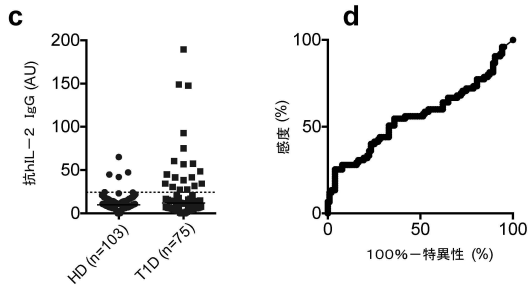
【 図 1 】



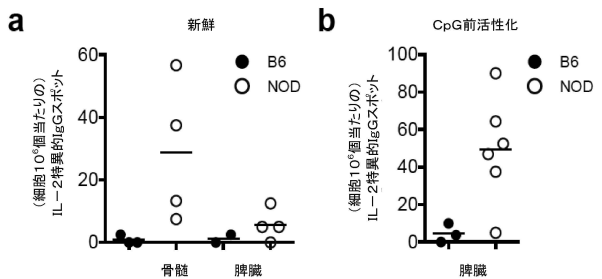
【 図 2 】



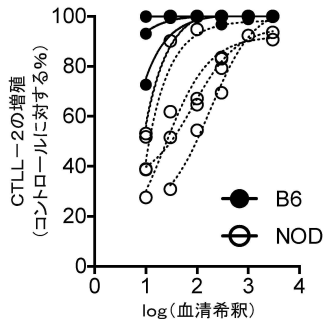
【 図 3 】



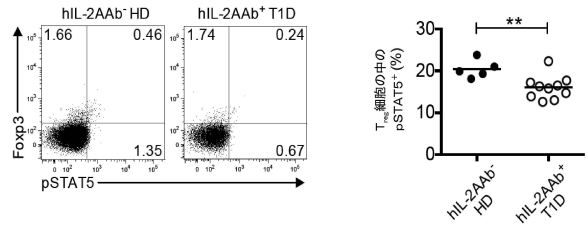
【 図 3 】



【 図 9 】



【 図 1 1 】



【 図 1 0 】

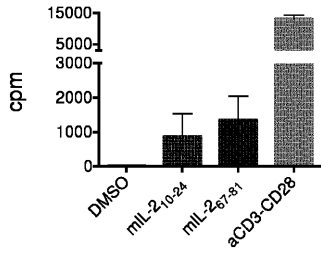


Fig. 10

【 配列表 】

0006612258000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
C 1 2 N 15/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00 H
		C 1 2 N	15/00

(73)特許権者 509033033

ユニベルシテ・パリ・デカルト

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

フランス国、エフ - 7 5 2 7 0 パリ・セデックス 0 6、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥ
シーヌ 1 2

(73)特許権者 595040744

サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・シャンティフィック

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

フランス国、7 5 0 1 6 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 ピアッジョ, エリアーヌ

フランス国、エフ - 7 5 0 0 5 パリ、リュ・ドゥルム 2 6、アンスティテュ・キュリ、6 エム
エタージュ、イミュニテ・エ・カンセール、アンセルム・ユ 9 3 2

(72)発明者 ペロル, ルイ

フランス国、エフ - 7 5 0 0 5 パリ、リュ・ドゥルム 2 6、アンスティテュ・キュリ、6 エム
エタージュ、イミュニテ・エ・カンセール、アンセルム・ユ 9 3 2

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 2 6 4 4 9 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 2 6 6 8 6 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 2 / 1 2 3 3 8 1 (W O , A 1)

米国特許第 0 6 1 6 8 7 8 5 (U S , B 1)

特開昭 6 3 - 1 8 3 5 3 8 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	诊断自身免疫性疾病的方法		
公开(公告)号	JP6612258B2	公开(公告)日	2019-11-27
申请号	JP2016564014	申请日	2015-04-21
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院 居里研究所		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 居里研究所 - Yuniberushite巴黎笛卡尔		
当前申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 居里研究所 - Yuniberushite巴黎笛卡尔 中心法国国家，香提网络点击		
[标]发明人	ピアッジョエリアーヌ ペロルルイ		
发明人	ピアッジョ,エリアーヌ ペロル,ルイ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/08 G01N33/564 A61P3/10 A61P19/02 A61P21/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61K39/00 C12N15/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P29/00 C07K14/4713 G01N33/00 G01N33/564 G01N2333/55 G01N2800/50 G01N2800/52 C07K14/55 C07K16/246 C07K2317/14 G01N2800/24		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y C07K7/08 G01N33/53.N G01N33/564.B A61P3/10 A61P19/02 A61P21/00 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61K39/00.H C12N15/00		
优先权	2014305595 2014-04-22 EP		
其他公开文献	JP2017519970A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于确定患者是否患有自身免疫疾病或有自身免疫疾病的风险或用于评估自身免疫疾病的严重性或预测其结果的体外方法，包括检测或量化从所述个体获得的生物学样品中的步骤。免疫抗IL2应答，T1D，系统性红斑狼疮，类风湿性关节炎，干燥综合征，自身免疫性多发性肌炎患者的抗IL2抗体或IL-2特异性T细胞特异性识别的肽，以及药物组合物。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6612258号 (P6612258)																														
(45) 発行日 令和1年11月27日 (2019.11.27)	(24) 登録日 令和1年11月8日 (2019.11.8)																															
(5) Int. Cl. F I																																
<table border="0"> <tr> <td>G 0 1 N</td> <td>33/53</td> <td>(2006.01)</td> <td>G 0 1 N</td> <td>33/53</td> <td>Z N A Y</td> </tr> <tr> <td>C 0 7 K</td> <td>7/08</td> <td>(2006.01)</td> <td>C 0 7 K</td> <td>7/08</td> <td></td> </tr> <tr> <td>G 0 1 N</td> <td>33/564</td> <td>(2006.01)</td> <td>G 0 1 N</td> <td>33/53</td> <td>N</td> </tr> <tr> <td>A 6 1 P</td> <td>3/10</td> <td>(2006.01)</td> <td>G 0 1 N</td> <td>33/564</td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>A 6 1 P</td> <td>19/02</td> <td>(2006.01)</td> <td>A 6 1 P</td> <td>3/10</td> <td></td> </tr> </table>			G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Z N A Y	C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08		G 0 1 N	33/564	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N	A 6 1 P	3/10	(2006.01)	G 0 1 N	33/564	B	A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Z N A Y																											
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08																												
G 0 1 N	33/564	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N																											
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	G 0 1 N	33/564	B																											
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/10																												
請求項の数 11 (全 23 頁) 最終頁に続く																																
(21) 出願番号 特願2016-564014 (P2016-564014)	(73) 特許権者 591100596 アンステイチュ ナショナル ドク ラ サンテ エ ドク ラ ルシエルシュ メ ディカル フランス国、エフ-75013 パリ、リ ュ・ドゥ・トルビアック IOI																															
(86) (22) 出願日 平成27年4月21日 (2015.4.21)																																
(65) 公表番号 特表2017-519970 (P2017-519970A)																																
(43) 公表日 平成29年7月20日 (2017.7.20)																																
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/058588																																
(87) 国際公開番号 W02015/162124																																
(87) 国際公開日 平成27年10月29日 (2015.10.29)																																
審査請求日 平成30年1月25日 (2018.1.25)																																
(31) 優先権主張番号 14305595.2	(73) 特許権者 500026533 アンステイチュ・キュリ I N S T I T U T C U R I E フランス国 O 5 セテクス パリー リ ュ ドゥ ルム 2 6																															
(32) 優先日 平成26年4月22日 (2014.4.22)																																
(33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)																																
最終頁に続く																																
(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の診断のための方法																																