

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-55845

(P2020-55845A)

(43) 公開日 令和2年4月9日(2020.4.9)

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)
C07K 14/74 (2006.01)	C07K 14/74	ZNA	4B065
C07K 5/08 (2006.01)	C07K 5/08		4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15		4C087
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19		4H045
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21		
審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 56 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2019-219661 (P2019-219661)	(71) 出願人	591100596
(22) 出願日	令和1年12月4日 (2019.12.4)		アンステイチュ ナショナル ドゥ ラ
(62) 分割の表示	特願2016-559818 (P2016-559818)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
	の分割		ディカル
原出願日	平成27年4月1日 (2015.4.1)		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(31) 優先権主張番号	14163081.4		ユ・ドゥ・トルビアック 101
(32) 優先日	平成26年4月1日 (2014.4.1)	(71) 出願人	507421289
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ユニヴェルシテ・ドゥ・ナント
			フランス国、44000 ナント、ケ・ド
			ゥ・トゥルヴィル 1
		(74) 代理人	110001508
			特許業務法人 津国
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 単離されたドナーMHC由来ペプチド及びその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 寛容を誘導することにより免疫拒絶を予防する、ドナーMHCクラスII分子の多型領域由来の単離されたペプチドの提供。

【解決手段】 薬剤として使用するための、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R (配列番号：1) 又は機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15～40個のアミノ酸長の単離されたペプチド。前記ペプチドを含む培養培地により、形質細胞様樹状細胞集団の存在下において、CD8⁺CD45RC^{low}Treg集団を生成し、移植患者が寛容であるかを判定する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）又は下記ペプチド：

【表 1 3】

NREEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 2);
 QEEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 29);
 NREEFVRFDSVDVGEFR (配列番号: 30);
 REEFVRFDSVDVGEFR (配列番号: 31);
 HQEEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 32);
 HQEEYVRFDSVDVGEYRA (配列番号: 33); 及び
 HQEEYVRFDSVDVGEYRAV (配列番号: 34).

を除く、その機能保存変異体を含む M H C クラス I I 分子由来の、15 ~ 40 個のアミノ酸の範囲の長さを有する、

単離されたペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドが、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）又はその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15 又は 16 個のアミノ酸長のペプチドである、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

ペプチドが、配列番号：1 に対して、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸が異なってもよい、請求項 2 記載のペプチド。

【請求項 4】

ペプチドが、

【表 1 4】

REEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 1)
 REEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 3);
 REEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 4);
 QEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 5);
 REEYARFDSVDGVYR (配列番号: 6);
 NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7);
 NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8);
 NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9) 又は
 NREEYARFDSVDGVYR (配列番号: 10).

からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチド。

【請求項 5】

アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）もしくはその機能保

20

30

50

存変異体を含むか、又は、からなる、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有するペプチドをコードする核酸配列、又は、このような核酸配列を含む発現ベクター、又は、このような発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項6】

アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）もしくはその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15～25個のアミノ酸の範囲の長さを有するペプチドを含む、

MHC / ペプチド多量体。

【請求項7】

アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）又はその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長の単離されたペプチドを、特異的に認識する、

Tリンパ球。

【請求項8】

アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）又はその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドを含む培養培地により、形質細胞様樹状細胞集団の存在下において、CD8⁺ Treg集団を培養する工程を含む、

CD8⁺ CD45RC^{low} Treg集団を生成するためのin vitro又はex vivo法。

【請求項9】

請求項6記載のMHC / ペプチド多量体を含む培養培地により、CD8⁺ Treg集団を培養する工程を含む、

CD8⁺ CD45RC^{low} Treg集団を生成するためのin vitro又はex vivo法。

【請求項10】

薬剤として使用するための、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）もしくは機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチド、又は、請求項6記載のMHC / ペプチド多量体。

【請求項11】

寛容の誘導を必要とする患者において寛容を誘導するのに使用するための、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）もしくは機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチド、又は、請求項6記載のMHC / ペプチド多量体。

【請求項12】

移植拒絶の予防又は減少を必要とする患者において移植拒絶を予防又は減少させるのに使用するための、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）もしくは機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチド、又は、請求項6記載のMHC / ペプチド多量体。

【請求項13】

ペプチドが、アミノ酸配列：

10

20

30

40

【表 1 5】

NREEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 2),
 REEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 3);
 REEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 4);
 QEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 5);
 REEYARFDSVDVGYYR (配列番号: 6);
 NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7);
 NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8);
 NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9); 又は
 NREEYARFDSVDVGYYR (配列番号: 10).

を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長のペプチドである、請求項10～12のいずれか一項記載の使用のための単離されたペプチド又はMHC/ペプチド多量体。

【請求項 1 4】

20

a) アミノ酸配列: R E E Y A R F D S D V G E Y R (配列番号: 1) 又は下記ペプチド:

【表 1 6】

QEEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 29);
 NREEFVRFDSVDVGEFR (配列番号: 30);
 REEFVRFDSVDVGEFR (配列番号: 31);
 HQEEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 32);
 HQEEYVRFDSVDVGEYRA (配列番号: 33);
 HQEEYVRFDSVDVGEYRAV (配列番号: 34);

を除く、その機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチド、又は

b) 請求項5記載のペプチドをコードする核酸、又は

c) このような核酸を含むベクター、又は

d) このような発現ベクターを含む宿主細胞、又は

e) 請求項6記載のMHC/ペプチド多量体、又は

40

f) 複合体MHC分子及びアミノ酸配列: R E E Y A R F D S D V G E Y R (配列番号: 1) もしくはその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有するペプチドを含む抗原提示細胞、又は

g) 請求項7記載のペプチドを特異的に認識するTリンパ球と、

薬学的に許容し得る担体とを含む、
 医薬組成物。

【請求項 1 5】

移植患者が寛容であるかを判定するための *in vitro* 法であって、

前記移植患者から得られた生体サンプル中の $CD8^+CD45RC^{low}$ Treg の

50

存在を、前記生体サンプルと、請求項6記載のMHC/ペプチド多量体からなり、 $CD8^+CD45RC^{10w}$ Tregと選択的に相互作用可能な結合パートナーとを接触させることにより判定する工程を含み、 $CD8^+CD45RC^{10w}$ Tregの存在が寛容を示す、

方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫療法分野におけるものである。

【0002】

特に、本発明は、移植拒絶の予防を必要とする患者において寛容を誘導することにより免疫拒絶を予防する、ドナーMHCクラスII分子の多型領域由来の単離されたペプチドに関する。

【背景技術】

【0003】

同種のヒト間での移植は、疾患の進行により機能不全となった臓器を置き換えるのに、今でも最良の処置である。レシピエント細胞とドナー細胞との主要組織適合複合体(MHC)分子間での不一致が、臓器移植の長期的成功に対する主な障壁である。移植臓器に対する寛容の誘導が、主な目標となっており、特定の寛容戦略が、臨床応用され始めている(1)。種々の集団のTregが、同種臓器に対する寛容を誘導可能であると説明されている。これらのTregの大部分は、 $CD4^+$ Tregである。一方、 $CD8^+$ Tregは、ほとんど十分に画定されていない(2)。

【0004】

臓器同種移植片生存を長くするのに最も効率的な戦略の一つである、 $CD40-CD40L$ 相互作用の同時刺激阻害(3)は、強力なサプレッシブ能を有する $CD8^+CD45RC^{10w}$ Treg細胞($CD8^+CD40Ig$ Tregと呼ばれる)を誘導することが、以前から説明されている(2、4~6)。天然の $CD8^+CD45RC^{10w}$ Tregだけでなく、ドナー特異的 $CD8^+CD40Ig$ Tregが、ナイーブな移植レシピエントに対して、寛容を伝達したことが示されている。加えて、これらの細胞は、移植臓器の生存がインターフェロン-(IFN)のその分泌に依存するような珍しい方法で、樹状細胞(DC)及び移植片の内皮細胞(EC)によるインドールアミン2,3-ジオキゲナーゼ(IDO)の発現を向上させるように振る舞った(5)。また近年、 $CD8^+CD40Ig$ Tregのサプレッシブ活性は、形質細胞様DC(pDC)の存在下において主に行われること、及び、フィブリノゲン様タンパク質2(FGL2)が、このサプレッションに関与していたことが示されている(6)。

【0005】

レギュラトリーT細胞集団の形をとるTCR相互作用のための要求は、活発で、進行中の議論である(2、7)。TCR特異性及び多様性が、 $CD8^+$ Tregのin vivoでの機能及び活性に重要であることが、一部の研究で示唆されている(2、7~13)。 $CD4^+$ Tregについての種々のモデルから、抗原特異的Tregは、制限されていないTreg細胞より強力なサプレッサーであることが示されている(2、14)。また、 $CD4^+$ Tregについて、TCR多様性が胸腺選択及び分化に重要であることも公知であり、Treg生成及び機能に対するその影響が、近年説明されている(15)。高スループットシークエンスから、高いTCR多様性を有するナイーブなTregが、TCR制限Tregより、効率的に増殖し、養子移植に基づく移植片対宿主病(GVHD)をサプレッションするのに、TCR制限Tregより、適応でき、効率的であることが示されている(13、16)。Immunoscope(登録商標)を使用して、 $CD8^+CD40Ig$ Tregが、V11エレメントに対する偏ったレパトリーを蓄積したことが、以前に証明されている(5)。このことは、クローンエクспанションの可能性を示唆している。今日、このTreg集団又は $CD8^+$ Treg集団の認識機構は、一般的には

10

20

30

40

50

ほとんど知られていない。このため、Treg活性におけるTCR/MHC/ペプチド相互作用の正確な役割は、今でも議論のトピックである。

【0006】

さらに、移植物に対する免疫応答（例えば、抗体媒介性拒絶に関連するドナー特異的抗体）のTreg媒介性サプレッションに基づく効率的な治療戦略を提供することにより、日和見感染症（例えば、細菌、ウイルス、又は真菌感染）の罹患率を向上させ、移植患者の死亡率を向上させてしまう欠点を有する、非特異的な免疫抑制剤を使用する必要を回避するための重要な必要性が未だに存在している。

【発明の概要】

【0007】

第1の態様において、本発明は、アミノ酸配列：REEYARFDS DVGEYR（配列番号：1）又はその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドに関する。

10

【0008】

第2の態様において、本発明は、アミノ酸配列：REEYARFDS DVGEYR（配列番号：1）又はその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15～25個のアミノ酸の範囲の長さを有するペプチドを含むMHC/ペプチド多量体に関する。

【0009】

第3の態様において、本発明は、本発明の単離されたペプチドを含む培養培地により、形質細胞様樹状細胞集団の存在下において、 $CD8^+ Treg$ 集団を培養する工程を含む、 $CD8^+ CD45RC^{10w}$ Treg集団を生成するためのin vitro又はex vivo法に関する。

20

【0010】

第4の態様において、本発明は、本発明のMHC/ペプチド多量体を含む培養培地により、 $CD8^+ Treg$ 集団を培養する工程を含む、 $CD8^+ CD45RC^{10w}$ Treg集団を生成するためのin vitro又はex vivo法に関する。

【0011】

第5の態様において、本発明は、薬剤として使用するための、寛容の誘導を必要とする患者において寛容を誘導するのに使用するための、及び、移植拒絶の予防又は減少を必要とする患者において移植拒絶を予防又は減少させるのに使用するための、本発明の単離されたペプチド又はMHC/ペプチド多量体に関する。

30

【0012】

第6の態様において、本発明は、

- a) 本発明の単離されたペプチド、又は
- b) 本発明のペプチドをコードする核酸、又は
- c) このような核酸を含むベクター、又は
- d) このような発現ベクターを含む宿主細胞、又は
- e) 本発明のMHC/ペプチド多量体、又は
- f) 複合体MHC分子及び本発明のペプチドを含む抗原提示細胞、又は
- g) 本発明のペプチドを特異的に認識するTリンパ球と、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬組成物に関する。

40

【0013】

第7の態様において、本発明は、移植患者（レシピエント）が寛容であるかを判定するためのin vitro法であって、前記移植患者から得られた生体サンプル中の $CD8^+ CD45RC^{10w}$ Tregの存在を判定する工程を含み、 $CD8^+ CD45RC^{10w}$ Tregの存在が寛容を示す、方法に関する。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明者らは、 $CD8^+ CD40Ig$ Tregの優れたTCR特異性が、Tregの機能及び移植臓器の生存に影響を及ぼすかどうかを調査し、これにより、誘導されたCD

50

$8^+CD40IgTreg$ が、ドナーMHCクラスII分子の多型領域由来のドミナントなペプチド(Du51と呼ばれる)を認識したことを、移植において初めて証明した。このペプチドは、少なくともex vivoにおいて、pDCの存在下で、 $CD8^+Treg$ をエクспанションさせ、ナイーブな移植レシピエントにおいて、更なる処置をすることなく寛容を誘導した。

【0015】

加えて、本発明者らは、特定の四量体を生成し、ex vivo及びin vivoにおいて、ドミナントな寛容が抗原特異的 $CD8^+CD40IgTreg$ により発揮されることを証明した。最後に、本発明者らは、このペプチドが、V11及びV18特異的TCRを発現しているTregにより認識されたことを証明した。これらのTCRは、脾臓及び移植片において、プライベートであるが制限されたV11レパートリーを含んだが、脾臓においてプライベートでかつ多様なV18レパートリーと、移植片においてより制限されたV18レパートリーとを含んだ。これらにより、アロ反応性の免疫応答における効率的なサプレッションが確保される。

10

【0016】

本発明のペプチド

本発明の第1の態様は、アミノ酸配列：REEYARFDSVDVGEYR(配列番号：1)(本明細書において、51-18とも呼ばれる)又はその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15~40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドに関する。

20

【0017】

本発明の一実施態様では、本ペプチドは、アミノ酸配列：REEYARFDSVDVGEYR(配列番号：1)又は下記ペプチド：

【表1】

NREEYARFDSVDVGEYR(配列番号: 2);
 QEEYVRFDSVDVGEYR(配列番号: 29);
 NREEFVRFDSVDVGEFR(配列番号: 30);
 REEFVRFDSVDVGEFR(配列番号: 31);
 HQEEYVRFDSVDVGEYR(配列番号: 32);
 HQEEYVRFDSVDVGEYRA(配列番号: 33); 及び
 HQEEYVRFDSVDVGEYRAV(配列番号: 34).

を除く、その機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15~40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドである。

【0018】

本明細書で使用する場合、「機能保存変異体」という用語は、参照ペプチド(例えば、配列番号：1)に対して、少なくとも70%、更により好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又は99.9%の同一性を含み、かつ、参照ペプチド(例えば、配列番号：1(51-18))と実質的に同じ方法で、寛容を誘導することにより、臓器拒絶を予防可能でもある変異体を意味する。

40

【0019】

本発明の一実施態様では、前記ペプチドは、ドナーMHCクラスII分子の多型領域由来である。

【0020】

50

特定の実施態様では、前記ペプチドは、アミノ酸配列：R L L A R L I Y N R E E Y A R F D S D V G E Y R A V T E L G R P S A E Y R N K Q（配列番号：28）又はその機能保存変異体からなる。

【0021】

一実施態様において、本発明のペプチドは、配列番号：28のペプチドに対して、少なくとも70%、更により好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又は99.9%の同一性を含み、かつ、配列番号：28のペプチドと実質的に同じ方法で、寛容を誘導することにより、臓器拒絶を予防可能でもある。

【0022】

本発明の一実施態様では、前記ペプチドは、最大で15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は40個のアミノ酸を含む。

【0023】

本発明の特定の実施態様では、本ペプチドは、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）（本明細書において、51-18とも呼ばれる）又はその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長の単離されたペプチドである。

【0024】

本発明の特定の実施態様では、本ペプチドは、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）（本明細書において、51-18とも呼ばれる）又はその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長の単離されたペプチドであり、前記変異体が、アミノ酸配列：N R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：2）（本明細書において、D u 5 1とも呼ばれる）からなるペプチドではないという条件である。

【0025】

本明細書で使用する場合、「ペプチド」という用語は、自然に又は合成的に産生されたかに関わらず、長さを特定しない、ペプチド結合により結合されたアミノ酸残基のポリマーを意味する。ペプチドという用語は、翻訳後修飾を除外しない。翻訳後修飾は、リン酸化、アセチル化、グリコシル化等を含むが、これらに限定されるわけではない。また、この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が天然アミノ酸に対応する人工的な化学模倣物であるアミノ酸ポリマーと、天然アミノ酸ポリマー及び非天然アミノ酸ポリマーとも適用する。

【0026】

「単離されたペプチド」は、ペプチドが入り混じった細胞成分、例えば、本来ポリペプチドと会合している炭水化物、脂質、又は他のタンパク質性不純物から本質的に遊離していることを意図している。典型的には、単離されたペプチドの調製物は、高度に精製された形態、すなわち、少なくとも約80%純粋、少なくとも約90%純粋、少なくとも約95%純粋、95%超純粋、例えば、96%、97%、もしくは98%以上純粋、又は99%超純粋な形態において、ペプチドを含有する。特定のタンパク質調製物が単離されたペプチドを含有することを示す1つの方法は、タンパク質調製物のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びゲルのクーマーシー・ブリリアントブルー染色による、単一バンドの出現による。あるいは、他の分析化学技術、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）又は質量分析法（MS）も、純度を決定するのに使用することができる。調製物中に存在するプレドミナントな種であるペプチドは、実質的に精製されている。

【0027】

また、本発明は、上記されたように、配列番号：1を含むペプチドの機能保存変異体であるペプチドを包含する。

【0028】

一実施態様において、本発明のペプチドは、配列番号：1のペプチドに対して、少なく

10

20

30

40

50

とも70%、更により好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又は99.9%の同一性を含み、かつ、配列番号：1のペプチドと実質的に同じ方法で、寛容を誘導することにより、臓器拒絶を予防可能でもある。

【0029】

本発明の照会アミノ酸配列に対して、例えば、少なくとも95%「同一の」アミノ酸配列を有するポリペプチドは、対象ペプチド配列が、照会アミノ酸配列のアミノ酸100個当たり、最大5個のアミノ酸改変を含む場合があることを除いて、対象ペプチドのアミノ酸配列が、照会配列と同一であることを意図している。すなわち、照会アミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するペプチドを得るには、対象配列中の最大5%（100個中5個）のアミノ酸残基が、挿入、欠失、又は、別のアミノ酸により置換されることができる。

10

【0030】

本願の枠組みにおいて、同一性の割合は、グローバルアライメントを使用して算出される（すなわち、2つの配列が、その全長にわたって比較される）。2つ以上の配列の同一性及び相同性を比較するための方法は、当技術分野において周知である。「needle」プログラムは、ニードルマン・ワンチ・グローバルアライメント・アルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443 453）を使用して、2つの配列の最適なアライメント（ギャップを含む）を、その全長を考慮して見出す。例えば、このプログラムを使用することができる。needleプログラムは、例えば、ebi.ac.ukのワールド・ワイド・ウェブサイトから入手できる。本発明に基づく同一性の割合は、好ましくは、EMBOSS::needle（グローバル）プログラムを使用して、10.0に等しい「Gap Open」パラメータ、0.5に等しい「Gap Extend」パラメータ、及びBlosum62マトリックスで算出される。

20

【0031】

一実施態様において、本発明のペプチドは、配列番号：1又は配列番号：2（Du51）に対して、1、2、3、又は4個のアミノ酸が異なってもよい。

【0032】

このようなペプチドは、例えば、参照配列と比較して置換のみを含んでもよい。この置換は、好ましくは、以下の表に示された保存的置換に相当する。

【表2】

30

保存的置換	アミノ酸種
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	脂肪族疎水性側鎖を有するアミノ酸
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	無電荷であるが、極性の側鎖を有するアミノ酸
Asp, Glu	酸性側鎖を有するアミノ酸
Lys, Arg, His	塩基性側鎖を有するアミノ酸
Gly	中性側鎖

【0033】

典型的には、本発明は、配列番号：1（51-18）又は配列番号：2（Du51）からなるペプチドに対して実質的に同一のペプチドを包含する。このペプチドでは、1つ以上の残基が、機能的に類似する残基により保存的に置換されており、このペプチドは、下に記載されたように、配列番号：1（51-18）又は配列番号：2（Du51）からなるペプチドの機能的局面を示す、すなわち、所定のアミノ酸配列からなるペプチド（例

50

えば、ペプチド51-18又はDu51)と実質的に同じ方法で、寛容を誘導することにより、臓器拒絶を予防することもできる。

【0034】

また、「保存的置換」という用語は、誘導体化されていない残基の代わりに、化学的に誘導体化された残基の使用も含む。「化学的な誘導体」は、機能性側鎖基の反応により化学的に誘導体化された1つ以上の残基を有するペプチドを意味する。このような誘導体化分子の例は、例えば、遊離アミノ酸基が誘導体化されてアミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基、又はホルミル基を形成している分子を含む。遊離カルボキシル基は誘導体化されて、塩、メチル及びエチルエステルもしくは他の種類のエステル、又はヒドラジドを形成することができる。遊離ヒドロキシル基は誘導体化されて、O-アシル又はO-アルキルの誘導体を形成することができる。ヒスチジンのイミダゾール窒素は誘導体化されて、N-im-ベンジルヒスチジンを形成することができる。また、化学誘導体は、20個の標準的なアミノ酸の1つ以上の天然アミノ酸の誘導体を含むペプチドを含む。例えば、4-ヒドロキシプロリンは、プロリンについて置換することができる。5-ヒドロキシリシンは、リシンについて置換することができる。3-メチルヒスチジンは、ヒスチジンについて置換することができる。ホモセリンは、セリンについて置換することができる。オルニチンは、リシンについて置換することができる。また、「保存的置換」という用語は、ペプチド又はタンパク質の二次構造を制御及び安定化するのを目的に、非天然アミノ酸の使用も含む。これらの非天然アミノ酸は、以下に記載されるように、化学的に改変されたアミノ酸、例えば、プロリノアミノ酸、ベータ-アミノ酸、N-メチルアミノ酸、シクロプロピルアミノ酸、アルファ、アルファ-置換アミノ酸である。また、これらの非天然アミノ酸は、フッ化、塩化、臭化、又はヨウ化改変アミノ酸を含んでもよい。

【0035】

新たに生じたペプチドが、最初に特徴付けられたペプチド51-18又はDu51と同じ生物学的特性を含むかを検証するために、in vivoでのペプチド注入後における、CD8⁺CD45RC^{low} Treg活性化分析及び/又は寛容誘導分析(例えば、実施例セクションに記載)を、各ペプチドに行うことができる。さらに、移植臓器モデルにおいて行われるタイムコース及び用量応答から、各ペプチドについての最適条件が決定されるであろう。

【0036】

一実施態様において、本ペプチドは、

【表3】

REEYARFSDVGEFR (配列番号: 3),

REEYVRFSDVGEYR (配列番号: 4),

QEEYARFSDVGEYR (配列番号: 5), 又は

REEYARFSDVGVYR (配列番号: 6).

からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる。

【0037】

一実施態様において、アミノ酸配列: REEYARFSDVGEYR (配列番号: 1)を有するペプチドは、N末端にアスパラギン(N)を有する。

【0038】

好ましい実施態様では、本ペプチドは、

【表 4】

NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7),
 NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8),
 NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9), 又は
 NREEYARFDSVDVGVYR (配列番号: 10).

からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる。

【0039】

本発明に基づいて、本発明のペプチドは、従来の自動ペプチド合成法又はリコンビナント発現により産生することができる。タンパク質を設計及び調製するための全体的な原理は、当業者に周知である。

【0040】

本発明のペプチドは、従来技術に基づいて、溶液中又は固体支持体上で合成することができる。種々の自動合成機が市販されており、Stewart and Young ; Tam et al., 1983 ; Merrifield, 1986、及びBarany and Merrifield, Gross and Meienhofer, 1979に記載されたように、公知のプロトコールに基づいて使用することができる。また、本発明のペプチドは、例示的なペプチド合成機、例えば、Applied Biosystems Inc.からのモデル 433A を利用する固相技術により合成することができる。自動ペプチド合成又はリコンビナント法により生成された任意の所定のペプチドの純度は、逆相 HPLC 分析を使用して決定することができる。各ペプチドの化学的信頼性は、当業者に周知の任意の方法により確立することができる。自動ペプチド合成の代替手段として、リコンビナント DNA 技術を利用することができる。この場合、選択されたペプチドをコードするヌクレオチド配列が、発現ベクター内に挿入され、適切な宿主細胞中にトランスフォーメーション又はトランスフェクションされ、以下に記載されたように、発現に適した条件下で培養される。リコンビナント法は、より長いペプチド（ポリペプチド）を産生するのに特に好ましい。

【0041】

核酸、ベクター、及びリコンビナント宿主細胞

あるいは、本発明のペプチド（例えば、配列番号：1 で示されたペプチド）をコードする核酸、このような核酸を含むベクター、又はこのような発現ベクターを含む宿主細胞も、本発明の文脈内で対象となるものである。

【0042】

一実施態様において、本ペプチドは、上記されたアミノ酸配列からなる。

【0043】

本発明の核酸は、当技術分野においてそれ自体は公知の任意の技術により産生することができる。同技術は、例えば、任意の化学的、生物学的、遺伝学的、又は酵素的な技術を、単独又は組み合わせのいずれかであるが、これらに限定されるわけではない。

【0044】

その最も広い意味において、「ベクター」は、核酸の細胞への輸送を促進可能な任意の媒体である。一般的には、本発明に有用なベクターは、対象となる核酸配列の挿入又は包含により操作された、プラスミド、ファージミド、ウイルス、ウイルス又は細菌ソースから得られた他の媒体を含むが、これらに限定されるわけではない。ウイルスベクターは、好ましい種類のベクターであり、下記ウイルス：レトロウイルス、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス、ハーペー Maus 肉腫ウイルス、マウス乳ガンウイルス、及びマウス肉腫ウイルス；アデノウイルス、アデノ関連ウイルス；SV-40 型ウイルス；ポリオーマウイルス；エプスタイン - バーウイルス；パピローマウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；ならびに RNA ウイルス、例えば、レトロウイルス由来の核酸配列を含むが、これらに限定されるわけではない。命名されていないが、当技術

10

20

30

40

50

分野において公知の他のベクターを、容易に利用することができる。

【 0 0 4 5 】

好ましいウイルスベクターは、非細胞変性真核生物ウイルスに基づいている。同ウイルスにおいて、必須でない遺伝子が、対象となる遺伝子により置換されている。非細胞変性ウイルスは、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）を含む。同ウイルスのライフサイクルは、ゲノムウイルスRNAのDNAへの逆転写を含み、宿主細胞内DNAへのその後のプロウイルスインテグレーションを伴う。レトロウイルスは、ヒトの遺伝子治療の臨床試験に承認されている。複製欠損の（すなわち、所望のペプチドの合成に向けることができるが、感染性粒子を作製することができない）レトロウイルスが最も有用である。このように遺伝的に改変されたレトロウイルス発現ベクターは、*in vivo*における遺伝子の高効率なトランスダクションのための一般的な有用性を有する。複製欠損レトロウイルスを産生するための標準的なプロトコル（外来性遺伝子材料のプラスミドへの包含、パッケージング細胞株のプラスミドによるトランスフェクション、パッケージング細胞株によるリコンビナントレトロウイルスの産生、ウイルス粒子の組織培養培地からの回収、及びターゲット細胞のウイルス粒子による感染の工程を含む）は、KRIEGLER（「A Laboratory Manual」, W.H. Freeman C.O., New York, 1990）及びMURRY（「Methods in Molecular Biology」, vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991）に提供されている。

10

【 0 0 4 6 】

特定の用途に好ましいウイルスは、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルスである。これらのウイルスは、遺伝子治療において、ヒトへの使用について既に承認されている二本鎖DNAウイルスである。アデノ関連ウイルスは、複製欠損になるように操作することができ、広い範囲の細胞の種類及び細胞種に感染することができる。さらに、同ウイルスは、熱及び脂肪族溶媒安定性；造血細胞を含む多様な系統の細胞への高トランスダクション頻度；及び重複感染阻害の欠損による複数回のトランスダクションが可能等の利点を有する。報告によれば、アデノ関連ウイルスは、部位特異的な方法において、ヒトの細胞内DNAにインテグレーションすることにより、レトロウイルス感染の挿入変異誘発の可能性及び挿入された遺伝子発現特性の変異性を最少化することができる。加えて、野生型アデノ関連ウイルスの感染は、選択圧の非存在下において、100を超える継代における組織培養でフォローされており、アデノ関連ウイルスのゲノムインテグレーションが比較的安定なイベントであることを意味している。また、アデノ関連ウイルスは、染色体外法においても機能することができる。

20

30

【 0 0 4 7 】

他のベクターは、プラスミドベクターを含む。プラスミドベクターは、当技術分野において広く説明されており、当業者に周知である。例えば、SANBROOK et al., 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと。この数年の間に、プラスミドベクターは、*in vivo*において、抗原コード遺伝子を細胞に送達するためのDNAワクチンとして使用されてきた。プラスミドベクターは、これについて特に有利である。プラスミドベクターは、多くのウイルスベクターが有するのと同じ安全性の懸念を有さないためである。一方で、宿主細胞に適合性のプロモーターを有するこれらのプラスミドは、プラスミド内に操作可能にコードされた遺伝子から、ペプチドを発現することができる。一部の一般的に使用されるプラスミドは、pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40、及びpBlueScriptを含む。他のプラスミドは、当業者に周知である。さらに、プラスミドは、制限酵素及びライゲーション反応を使用し、DNAの特定フラグメントを除去及び追加して、カスタム設計することができる。プラスミドは、各種の非経口、粘膜、及び局所経路により送達することができる。例えば、DNAプラスミドは、筋肉内、皮内、皮下、又は他の経路により注入することができる。また、DNAプラスミドは、鼻内スプレー又は液滴、直腸坐剤、及び経口により投与することができる。また、DNAプラスミドは、表皮又は粘膜表面に、遺伝子銃を使用して投与することができる。該プラスミドは

40

50

、水溶液、金粒子上で乾燥させた状態、又は別のDNA送達システム（リボソーム、デンドリマー、及びマイクロ封入を含むが、これらに限定されるわけではない）と会合した状態で与えることができる。

【0048】

本発明に基づいて、使用することができる宿主細胞の例は、抗原提示細胞（APC）、例えば、ヒト樹状細胞又は単球（特に、処置されるべき患者から得られた細胞）である。

【0049】

遺伝子を運ぶベクターを細胞内に導入することができる手段は、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、又は、DEAE-デキストラン、リポフェクション、リン酸カルシウム、もしくは当業者に公知の他の手法を使用するトランスフェクションを含むが、これらに限定されるわけではない。

10

【0050】

MHC / ペプチド多量体

本発明の別の態様は、アミノ酸配列：REERYARFDS D V G E Y R（配列番号：1）（本明細書において、51 - 18とも呼ばれる）又は上記されたその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15 ~ 25個のアミノ酸の範囲の長さを有するペプチドを含む、MHC / ペプチド多量体である。

【0051】

本発明の一実施態様では、前記ペプチドは、最大で15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のアミノ酸を含む。

20

【0052】

特定の実施態様では、前記MHC / ペプチド多量体は、アミノ酸配列：REERYARFDS D V G E Y R（配列番号：1）（本明細書において、51 - 18とも呼ばれる）又は上記されたその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長のペプチドを含む。

【0053】

本明細書で使用する場合、「MHC / ペプチド多量体」という用語は、本発明のペプチドがロードされた主要組織適合複合体（MHC）タンパク質サブユニットで構成された、安定した多量体複合体を意味する。本発明に基づいて、前記MHC / ペプチド多量体（本明細書において、MHC / ペプチド複合体とも呼ばれる）は、MHC / ペプチド二量体、三量体、四量体、又は五量体を含むが、これらに限定されるわけではない。

30

【0054】

「主要組織適合複合体」（MHC）という用語は、ヒト白血球抗原（HLA）を含む種々の種において説明された、組織適合抗原系を包含することを意味する総称である。

【0055】

本発明の一実施態様では、MHC / ペプチド多量体は、MHCクラスI / ペプチド多量体である。

【0056】

本発明の特定の実施態様では、前記MHC / ペプチド多量体は、ラットMHCRT1 . A^g / ペプチド多量体である。また、非古典的なラットMHCクラスI分子も、本発明の文脈内に包含されることにも更に留意する必要がある。

40

【0057】

別の特定の実施態様では、MHC / ペプチド多量体は、MHCクラスI / ペプチド多量体に対応するHLAである。

【0058】

ヒトにおいて、MHCクラスI分子をコードする、3種類の主な遺伝的ローカス：HLA - A、HLA - B、及びHLA - Cが存在する（ヒトのMHC分子は、ヒト白血球抗原（HLA）とも指定される）。HLA - A*01、HLA - A*02、及びHLA - A*11が、これらのローカスから発現することができる種々のMHCクラスIアレルの例で

50

ある。

【0059】

また、非古典的ヒトMHCクラスI分子、例えば、HLA-E（マウスにおける機能性ホモログは、Qa-1bと呼ばれる）及びMICA/B分子も、本発明の文脈内に包含されることも、更に留意する必要がある。

【0060】

したがって、MHC/ペプチド多量体は、HLA-A/ペプチド多量体、HLA-B/ペプチド多量体、HLA-C/ペプチド多量体、HLA-E/ペプチド多量体、MICA/ペプチド多量体、及びMICB/ペプチド多量体からなる群より選択されるHLA/ペプチド多量体である。

10

【0061】

一実施態様において、前記単離されたペプチドは、

【表5】

- REEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 1);
 NREEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 2);
 REEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 3);
 REEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 4);
 QEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 5);
 REEYARFDSVDGVYR (配列番号: 6);
 NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7);
 NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8);
 NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9) 又は
 NREEYARFDSVDGVYR (配列番号: 10).

からなる群より選択される。

30

【0062】

MHC/ペプチド四量体を得るための方法は、国際公開公報第96/26962号及び同第01/18053号に記載されている。これらの文献は、参照により組み入れられる。

【0063】

本発明の一実施態様では、前記MHC/ペプチド多量体は、上記されたMHCクラスI RT1.A^a/ペプチド複合体又はMHCクラスI/ペプチド複合体に対応するHLAに特異的なT細胞集団を可視化するのに使用することができる。

【0064】

MHC/ペプチド多量体は、MHCの重鎖がビオチン化されている多量体でもよい。このビオチン化により、ストレプトアビジンとの四量体としての組み合わせが可能である。このようなMHC/ペプチド四量体は、適切なTCR-担体Tリンパ球に対する向上したアビジティを有するため、免疫蛍光法により反応性集団を可視化するのに使用することができる。

40

【0065】

本発明の別の実施態様では、前記MHC/ペプチド多量体は、上記されたMHC/ペプチド複合体に特異的なT細胞集団をスクリーニングすることにより（フローサイトメトリーにおいて、又は、免疫磁性スクリーニングにより）、検出及び/又は単離に使用することができる。

50

【 0 0 6 6 】

本発明の特定の実施態様では、MHCクラスI RT1 . A^a / ペプチド多量体又はMHCクラスI / ペプチド多量体に対応するHLAは、上記された前記MHCクラスI RT1 . A^a / ペプチド複合体又はMHCクラスI / ペプチド多量体に対応する前記HLAに特異的なT細胞集団をスクリーニングすることにより（フローサイトメトリーにおいて、又は、免疫磁性スクリーニングにより）、検出及び/又は単離に使用することができる。

【 0 0 6 7 】

本発明の別の態様は、上記されたMHC / ペプチド多量体をコートした、ビーズ、マイクロスフェア、又はナノ粒子である。

10

【 0 0 6 8 】

抗原提示細胞及びその使用

本発明の別の態様は、上記された本発明のMHC / ペプチド多量体を含むペプチド提示細胞である。

【 0 0 6 9 】

本発明の一実施態様では、前記MHC / ペプチド多量体は、MHCクラスI RT1 . A^a / ペプチド多量体である。

【 0 0 7 0 】

別の特定の実施態様では、MHC / ペプチド多量体は、上記で定義されたMHCクラスI / ペプチド多量体に対応するHLAである。

20

【 0 0 7 1 】

したがって、MHC / ペプチド多量体は、HLA - A / ペプチド多量体、HLA - B / ペプチド多量体、HLA - C / ペプチド多量体、HLA - E / ペプチド多量体、MICA / ペプチド多量体、及びMICB / ペプチド多量体からなる群より選択されるHLA / ペプチド多量体である。

【 0 0 7 2 】

一実施態様において、前記ペプチドは、

【表 6】

REEYARFSDVGEYR (配列番号: 1);
 NREEYARFSDVGEYR (配列番号: 2);
 REEYARFSDVGEFR (配列番号: 3);
 REEYVRFSDVGEYR (配列番号: 4);
 QEEYARFSDVGEYR (配列番号: 5);
 REEYARFSDVGVYR (配列番号: 6);
 NREEYARFSDVGEFR (配列番号: 7);
 NREEYVRFSDVGEYR (配列番号: 8);
 NQEEYARFSDVGEYR (配列番号: 9) 又は
 NREEYARFSDVGVYR (配列番号: 10).

からなる群より選択される。

【 0 0 7 3 】

本発明の一実施態様では、前記抗原提示細胞は、処置されるべき患者から得られる。

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用する場合、「抗原提示細胞」(APC)という用語は、本明細書におい

50

て、「ペプチド提示細胞」とも呼ばれ、互換的に使用され、抗原を内部移行及び処理可能な免疫細胞のクラスを意味する。これにより、抗原決定基が、免疫系（例えば、MHCクラスI制限細胞傷害性Tリンパ球及び/又はMHCクラスII制限ヘルパーTリンパ球）により認識されることができする方法において、MHC会合複合体として細胞表面上に提示される。細胞をAPCとして機能させる2つの必須の特性は、細胞内に取り込まれた抗原を処理する能力及びMHC遺伝子産物の発現である。APCの例は、樹状細胞（DC）、単核食細胞（例えば、マクロファージ）、Bリンパ球、皮膚のランゲルハンス細胞、及び、ヒトにおいては、内皮細胞を含む。

【0075】

本発明の一実施態様では、前記APCは、形質細胞様樹状細胞（pDC）である。

10

【0076】

本明細書で使用する場合、「形質細胞様樹状細胞」（pDC）という用語は、血中を循環し、末梢のリンパ器官に見出される、生来の免疫細胞を意味する。pDCは、末梢血単核細胞（PBMC）グループに属する細胞グループを構成する。ヒトpDCは、典型的には、表面マーカーであるIL-3レセプターα鎖（IL-3Ra、CD123）、BDCA-2（CD303）、及びBDCA-4（CD304）を発現しているが、CD11c又はCD14を発現していない。pDCは、これらにより従来の樹状細胞又は単球とは区別される。

【0077】

本発明の一実施態様では、前記pDCは、成熟pDCである。成熟pDCは、典型的には、表面マーカーであるHLA-DR、CD86を発現しており、多量のIFNアルファ及びIFNベータを産生する。

20

【0078】

本発明のこのようなAPCを調製するために、抗原提示能を有する細胞を、処置されるべき患者から単離し、*ex vivo*において、本発明のペプチドによりパルスして、MHC分子を有する複合体を形成する。

【0079】

樹状細胞を使用する場合、本発明のAPCを、以下のようにして調製することができる。リンパ球を、処置されるべき患者の末梢血から、フィコール法により単離する。付着細胞を、付着しなかった細胞から分離する。ついで、この付着細胞を、GM-CSF及びIL-4の存在下で培養して、樹状細胞に誘導する。この樹状細胞を、本発明のペプチドと共に培養することによりパルスして、本発明のAPCを得る。樹状細胞を、抗原が内部移行及びこの樹状細胞表面に提示可能な十分な時間、ペプチドに曝す必要がある。ついで、得られた樹状細胞を、処置されるべき患者に再投与することができる。このような方法は、国際公開公報第93/208185号及び欧州特許第0563485号に記載されている。これらの文献は、参照により組み入れられる。

30

【0080】

Tリンパ球及びその使用

本発明の別の態様は、アミノ酸配列：REELYARFDS DVGEYR（配列番号：1）又は本発明のその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長のペプチドを特異的に認識するTリンパ球である。

40

【0081】

一実施態様において、前記ペプチドは、

【表 7】

REEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 1);
 NREEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 2);
 REEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 3);
 REEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 4);
 QEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 5);
 REEYARFDSVDVG VYR (配列番号: 6);
 NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7);
 NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8);
 NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9) 又は
 NREEYARFDSVDVG VYR (配列番号: 10).

からなる群より選択される。

【0082】

本発明の一実施態様では、前記Tリンパ球は、レギュラトリーTリンパ球 (Treg) である。本発明の別の実施態様では、前記Tリンパ球は、Tregクローンである。

【0083】

本明細書で使用する場合、「レギュラトリーT細胞」又は「レギュラトリーTリンパ球」という用語は、互換的に使用され、*in vitro*において、レスポンダーT細胞の増殖を優先的に抑制し、過剰な免疫応答に関連する、又は、同免疫応用により生じる疾患及び症状、例えば、自己免疫疾患、移植拒絶、又は移植片対宿主病等を防止する能力を有するTリンパ球の特定集団を意味する。Tregは、 $CD4^+CD25^+$ 細胞集団として元々特定されたが、フォークヘッドファミリー転写因子であるFoxP3の発現によっても特徴付けられる。またごく最近、 $CD8^+$ Treg細胞も、以前に記載されたように特定されている。

【0084】

特定の実施態様では、前記Tregは、 $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregである。

【0085】

別の実施態様では、前記Tリンパ球は、本発明のペプチドを特異的に認識するTCRを発現する、遺伝的に改変されたTリンパ球である。

【0086】

したがって、Tリンパ球は、偏って制限されたTCRレパトリーを発現している。偏った(TCR)は、当業者に周知である。TCRの偏りの例は、古典的な多型の主要組織適合複合体(MHC)制限免疫応答において観察され、説明されている(64)。

【0087】

レギュラトリーT細胞集団を得るための方法

別の態様では、本発明は、アミノ酸配列: REEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 1) 又は本発明のその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15~40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドを含む培養培地により、樹状細胞集団の存在下において、Treg集団を培養する工程を含む、Treg集団を生成するための*in vitro*又は*ex vivo*法に関する。

【0088】

20

30

40

50

一実施態様において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：R L L A R L I Y N R E E Y A R F D S D V G E Y R A V T E L G R P S A E Y R N K Q（配列番号：28）又はその機能保存変異体からなる。

【0089】

一実施態様において、本発明は、本発明の単離されたペプチドを含む培養培地により、形質細胞様樹状細胞（pDC）集団の存在下において、 $CD8^+$ Treg 集団を培養する工程を含む、 $CD8^+CD45RC^{low}$ Treg 集団を生成するための *in vitro* 又は *ex vivo* 法に関する。

【0090】

一実施態様において、pDCは、成熟pDCである。

【0091】

一実施態様において、前記単離されたペプチドは、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）（本明細書において、51-18とも呼ばれる）又はその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長の単離されたペプチドである。

【0092】

特定の実施態様において、前記単離されたペプチドは、

【表8】

- REEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 1);
- NREEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 2);
- REEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 3);
- REEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 4);
- QEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 5);
- REEYARFDSVDGVYR (配列番号: 6);
- NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7);
- NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8);
- NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9) 又は
- NREEYARFDSVDGVYR (配列番号: 10).

からなる群より選択される。

【0093】

本明細書で使用する場合、「培養培地」という用語は、T細胞の増殖及びレギュラトリーT細胞への分化を支持可能な任意の培地を意味する。典型的には、培養培地は、栄養（炭素源、アミノ酸）、pHバッファー、及び塩を含有する基礎培地からなり、成長因子及び/又は抗生物質を添加することができる。典型的には、基礎培地は、RPMI 1640、DMEM、IMDM、X-VIVO、又はAIM-V培地であることができる。これらは全て、市販の標準的な培地である。

【0094】

ナイーブなT細胞の増殖及びレギュラトリーT細胞への分化を支持するであろう好ましい培地配合は、合成培地（CDM）を含む。本明細書で使用する場合、「合成培地」（CDM）という用語は、特定成分、好ましくは、公知の化学構造の成分のみを含有する、細胞を培養するための栄養液を意味する。合成培地は、血清フリー及びフィーダーフリーの培地である。

【0095】

pDC集団の存在下において本発明のペプチドと共にCD8⁺ Treg集団を培養する工程は、pDCによるCD8⁺ Tregに対する前記ペプチドの提示に必要とされる時間行うものとする。

【0096】

典型的には、pDC集団の存在下において本発明のペプチドと共にCD8⁺ Treg集団を培養するのは、1日～1週間以上行うものとする。

【0097】

特定の実施態様では、前記方法は、レギュラトリーT細胞集団を単離することにより、生成する更なる工程を含んでもよい。

10

【0098】

あるいは、本発明は、上記で定義された本発明のMHC/ペプチド多量体を含む培養培地により、Treg集団を培養する工程を含む、Treg集団を生成するためのin vitro又はex vivo法に関する。

【0099】

一実施態様において、本発明は、上記で定義された本発明のMHC/ペプチド多量体を含む培養培地により、CD8⁺ Treg集団を培養する工程を含む、CD8⁺CD45RC^{low} Treg集団を生成するためのin vitro又はex vivo法に関する。

【0100】

一実施態様において、該多量体は、ナノ粒子上にコートされている。このため、このナノ粒子は、本発明のMHC/ペプチド多量体をその表面に提示する。

20

【0101】

本発明の文脈内において、ナノ粒子は、小型で、Tregにより認識されるのに十分小さいものである。好ましい実施態様では、ナノ粒子は、0.5～10nm、より好ましくは1～2.5nmの平均径を有するコアを有する。

【0102】

ナノ粒子のコアは、ポリマー製のコアでもよい。好ましくは、ナノ粒子は、炭水化物系ポリマー（例えば、セルロース系ナノ粒子、キトサン系ナノ粒子）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、及びPEGとPPGとのコポリマー、PEGとカプロラクトン、PEGとラクチド、及びPEGと[ラクチド-コ-グリコリド]を含有する分岐コポリマーからなる群より選択されるポリマーを含む。

30

【0103】

また、ナノ粒子のコアは、金属製のコアでもよい。好ましくは、金属製のコアは、Au、Ag、又はCu、例えば、Au/Ag、Au/Cu、Au/Ag/Cu、Au/Pt、Au/Pd、Au/Ag/Cu/Pd、Au/Fe、Au/Cu、Au/Gd、Au/Fe/Cu、Au/Fe/Gd、又はAu/Fe/Cu/Gdから選択される合金を含む。

【0104】

好ましくは、ナノ粒子は、大部分の有機溶媒、及び特に、水に可溶性である。ナノ粒子は、当技術分野において周知の技術に基づいて調製することができる。

40

【0105】

一実施態様において、本発明は、上記で定義された本発明のMHC/ペプチド多量体でコートしたナノ粒子を含む培養培地により、CD8⁺ Treg集団を培養する工程を含む、CD8⁺CD45RC^{low} Treg集団を生成するためのin vitro又はex vivo法に関する。

【0106】

別の態様では、本発明は、先に記載された方法のいずれか1つにより得られたTreg集団、特に、CD8⁺CD45RC^{low} Treg集団に関する。

【0107】

医薬組成物

50

本発明の別の態様は、

- a) アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R (配列番号：1) もしくはその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチド、又は
- b) 本発明のペプチドをコードする核酸、又は
- c) このような核酸を含むベクター、又は
- d) このような発現ベクターを含む宿主細胞、又は
- e) 複合体MHC分子及び本発明のペプチド、又は
- f) 複合体MHC分子及び本発明のペプチドを含む抗原提示細胞、又は
- g) 本発明のペプチドを特異的に認識するTリンパ球と、
薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬組成物に関する。

10

【0108】

特定の実施態様では、前記ペプチドは、アミノ酸配列：R L L A R L I Y N R E E Y A R F D S D V G E Y R A V T E L G R P S A E Y R N K Q (配列番号：28) 又はその機能保存変異体からなる。

【0109】

一実施態様において、前記医薬組成物は、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R (配列番号：1) 又はその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長の単離されたペプチドを含む。

【0110】

特定の実施態様では、前記医薬組成物は、

【表9】

- REEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 1);
- NREEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 2);
- REEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 3);
- REEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 4);
- QEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 5);
- REEYARFDSVDVGVYR (配列番号: 6);
- NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7);
- NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8);
- NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9) 又は
- NREEYARFDSVDVGVYR (配列番号: 10).

20

からなる群より選択される単離されたペプチドを含む。

40

【0111】

上記された本発明のいずれかの治療剤は、薬学的許容し得る賦形剤、及び場合により、持続放出性マトリックス、例えば、生分解性ポリマーと組み合わせられて、治療組成物を形成することができる。

【0112】

「薬学的に」又は「薬学的に許容し得る」は、哺乳類、特に、ヒトに適切に投与された場合、有害で、アレルギー性又は他の不都合な反応を生じさせない分子実体及び組成を意味する。薬学的に許容し得る担体又は賦形剤は、任意の種類、無毒性の固体、半固体、又は液体状の充填材、希釈剤、封入材料、又は配合助剤を意味する。

50

【0113】

医薬組成物の形態、投与経路、用量、及び投与計画は、患者の処置されるべき症状、疾患の重篤さ、年齢、体重、及び性別等により自ずと決まる。

【0114】

本発明の医薬組成物は、局所、経口、鼻内、眼内、静脈内、筋肉内、又は皮下投与用に配合することができる。好ましくは、医薬組成物は、注射可能な配合のための薬学的に許容し得る媒体を含有する。これらは、特に、等張性で無菌の生理食塩水（リン酸ナトリウムもしくはリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウム、もしくはマグネシウム等、又はこのような塩の混合物）又は、乾燥、特に、凍結乾燥させた組成物でもよい。凍結乾燥組成物の場合には、注射液構成を可能にする滅菌水又は生理食塩水を加えてもよい。

10

【0115】

投与に使用される用量は、種々のパラメータの関数として、特に、使用される投与方式、関連する病理、あるいは、所望の処置期間の関数として採用することができる。例えば、化合物の用量を、所望の治療効果を達成するのに必要とされる用量より低いレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで、用量を徐々に増大させることは、十分当業者の範囲内である。ただし、製品の日量は、成人1日当たりに、0.01~1,000mgの広い範囲にわたって変動させることができる。好ましくは、本組成物は、処置されるべき対象に対する用量の症候調節のために、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250、及び500mg

活性成分を含有する。医薬は、典型的には、約0.01mg~約500mg活性成分、好ましくは、1mg~約100mg活性成分を含有する。有効量の薬剤は、通常、1日当たり体重1kg当たりに、0.0002mg~約20mg、特に1日当たり体重1kg当たりに、約0.001mg~7mgの用量レベルで供給される。

20

【0116】

医薬組成物を調製するために、有効量の本発明のポリペプチド又は核酸を、薬学的に許容し得る担体又は水性媒体中に、溶解又は分散させることができる。

【0117】

注射用途に適した薬学的形態は、無菌水溶液又は分散液；ゴマ油、ピーナッツ油、又は水性ポリエチレングリコールを含む製剤；及び、無菌注射液又は分散液の即席調製のための無菌粉末を含む。全ての場合において、これらの形態は、無菌でなければならず、容易に注射針を通過する程度に流動性を有しなければならない。これらの形態は、製造及び保管の条件下において安定でなければならず、微生物、例えば、細菌及び真菌の汚染活動に対して保存されなければならない。

30

【0118】

遊離塩基又は薬理的に許容し得る塩としての活性化合物の溶液を、界面活性剤、例えば、ヒドロキシプロピルセルロースと安定的に混合された水中において調製することができる。また、分散液は、グリセロール、液状ポリエチレングリコール、それらの混合物中、及び油中においても調製することができる。保存及び使用の通常条件下において、これらの調製物は、微生物の増殖を防止する保存剤を含有する。

40

【0119】

本発明のペプチド及び本発明の他の治療剤は、中性又は塩の形態で組成物に配合することができる。薬学的に許容し得る塩は、（タンパク質の遊離アミノ基により形成された）酸付加塩を含む。酸付加塩は、無機酸、例えば、塩酸もしくはリン酸等、又は、有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等と形成される。また、遊離カルボキシル基により形成された塩は、無機塩基、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、もしくは鉄、及び、有機塩基、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等から得ることができる。

【0120】

また、担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピ

50

レングリコール、及び液状ポリエチレングリコール等)、それらの適切な混合物、及び植物油を含有する、溶媒又は分散媒体でもよい。適切な流動性は、例えば、コーティング、例えば、レシチンの使用により、分散液の場合には、必要とされる粒径の維持により、及び、界面活性剤の使用により維持することができる。微生物活動の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によりもたすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムを含むのが好ましいであろう。注射組成物の持続性吸収は、吸収を遅延させる作用剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に使用することによりもたすことができる。

【0121】

無菌注射液は、必要とされる量で活性化化合物を、上記列記された他の成分の幾つかと共に適切な溶媒中に包含させ、必要に応じて、ろ過滅菌することにより調製される。一般的には、分散液は、種々の無菌の活性成分を、基礎分散媒体及び上記列記された成分から必要とされる他の成分を含有する無菌の媒体中に包含させることにより調製される。無菌の注射液調製用の無菌粉末の場合には、好ましい調製法は、その予め無菌ろ過された溶液から、任意の更なる所望の成分を含む活性成分の粉末を産生する、真空乾燥及び凍結乾燥技術である。

【0122】

また、直接注入のためのより濃縮され、又は、高度に濃縮された溶液の調製も考慮される。この場合、極度に速い浸透、小さい領域への高濃度の活性剤の送達をもたらすために、溶媒としてのDMSOの使用が想定される。

【0123】

配合に基づいて、溶液は、投与製剤に適合する方法において、治療的に有効な量で投与されるであろう。この配合は、各種の剤型、例えば、上記された注射液の剤型で容易に投与される。ただし、薬剤放出カプセル剤等も利用することができる。

【0124】

水溶液における非経口投与のために、例えば、この溶液を、適切に緩衝させてもよく、まず、液状の希釈剤を、十分な生理食塩水又はグルコースで等張性にする。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、及び腹腔内投与に特に適している。この点について、利用することができる無菌水性媒体は、本開示を考慮して、当業者に公知であろう。例えば、1回分の投与量を、等張性NaCl溶液 1 mLに溶解させ、皮下点滴流体 1000 mLに加えるか、又は、目的の注入部位に注入するかのいずれかを行うことができる(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」 15th Edition, pages 1035 1038 and 1570 1580を参照のこと)。用量におけるいくらかの変動が、処置される対象の症状に応じて、必然的に生じるであろう。いずれにしても、投与を担う者が、個々の対象に適切な用量を決定するであろう。

【0125】

非経口投与、例えば、静脈内又は筋肉内注射用に配合された化合物に加えて、他の薬学的に許容し得る形態は、例えば、錠剤又は経口投与用の他の固体、徐放性カプセル剤、及び現在使用されている任意の他の形態を含む。

【0126】

治療法及び用途

本発明は、免疫寛容の誘導を必要とする患者において免疫寛容を誘導するのに使用するための、方法及び組成物(例えば、医薬組成物)を提供する。

【0127】

また、本発明は、移植拒絶の予防又は減少を必要とする患者において移植拒絶を予防又は減少させるのに使用するための、方法及び組成物を提供する。

【0128】

したがって、本発明は、薬剤として使用するための、アミノ酸配列: REEYARFDSDVGEYR(配列番号: 1)(本明細書において、51-18とも呼ばれる)又は上

10

20

30

40

50

記で定義されたその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドに関する。

【0129】

一実施態様において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：RLLARLIYNREYYARFDSVDVGEYRAVTELG RPSAEYRNKQ（配列番号：28）又はその機能保存変異体からなる。

【0130】

一実施態様において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：REYYARFDSVDVGEYR（配列番号：1）又はその機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長の単離されたペプチドである。

【0131】

別の態様では、本発明は、免疫寛容の誘導を必要とする患者において免疫寛容を誘導するのに使用するための、アミノ酸配列：REYYARFDSVDVGEYR（配列番号：1）（本明細書において、51-18とも呼ばれる）又は上記で定義されたその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドに関する。

【0132】

一実施態様において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：RLLARLIYNREYYARFDSVDVGEYRAVTELG RPSAEYRNKQ（配列番号：28）又はその機能保存変異体からなる。

【0133】

一実施態様において、前記ペプチドは、免疫寛容の誘導を必要とする患者において免疫寛容を誘導するのに使用するための、アミノ酸配列：REYYARFDSVDVGEYR（配列番号：1）又は機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長の単離されたペプチドである。

【0134】

本明細書で使用する場合、「免疫寛容」という用語は、免疫応答を誘導する能力を有する物質又は組織に対する、免疫系の無応答状態を意味する。本発明のペプチドは、前記移植物の移植に基づく移植物に対する寛容又は部分的な寛容を達成するのに有用である。本明細書で使用する場合、「部分的な寛容」は、免疫応答の低下をもたらす部分的な免疫寛容である。

【0135】

本明細書で使用する場合、「免疫応答」という用語は、T細胞媒介性及び/又はB細胞媒介性の免疫応答を含む。例示的な免疫応答は、T細胞応答、例えば、サイトカイン産生及び細胞性細胞傷害を含む。加えて、免疫応答という用語は、T細胞活性化により間接的に達成される免疫応答、例えば、抗体産生（体液性応答）及びサイトカイン応答性細胞、例えば、マクロファージの活性化を含む。免疫応答に参与する免疫細胞は、リンパ球、例えば、B細胞及びT細胞（CD4⁺、CD8⁺、Th1、及びTh2細胞）；抗原提示細胞（例えば、プロフェッショナル抗原提示細胞、例えば、樹状細胞）；ナチュラルキラー細胞；骨髄系細胞、例えば、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、及び顆粒球を含む。

【0136】

例えば、免疫応答は、移植拒絶及び、このような免疫反応に伴う生理学的結果、例えば、間質性線維症、慢性移植片動脈硬化症、又は血管炎等に関与する。

【0137】

したがって、本発明のペプチド（及び、本発明のMHC/ペプチド多量体、又は、本明細書で定義されたペプチド特異的Treg）により処置された患者は、処置されていない患者と比較して、下記の生理学的特徴：a）（少なくとも部分的にB細胞媒介性免疫応答、特に、ドナー特異的抗体により媒介されると考えられる）移植物に対する免疫応答レベルの低下、b）移植物に対する免疫応答の開始もしくは進行の遅延、又は、c）移植物に

10

20

30

40

50

対する免疫応答の開始もしくは進行リスクの低下を表わす。

【0138】

「それを必要とする患者」は、処置されるべき移植拒絶を患う、又は、同移植拒絶を患う可能性がある個体を意味する。本発明の枠組みにおいて処置されるべき個体は、哺乳類、好ましくは、ヒトである。

【0139】

更に別の態様では、本発明は、移植拒絶の予防又は減少を必要とする患者において移植拒絶を予防又は減少させるのに使用するのための、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）（本明細書において、51 - 18とも呼ばれる）又は上記で定義されたその機能保存変異体を含むMHCクラスII分子由来の、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドに関する。

10

【0140】

一実施態様において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：R L L A R L I Y N R E E Y A R F D S D V G E Y R A V T E L G R P S A E Y R N K Q（配列番号：28）又はその機能保存変異体からなる。

【0141】

一実施態様において、前記ペプチドは、アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）又は機能保存変異体を含むか、又は、からなる、15又は16個のアミノ酸長の単離されたペプチドである。

【0142】

本明細書で使用する場合、「移植拒絶を予防又は減少させる」という用語は、免疫移植拒絶の予防又は防止、及び、免疫移植拒絶の開始又は進行の遅延を包含するのを意味する。また、この用語は、患者における移植体生存の延長、又は、患者における移植体の機能不全の逆行を包含するのをも意味する。さらに、この用語は、例えば、免疫拒絶に関連する免疫学的合併症、例えば、間質性線維症、慢性移植片動脈硬化、又は血管炎等の緩和を含む、免疫移植拒絶兆候の緩和を包含するのをも意味する。

20

【0143】

本明細書で使用する場合、「移植拒絶」という用語は、急性及び慢性の移植拒絶を両方とも包含する。「急性拒絶」は、移植された組織が免疫学的に外来性である場合の、組織移植レシピエントの免疫系による拒絶である。急性拒絶は、レシピエントの免疫細胞による移植組織の浸潤により特徴付けられる。同免疫細胞は、そのエフェクター機能を実行し、移植組織を破壊する。急性拒絶の開始は急速であり、一般的には、ヒトにおいて移植手術後数週間以内に生じる。一般的には、急性拒絶は、免疫抑制剤、例えば、ラパマイシン、シクロスポリン等により阻害又はサプレッションすることができる。「慢性拒絶」は、一般的には、ヒトにおいて、急性拒絶の成功した免疫抑制の存在下であっても、移植後数か月～数年以内に生じる。線維症は、全種類の臓器移植の慢性拒絶に共通する要因である。

30

【0144】

「移植」という用語及びそのバリエーションは、移植が同系（ドナーとレシピエントとが遺伝的に同一である場合）、同種（ドナーとレシピエントとが異なる遺伝的起源であるが、同じ種である場合）、又は異種（ドナーとレシピエントとが異なる種である場合）であるかに関わらず、移植体（移植片とも呼ばれる）のレシピエントへの挿入を意味する。このため、典型的なシナリオにおいて、ホストはヒトであり、移植片は、同じか又は異なる遺伝的起源のヒトから得られた同系移植片である。別のシナリオでは、移植片は、移植される種とは異なる種（系統学的に大きく離れた種の動物を含む）から得られる。例えば、ヒトの心臓は、ヒトのホストに移植される。

40

【0145】

一実施態様において、移植体のドナーは、ヒトである。移植体のドナーは、生きていますドナー又は死亡したドナー、いわゆる、死体ドナーであることができる。

【0146】

50

一実施態様において、移植物は、臓器、組織、又は細胞である。

【0147】

本明細書で使用する場合、「臓器」という用語は、生物における特定の機能又は機能群を行う固体血管柄付臓器を意味する。臓器という用語は、心臓、肺、腎臓、肝臓、膵臓、皮膚、子宮、骨、軟骨、小腸又は大腸、膀胱、脳、乳房、血管、食道、卵管、胆嚢、卵巣、膵臓、前立腺、胎盤、脊髄、上肢及び下肢を含む肢、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿管、尿道、子宮を含むが、これらに限定されるわけではない。本明細書で使用する場合、「組織」という用語は、ヒト又は動物における任意の種類組織を意味し、血管組織、皮膚組織、肝臓組織、膵臓組織、神経組織、泌尿生殖器組織、消化管組織、骨及び軟骨を含む骨格組織、脂肪組織、腱及び靭帯を含む結合組織、羊水組織、絨毛組織、硬膜、心膜、筋肉組織、腺組織、顔組織、眼組織を含むが、これらに限定されるわけではない。

10

【0148】

本発明の特定の実施態様では、移植物は、心臓の移植臓器である。

【0149】

本明細書で使用する場合、「細胞」という用語は、対象となる細胞について濃縮された組成物、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、更により好ましくは少なくとも65%の前記細胞を含む組成物を意味する。

【0150】

特定の実施態様では、細胞は、骨髄、末梢血、又は臍帯血由来の多分化性造血幹細胞、又は、多能性（すなわち、胚性幹細胞（ES）又は誘導多能性幹細胞（iPS））、又は、種々の細胞系統の多能性幹細胞由来の分化細胞、例えば、心筋細胞、ベータ-膵細胞、肝細胞、ニューロン等...からなる群より選択される。

20

【0151】

一実施態様において、細胞組成物は、同種造血幹細胞移植（HSCT）に使用されるため、通常、骨髄、末梢血、又は臍帯血由来の多分化性造血幹細胞を含む。

【0152】

HSCTは、白血病及びリンパ腫を患う患者に治療的であることができる。ただし、同種HSCTの重大な制限は、この治療を受けた約30~50%のヒトに重篤な症状で起こる移植片対宿主病（GVHD）の進行である。

30

【0153】

本発明のペプチドは、免疫寛容を誘導することにより、移植片対宿主病（GVHD）を予防又は減少させるのに有用である。

【0154】

したがって、一実施態様において、それを必要とする患者は、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ球性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、骨髄形成異常症候群（MDS）/骨髄増殖症候群、リンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、及び多発性骨髄腫からなる群より選択される疾患に冒されている。

【0155】

別の態様では、本発明は、免疫寛容の誘導を必要とする患者において免疫寛容を誘導するのに使用するための、

- a) 本発明のペプチドをコードする核酸、又は
- b) このような核酸を含むベクター、又は
- c) このような発現ベクターを含む宿主細胞、又は
- d) 本発明のMHC/ペプチド多量体、又は
- e) 複合体MHC分子及び本発明のペプチドを含む抗原提示細胞、又は
- f) 本発明のペプチドを特異的に認識するTリンパ球に関する。

40

【0156】

更に別の態様では、本発明は、移植拒絶の予防又は減少を必要とする患者において移植

50

拒絶を予防又は減少させるのに使用するための、

- a) 本発明のペプチドをコードする核酸、又は
- b) このような核酸を含むベクター、又は
- c) このような発現ベクターを含むホスト細胞、又は
- d) 本発明のMHC / ペプチド多量体、又は
- e) 複合体MHC分子及び本発明のペプチドを含む抗原提示細胞、又は
- f) 本発明のペプチドを特異的に認識するTリンパ球に関する。

【0157】

本発明の別の態様は、免疫寛容の誘導を必要とする患者において免疫寛容を誘導するための方法であって、予防的に有効な量の、上記された本発明の単離されたペプチド、又は、本発明の核酸、又は、本発明の発現ベクター、又は、本発明のホスト細胞、又は、本発明のMHC / ペプチド多量体、又は、本発明のペプチドを特異的に認識するTリンパ球を、前記患者に投与する工程を含む、方法に関する。

10

【0158】

本発明の別の態様は、移植拒絶の予防又は減少を必要とする患者において移植拒絶を予防又は減少させるための方法であって、予防的に有効な量の、上記された本発明の単離されたペプチド、又は、本発明の核酸、又は、本発明の発現ベクター、又は、本発明のホスト細胞、本発明のMHC / ペプチド多量体、又は、本発明のペプチドを特異的に認識するTリンパ球を、前記患者に投与する工程を含む、方法に関する。

【0159】

本明細書で使用する場合、「予防的に有効な量」という用語は、患者における移植拒絶を予防、減少、緩和、又は遅延させるのに必要な活性剤の最少量を意図している。

20

【0160】

本発明の診断方法

更なる態様では、本発明は、移植患者（レシピエント）が寛容であるかを判定するための *in vitro* 法であって、前記移植患者から得られた生体サンプル中の $CD8^+ CD45RC^{low} Treg$ の存在を判定する工程を含み、 $CD8^+ CD45RC^{low} Treg$ の存在が寛容を示す、方法に関する。

【0161】

本明細書で使用する場合、「判定する」という用語は、対照又は所定値に対する参照の有無に関わらず、定性的及び / 又は定量的検出（すなわち、検出及び / 又は量の測定）を含む。本明細書で使用する場合、「検出する」は、 $CD8^+ CD45RC^{low} Treg$ が生体サンプル中に存在するか否かを判定することを意味する。「測定する」は、生体サンプル中の $CD8^+ CD45RC^{low} Treg$ の量を決定することを意味する。

30

【0162】

本明細書で使用する場合、「生体サンプル」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、*in vitro* での評価の目的のために、患者から得ることができる任意のサンプルを意味する。好ましい生体サンプルは、血液サンプル（例えば、全血サンプル、血清サンプル、又は血漿サンプル）である。

【0163】

例えば、 $CD8^+ CD45RC^{low} Treg$ の存在の判定は、生体サンプルを、選択試薬、例えば、抗体と接触させることにより、前記生体サンプル中の対象となる細胞の元からの存在を検出し、又は、同細胞量を測定する工程を含んでもよい。接触は、任意の適切な装置、例えば、プレート、マイクロタイターディッシュ、試験管、ウェル、ガラス、カラム等において行うことができる。

40

【0164】

したがって、本発明の方法は、生体サンプルを、前記生体サンプル中の $CD8^+ CD45RC^{low} Treg$ と選択的に相互作用可能な結合パートナーと接触させる工程を含む。

【0165】

50

本発明の一実施態様では、結合パートナーは、上記された本発明のペプチドを含むMHC / ペプチド多量体である。

【0166】

好ましい実施態様では、MHC / ペプチド多量体は、

【表10】

REEYARFSDSDVGEYR (配列番号: 1);
 NREEYARFSDSDVGEYR (配列番号: 2);
 REEYARFSDSDVGEFR (配列番号: 3);
 REEYVRFSDSDVGEYR (配列番号: 4);
 QEEYARFSDSDVGEYR (配列番号: 5);
 REEYARFSDSDGVYR (配列番号: 6);
 NREEYARFSDSDVGEFR (配列番号: 7),
 NREEYVRFSDSDVGEYR (配列番号: 8),
 NQEEYARFSDSDVGEYR (配列番号: 9) 又は
 NREEYARFSDSDGVYR (配列番号: 10).

からなる群より選択されるペプチドを含むMHC / ペプチド四量体である。

【0167】

一実施態様において、患者は、哺乳類、好ましくは、ヒトである。

【0168】

本発明は、以下の図面及び実施例により、更に例証されるであろう。ただし、これらの実施例及び図面は、本発明の範囲を限定すると全く解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0169】

【図1】ドナー由来ペプチド刺激に対する応答における $CD8^+CD45RC^{low}$ Treg 活性化の分析。(A) $CD8^+$ Treg を、ペプチドの存在下において、同系 CpG - 成熟 pDC と6日間共培養した。各実験について、pDC とのみ6日間共培養した後の $CD25$ 陽性 Treg の割合を、値1とした。平均値1は、 $32.85 \pm 1.98\%$ に等しい。結果を、ペプチド刺激後の $CD25$ 陽性細胞の割合と、ペプチドなしの対照条件での $CD25$ 陽性細胞の割合との間の比 \pm SEM として表わす。対照条件 (値1.0) に対する * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。各ペプチドについて、 $n = 4 \sim 18$ 。(B) Du51 のより短いペプチド誘導体に対する応答における Treg 活性化の分析。左側に、18個の Du - 51 誘導体が詳細に記載されており、aa 配列の長さにより、9aa ~ 15aa で分類されている。ボックスは、ドナーとレシピエント間でのミスマッチ aa を強調している。右側に、Du51 誘導体に対する応答における Treg 活性化を、 $CD25$ 発現により分析した。 $CD8^+$ Treg を、各ペプチドの存在下において、同系 CpG - 成熟 pDC と6日間共培養した。バーは、ペプチド刺激後の $CD25$ 陽性細胞の割合と、ペプチドなしの対照条件での $CD25$ 陽性細胞の割合との間の比を表わす。Du51 条件に対する * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。各ペプチドについて、 $n = 3 \sim 14$ 。

【図2】Du51 特異的 $CD40IgCD8^+$ Treg の *in vitro* 及び *in vivo* でのサブプレッシブ活性。(A) ドナー LEW.1W (直接的な経路) 又はアロ抗原ロードレシピエント LEW.1A (間接的な経路) の pDC のいずれかにより刺激した

30

40

50

、ナイーブなCFSEラベルLEW.1A CD4⁺CD25⁻ T細胞の増殖を、1:1のエフェクター:抑制剤比において、LEW.1Aのナイーブ、トータル、四量体⁻、又は四量体⁺ CD8⁺CD40Ig Tregの非存在又は存在下で、培養の6日後に分析した。CD4⁺CD25⁻ T細胞増殖は、約80%であり、各実験において100の値を与えた。グラフは、相対的なCD4⁺CD25⁻ T細胞増殖の平均±SEMを表わす。* p < 0.05。n = 4。(B) 2.5 × 10⁶個のトータル又は四量体⁻ CD8⁺CD40Ig Tregを、致死量以下で照射したレシピエント(LEW.1A)に、心臓のアロ移植(LEW.1W)前日に、i.v注入した。移植片生存を、心拍の腹部触診により評価した。四量体⁻ CD8⁺CD40Ig Treg (n = 3)に対して、トータル(n = 4)について、p < 0.01。

10

【図3】in vivoでのペプチドDu51注入後の寛容誘導。(A)レシピエントを、処置しない(n = 9)、移植前-6、-3日目、0日、移植後+3、及び+7日における0.5mgペプチドの5回の単独i.v注入で処置(n = 4)、又は、i.pミニ浸透圧ポンプ(ALZET)により、20.83µg/時間単独(Du51 0.5mg/日:n = 8)において、もしくは、枯渇性抗-CD8 mAb(OX8)(n = 6)もしくは抗-MHCクラスI mAb(OX18)(n = 5)との組み合わせ、又は、40.66µg/時間LEW.1W/LEW.1A(Du51 1mg/日:n = 5)もしくはBN/LEW.1A(Du51 1mg/日(BN/1A):n = 4)株の組み合わせのいずれかを-7日目から28日間送達する連続的なペプチド注入で処置するかのいずれかをした。未処置動物及び対照ペプチド0.5mg/日に対して、Du51 0.5mg/日について、** p < 0.01。Du51 0.5mg/日に対して、Du51 0.5mg/日+枯渇性抗-CD8 mAbについて、* p < 0.05。未処置動物に対して、Du51 1mg/日について、*** p < 0.001。BN/1Aの組み合わせにおけるDu51 1mg/日に対して、Du51 1mg/日について、** p < 0.01。Du51 0.5mg/日に対して、Du51 1mg/日について、* p < 0.05。(B)アロ抗体産生を、ナイーブ(n = 3)、同系移植(n = 3)、移植未処置(n = 3)、CD40Ig処置(n = 3)、長期Du51処置(n = 2)、及び拒絶Du51処置(n = 4)の動物において評価した。血清を、拒絶後30日未満又は移植後120日超で収集した。血清を、ドナーの脾細胞とインキュベートし、IgG、IgG1、IgG2a、又はIgG2b Ab産生について、フローサイトメトリーにより分析した。グラフは、MFI±SEMを表わす。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、**** p < 0.0001。(C)脾臓を、拒絶後又は120日目に回収した。細胞集団を染色し、フローサイトメトリーにより分析した。グラフは、いずれか(n = 12)、長期Du51処置(n = 2)、又は拒絶Du51処置レシピエント(n = 5)からのトータル脾臓における各部分集団の絶対数を表わす。(D)ナイーブ(n = 4)、長期Du51処置(n = 2)、又は拒絶Du51処置(n = 4)レシピエントの脾臓を、PE及びAPCにコンジュゲートさせたストレプトアビジンでラベルしたRT1.A⁺/Du51四量体とインキュベートした。結果を、CD8⁺Treg中の四量体⁺細胞の割合及び脾臓中の四量体⁺CD8⁺Tregの絶対数±SEMについて、グラフにプロットする。

20

30

【図4】Du51ペプチドの単剤治療による寛容の脾細胞媒介性伝達。A.LEW.1Aレシピエントを、-1日目に致死量以下で照射し(4.5Gy)、心臓移植及び、0日目に長期生存レシピエント又はナイーブな動物からの1,5 × 10⁸個の脾細胞のi.v注入を受けさせた。移植片生存を、腹部触診によりモニターした。B.IgGアロ抗体産生を、ナイーブ(n = 3)、移植片を拒絶した未処置レシピエント(n = 3)、及び移植後120日超の1回目のspl-送達長期レシピエントにおいて評価した。

40

【実施例】

【0170】

実施例: MHCII⁺アロペプチドが誘導する寛容

材料及び方法

動物及び心臓移植モデル

50

心臓のアロ移植を、以前に説明されたように(5)、全体としてMHC不一致の、LEW.1W(ドナーとしてのRT1.A^u)及びLEW.1A(レシピエントとしてのRT1.A^a)のメスラット間で行った。実験は、動物実験についての地方倫理委員会により承認された。

【0171】

アデノウイルス媒介性遺伝子伝達

ヒトIgG1の定常ドメインに融合したマウスCD40の細胞外部分をコードするAd(A d C D 4 0 I g)及びリコンビナント非コードアデノウイルス(A d) A d d 1 3 2 4と、移植組織内送達の手法とは、以前に記載されている(5)。簡潔に、アデノウイルス粒子(2.10¹⁰個の感染性粒子)を、心室壁内の3点にゆっくり注入した。

10

【0172】

ペプチドライブラリ

4aaのラギングを有する16mer オーバーラップペプチドライブラリを、以前に公開されたように(17~19)、MHC-I RT1.A^u(アルファ1、2、及び3ドメイン)、MHC-II RT1.B^u(全ドメイン)、及びMHC-II RT1.D^u(アルファ2及びベータ1ドメイン)の多型配列全体をカバーするように設計し、GL Biochem Ltd(Shanghai, China)により調製した。凍結乾燥させたペプチドを、0.4%無菌DMSO/滅菌水中に溶解させ、-80で保存した。対照ペプチドとして、in vitroにおいて、種々の同種非活性化ペプチド#7、26、及び39を使用し、in vivoにおいて、ペプチド#31を使用した。

20

【0173】

1~2aaのラギングを有する変性させた9~15mer オーバーラップペプチドを、ポジティブに単離された16mer ペプチドの配列をカバーするように設計し、GL Biochem Ltd(Shanghai, China)により合成した。

【0174】

全てのペプチドは、分析用逆相HPLCにより、95%を超える均一性を有することを示し、aa配列を確認した。ペプチドを、完全RMP1-1640中に、120µg/mLの濃度に希釈した。

【0175】

細胞精製

T細胞を、以前に記載されたように(6)精製した。簡潔に、トータル脾細胞を、抗-T細胞(V65)、抗-CD45RA細胞(OX33)、抗-CD161NK細胞(3.2.3)、及び抗-CD11b/c単球(OX42)のカクテルにより、磁性ビーズ(Dynal)を使用して枯渇させた。濃縮されたT細胞を、抗-CD45RC-ビオチン(OX22)及びストレプトアビジン-PE-Cy7、抗-CD8-PE(OX8)、抗-TCR-Alexa647(R73)、ならびに抗-CD25-FITC(OX39)mAbsによりラベルした。CD8⁺CD45RC^{low}T細胞及びCD4⁺CD25⁻T細胞を、FACSria(BD Biosciences, Mountain View, CA)によるTCR⁺細胞のゲーティング後に分取した。分取した集団の純度は、99%超であった。

30

40

【0176】

形質細胞様樹状細胞(pDC)を、以前に記載されたように(6)精製した。簡潔に、コラゲナーゼ消化後に回収した脾細胞を、抗-TCR(R73及びV65)T細胞及び抗-CD45RA(OX33)B細胞mAbによるネガティブな枯渇により、更に精製した。濃縮された細胞を、抗-CD45R-PE(His24)、抗-CD4-APC(OX35)、抗-TCR-FITC(R73)、及び抗-CD45RA-FITC(OX33)によりラベルした。CD45R及びCD4陽性細胞として規定されたpDCを、FITC陰性細胞についてゲーティングした後に分取した。

【0177】

混合型リンパ球反応

50

M L R 共培養アッセイ法のために、L E W . 1 A ナイーブラットからの p D C (1.25×10^4 個)、同系 C D 8⁺ C D 4 0 I g T r e g (5×10^4 個)、及び $120 \mu\text{g/mL}$ 同種ペプチドを、丸底 9 6 ウェルプレート中の完全 R P M I - 1 6 4 0 培地 $200 \mu\text{L}$ 中に、トリPLICATEで、 37°C 、5% CO_2 で 6 日間蒔いた。p D C を、 $0.5 \mu\text{M}$ C p G O D N 1 8 2 6 で成熟させた。

【 0 1 7 8 】

直接的な M L R サプレッシブアッセイ法のために、L E W . 1 A 起源の分取した C F S E ラベル C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞 (5×10^4 個) 及びドナー L E W . 1 W 動物から単離された同種 p D C (1.25×10^4 個) を、F A C S 分取し、新鮮に精製したナイーブな C D 8⁺ C D 4 5 R C^{1.0w} T r e g 細胞、ペプチドエクспанションした C D 8⁺ C D 4 0 I g T r e g 細胞 (5×10^4 個)、D u 5 1 四量体⁺又は⁻ C D 4 0 I g T r e g を含む、丸底 9 6 ウェルプレート中の完全 R P M I - 1 6 4 0 培地 $200 \mu\text{L}$ (最終容量) 中に、トリPLICATEで 6 日間蒔いた。間接的な M L R サプレッシブアッセイ法のために、ドナー L E W . 1 W 動物から単離した脾細胞を凍結融解して、アポトーシスを誘発させた。ついで、アポトーシス細胞を、レシピエント L E W . 1 A 動物から単離した p D C と、 0.65×10^6 個/mL p D C で一晩培養した (比 8 : 1)。最後に、アロ抗原ロード p D C を洗浄し、直接的な M L R について先に記載されたように蒔いた。

10

【 0 1 7 9 】

抗 - C D 3 / 抗 - C D 2 8 刺激のために、丸底 9 6 ウェルプレートを、抗 - C D 3 ($1 \mu\text{g/mL}$ 、BD Pharmingen) 及び抗 - C D 2 8 ($10 \mu\text{g/mL}$) m A b により、 37°C 、5% CO_2 で 1 時間コートし、ついで、洗浄し、 5×10^4 個 C D 8⁺ C D 4 0 I g T r e g 細胞を、完全 R P M I - 1 6 4 0 $200 \mu\text{L}$ 中において各ウェルに、1、2、3、及び 6 日間加えた。

20

【 0 1 8 0 】

C F S E ラベルしたナイーブな C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞の増殖及び C D 8⁺ C D 4 5 R C^{1.0w} T r e g の表現型を、生きた細胞 (D A P I 陰性) の中から、T C R⁺ C D 4⁺ 細胞又は T C R⁺ C D 8⁺ 細胞についてゲーティングした後、F A C S C a n t o II サイトメーター (BD Biosciences, Mountain View, CA) におけるフローサイトメトリーにより分析した。

30

【 0 1 8 1 】

細胞外及び細胞内染色

細胞外染色のために、細胞を、下記 m A b : 抗 - T C R (R 7 3、A l e x a F l u o r 6 4 7 - コンジュート)、抗 - C D 8 (O X 8、P E - C y 7 - コンジュート、ebiosciences)、抗 - C D 4 (W 3 . 2 5、P E - C y 7 - コンジュート)、抗 - C D 4 5 R C (O X 2 2、F I T C - コンジュート)、抗 - C D 2 8 (J J 3 1 9、ビオチンラベル)、抗 - C D 7 1 (O X 2 6、ビオチンラベル)、抗 - マウス V b 1 1 (K T 1 1、ビオチンラベル、AbD Serotec)、抗 - C D 2 5 (O X 3 9、ビオチンラベル)、及び抗 - M H C - I I (O X 6、ビオチンラベル) で染色した。

【 0 1 8 2 】

細胞内染色のために、ついで、細胞を、F o x p 3 (ビオチンラベル、ebiosciences) で、BD cytofix/cytopermキット (BD Biosciences) を使用し、製造メーカーの説明書に従って染色した。

40

【 0 1 8 3 】

全てのビオチン化 m A b を、ストレプトアビジン - P e r C P . C y 5 . 5 (BD Biosciences) を使用して可視化した。F A C S C a n t o II サイトフルオロメーター (BD Biosciences, Mountain View, CA) を使用して、蛍光を測定した。データを、FlowJoソフトウェア (Tree Star, Inc. USA、バージョン 7 . 6 . 5) を使用して分析した。まず、細胞を、その形態によりゲーティングした。死んだ細胞を、D A P I 陰性の生きた細胞を選択することにより除外した。

50

【0184】

サイトカインアッセイ法

IFN γ 、IL-10を、共培養上清中において、BD BiosciencesからのELISAであるOptEIAを使用して測定し、IL-12及びTGF β をそれぞれ、Invitrogen及びR&D SystemからのELISAを使用して測定した。

【0185】

ビオチン化RT1-A^a-ペプチド複合体の産生

簡潔に、重鎖RT1-A^a及び κ 2ミクログロブリン(2mg)を、pET24中にクローニングし、Escherichia coli BL21 DE3中で産生した。リコンビナントタンパク質を、封入体として産生し、8M尿素中に溶解させ、ヒトHLA-A2/ペプチド複合体について以前に記載されたように(61)、*in vitro*でリフォールディングさせた。RT1-A^a、2mg、及びペプチドDu51を、0.4M L-アルギニン、0.1M Tris pH8、2mM EDTA、5mM還元型グルタチオン、及び0.5mM酸化型グルタチオン中において、4日間で5日間リフォールディングさせた。ついで、この溶液を濃縮し、アミコンメンブラン10Kd(Millipore, Bedford, MA)上でバッファー交換した。フォールディングされたMHC/ペプチド複合体を、BirA酵素(Avidity, Denver CO)により、30分間で5時間ビオチン化し、HiPrep 26/10脱塩カラム(GE Healthcare)で脱塩した。ついで、MHC/ペプチド複合体を、アニオン交換Q Sepharoseクロマトグラフィーにより精製した。ビオチン化を、4:1のモル比でのストレプトアビジン(Sigma Aldrich)との四量体化により試験した。

【0186】

四量体化及び染色

RT1-A^a/Du51の四量体化を、4:1のモル比での、ストレプトアビジン-PE(Jackson ImmunoResearch)又はストレプトアビジン-APC(BD Biosciences)を、15分間隔で加えた4等分アリコートにおいて加えることにより室温で行った。同様に、対照四量体RT1-A^a/MTF-E(ILFSSERLISNR)を、ストレプトアビジン-BV421(Biolegend)にコンジュゲートさせ、Du51-特異的細胞の中でも、1.6+/0.7%非特異的染色を表わした。これら3つの試薬を混合し、蒔いた細胞に10 μ g/mLで4日において1時間加えた。さらに、細胞を、CD8及びCD45RCで染色した。蛍光を、FACSCanto IIサイトメーター(BD Biosciences, Mountain View, CA)で分析した。まず、細胞を、その形態によりゲーティングし、死んだ細胞を、DAPI陰性細胞を選択することにより除外した。

【0187】

*in vivo*でのペプチド処置

16merペプチドを、注入前に0.4%DMSO/PBS中に溶解させた。1回目のプロトコールについて、単回投与のペプチド(500 μ g/注入)を、移植前後の種々の時点である、-6、-3、0、+3、及び+7日目に、移植したLEW.1Aレシピエント内に*i.v*注入した。2回目のプロトコールについて、ミニ浸透圧ポンプ(ALZET, Cupertino, CA, USA)を、レシピエントの腹腔内(*i.p*)に埋め込み、20.83又は41.66 μ g/時間のいずれかで、16merペプチドを連続的に14日間送達させた。1回目のポンプを、移植前-7日に埋め込み、+7日目に2回目のポンプに置き換えた。このポンプは、28日間連続で動物当たり14又は28mgペプチドの送達が可能である。枯渴性抗-CD8 mAb(OX8, IgG1, 3mg/kg)又は抗-MHCクラスIa及びIb mAb(OX18, 3mg/kg)を、-7日目から拒絶までに週2回、*i.p*注入した。移植臓器を、触診により毎日モニターした。移植臓器拒絶を、触知できる心拍の完全な停止として定義した。

【0188】

養子細胞送達

細胞送達を、移植前日に致死量以下で照射(4.5Gy 全身照射)したLEW.1Aレシピエントへの、精製し、分取したトータル又はDu51四量体 κ 2CD8⁺CD40I

g T r e g の i . v . 注入により行った。トータル脾細胞 ($1, 5 \cdot 10^8$ 個) を、同じ日に 4 . 5 Gy 全身照射を受けたナイーブな L E W - 1 A レシピエントへの心臓移植前日に、養子性に i . v . 送達した。レシピエントに、D u 5 1 処置ラットからの脾細胞 (1 回目の s p l 送達と定義)、ナイーブなラットからの脾細胞 (ナイーブな s p l 送達)、又は細胞無し (未処置照射) を受けさせた。

【 0 1 8 9 】

移植心の形態計測分析

移植片の上 1 / 3 を、パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン中に包埋した。5 μ m 冠状切片を、ヘマトキシリン - エオシン - サフランで染色した。組織を、群に対して盲検の病理医 (K . R .) により分析した。慢性拒絶を、以前に記載されたように (6 3) 評価した。

10

【 0 1 9 0 】

ドナー特異的アロ抗体検出

アロ抗体を、他の箇所記載されたように (2 8)、細胞蛍光測定法により分析した。簡潔に、コラゲナーゼ D による消化及び赤血球溶解後に、同種の脾細胞を、希釈 (1 / 8) した熱不活性化血清と共にインキュベートし、ついで、F I T C - コンジュゲート ヤギ抗 - ラット I g G 抗体 (H + L 鎖特異的) (Jackson Laboratories)、マウス抗 - ラット I g G 1 M A b (M C A 1 9 4、Serotec)、I g G 2 a (M C A 2 7 8、Serotec)、又は I g G 2 b (M C A 1 9 5、Serotec) と共にインキュベートした。抗体が結合したことを、F I T C - 結合 F (a b) ' 2 ヤギ抗 - マウス I g G (Jackson Laboratories) を使用して証明した。細胞を、FACS Canto II サイトフルオロメーター (BD Biosciences, Mountain View, CA) を使用して分析した。結果を、各血清についての平均チャンネル蛍光として表わした。

20

【 0 1 9 1 】

統計学的分析

ペプチド活性化試験のために、ノンパラメトリックなウィルコクソンの符号順位検定を、1 . 0 の仮定値に対するカラムメジアンと比較して行った。T C R V 1 1 発現、活性化された細胞の表現型、サイトカイン発現、増殖アッセイ法、及び四量体染色についての統計学的有意性を、両側マン・ホイットニー t 検定により評価した。移植片生存を、 Kaplan-Meier ・ ログラック検定により分析した。2 要因の分散分析検定及びボンフェローニポストテストを、ドナー特異的抗体分析及び脾細胞表現型特徴決定に使用した。分析を、GraphPad Prism 5.04 ソフトウェア (GraphPad, San Diego, CA, USA) により行った。多様性分析のために、クルスカール - ウォリス及びダンの多重比較ポストテストを、GraphPad Prism 6.0c を使用して行った。0 . 0 5 未満の P 値を、有意であるとみなした。

30

【 0 1 9 2 】

結果

in vitro における CD 8 ⁺ CD 4 0 I g T r e g 活性化

CD 8 ⁺ CD 4 0 I g T r e g による同種 M H C / ペプチド複合体の T C R 認識、及び、その機能のその後の活性化を特定するために、抗原性刺激に対する曝露に従って、フローサイトメトリーによる分析を可能にする活性化の特異的マーカーを選択する必要があった。したがって、ポリクローナル抗 - C D 3 及び抗 - C D 2 8 抗体による刺激に基づいて、CD 8 ⁺ CD 4 0 I g T r e g により、種々の時点で発現された分子をスクリーニングした。新鮮に単離された CD 8 ⁺ CD 4 0 I g T r e g における分子の発現は、Q R T - P C R により以前に評価されており (5)、これらの分子の中でも、CD 2 5 及び I F N γ が、他の細胞集団から、CD 8 ⁺ CD 4 0 I g T r e g を区別するマーカーであったことが証明された。CD 7 1、CD 2 5、及び I F N γ の発現を、0、1、2、3、及び 6 日目において、フローサイトメトリーにより分析した。

40

【 0 1 9 3 】

0 日目において、CD 8 ⁺ CD 4 0 I g T r e g が、低レベルの CD 7 1 ($0 . 8 3 \pm 0 . 1 \%$)、CD 2 5 ($1 2 . 7 4 \pm 6 . 1 \%$)、及び I F N γ ($5 . 5 7 \pm 3 . 3 \%$)

50

)を発現していたことが確認された。ポリクロール刺激後に、CD71、CD25、及びIFN γ の発現は、初日から有意に増大し、それぞれ $82 \pm 4.5\%$ 、 $98.1 \pm 1.9\%$ 、及び $91.7 \pm 7\%$ の陽性細胞として、6日目に経時的に安定したままであった。

【0194】

まとめると、低いベース発現と刺激に基づく有意なアップレギュレーションを有する、CD8 $^+$ CD40IgTregに対する対象となる3つのマーカーが特定された。CD25が、最多であり、最も早くアップレギュレーションされたマーカーであったため、また、CD25が、本発明者らにより以前に説明されたマーカーであったため(5、12)、このマーカーを、この研究の残りの局面について、CD8 $^+$ CD40IgTreg活性化を評価するのに選択した。

【0195】

CD8 $^+$ CD40IgTreg細胞は2つのドナーMHCクラスII由来ペプチドを認識した

ラットのMHCミスマッチ心臓移植臓器モデルにおいて、ドナー(RT1 u)とレシピエント(RT1 a)とは、全てのMHC分子についてミスマッチである。したがって、ドナーとレシピエントとのMHC I及びIIアミノ酸(aa)配列をアライメントし、ドナーMHC I及びII分子の多型ドメインとマッチした82個のオーバーラップした16merペプチドを設計した(17~19)。まず、ペプチドを、6~8個のペプチド(30 μ g/mL各ペプチド)のプールに分類し、未成熟又は成熟した同系のレシピエントpDCとCD40IgTreg処置した長期移植臓器保有レシピエントから分取したCD8 $^+$ CD40IgTregを3又は6日間共培養した*in vitro*アッセイ法で試験した。未成熟pDCに関して、CD8 $^+$ CD40IgTregの有意な活性化は、ペプチドの同種プールのいずれについても、3日目又は6日目において観察されなかった。成熟pDC及び同種ペプチドプールによる刺激後、3日目に、CD8 $^+$ CD40IgTregの小集団におけるCD25発現のわずかなアップレギュレーションが観察され、6日目に、同種刺激により、CD25発現の有意なアップレギュレーションが観察された。これらの結果から、一部の同種ペプチドは、CD8 $^+$ CD40IgTregにより効率的に認識され、この認識により、CD25発現の増大がもたらされることが示唆された。また、pDCは、当該アッセイ法において成熟している必要があることも証明された。

【0196】

次に、ナイーブで成熟した同系pDC及び6日の培養において長期生存細胞から精製したCD8 $^+$ CD40IgTregの存在下において、82個のアロペプチドの個々の刺激能を試験した(図1A)。2つのペプチド：ペプチド#31(Bu31と呼ばれる、ペプチドなしに対して 1.67 ± 0.09 倍、 $p < 0.0001$) (ペプチド#31の配列は、ペプチド#32($p < 0.05$)の配列とオーバーラップする)及びペプチド#51(Du51と呼ばれる、ペプチドなしに対して 2.07 ± 0.18 倍、 $p < 0.001$)が、CD8 $^+$ CD40IgTregの細胞表面において、CD25発現の非常に有意なアップレギュレーションを誘導したことが観察された。Du51は、Bu31と比較して、CD25発現のより強いアップレギュレーションを誘導した。このことは、Du51が、CD8 $^+$ CD40IgTregにより認識されるドミナントなペプチドである一方で、Bu31はサブドミナントであることを示唆している。これらの結果から、抗原特異的CD8 $^+$ CD40IgTregが、2つのペプチドBu31(YLRYSDDVGEYRAVTE)及びDu51(NREERYARFSDVGEYR)を、主に認識したことが証明された。これらのペプチドはそれぞれ、ドナーMHCクラスII RT1 \cdot B u 及びRT1 \cdot D u 分子の1鎖由来である。

【0197】

CD8 $^+$ CD40IgTregは異常に長い同種の15merペプチドを認識した

抗原特異的CD8 $^+$ CD40IgTregにより認識される天然のドミナントなドナーペプチド配列を決定するために、変性ペプチドのライブラリを使用した。この変性ペプチドは、1つのaaラギングを有する9merペプチド~ドミナントな16mer Du51由

10

20

30

40

50

来の2つ以上のaaラギングを有する15merペプチド(#51-1~#51-18でラベル)の範囲とした(図1B及び表1)。このライブラリ設計は、以前の結果に基づいており、レポートで報告されており(20~23)、上記された*in vitro*アッセイ法と同様に試験した。興味深いことに、ランダムペプチドライブラリにより、ラットMHCクラスI RT1-A^a分子が、C末端にアルギニン(R)を有する9~15merペプチドに強力な優位性を示したことが確立されている(23)。

【0198】

【表11】

表1:本研究に使用したペプチドのリスト

名称	配列	長さ(aa)	配列番号
Du51	NREEYARFDSVDVGEYR	16	2
51-1	NREEYARFD	9	11
51-2	REEYARFDS	9	12
51-3	EEYARFDS	9	13
51-4	EYARFDS	9	14
51-5	YARFDS	9	15
51-6	ARFDS	9	16
51-7	RFDS	9	17
51-8	FDS	9	18
51-9	YARFDSVGE	10	19
51-10	EYARFDSVGE	10	20
51-11	YARFDSVGEY	11	21
51-12	YARFDSVGEYR	12	22
51-13	EYARFDSVGEY	12	23
51-14	EEYARFDSVGE	12	24
51-15	EEYARFDSVGEY	13	25
51-16	EEYARFDSVGEYR	14	26
51-17	REEYARFDSVGEYR	15	27
51-18	REEYARFDSVGEYR	15	1

【0199】

誘導体である9merペプチド#51-1~#51-8は、16mer Du51で観察された活性化に匹敵する、CD8⁺CD40IgTregの活性化を誘導することができなかった。一方、N末端アスパラギン(N)を欠いている15mer誘導体ペプチド(51-18)により、非常に強力で、有意なCD25アップレギュレーションを誘導することができた(ペプチドなしに対して、2.04±0.3倍)。他の誘導体とは対照的に、ペプチド#51-18により誘導されたCD25アップレギュレーションは、Du51により誘導されたのとは、有意には異ならなかった(図1B)。

【0200】

要するに、これらの結果から、ドミナントなMHCクラスII由来の15mer天然ペプチド(REEYARFDSVGEYR)が、CD8⁺CD40Ig⁻Tregに対して提示され、このような提示が、特定の細胞の活性化を誘導することが示された。

【0201】

Du51活性化CD8⁺CD40Ig⁻Treg細胞は改変された表現型を表わし、抗原特異的活性化T細胞を効率的にサプレッションした

Du51活性化CD8⁺CD40Ig⁻Tregの表現型を、刺激後6日で分析した。CD8⁺CD40Ig⁻Tregが、高レベルのIFN γ の分泌を介して働き、次に、DC及び移植片ECによりIDO発現を誘導し、この反応が、*in vivo*での寛容誘導に必須であったことが、以前に証明されている(5)。これらの結果に基づいて、pDCの存在下におけるペプチドによるCD8⁺Tregの刺激が、大方活性化されたCD8⁺CD40Ig⁻Tregにより、IFN γ の有意に増大した発現をもたらすことが観察された。同じ培養上清中において、pDC起源であろうIL-12産生の低下が観察されたが、CD8⁺CD40Ig⁻Treg及びpDCの両方により産生することができるIL-10及びTGF β の発現の改変は観察されなかった。また、CD71、CD28、及びMHCクラスIIのアップレギュレーションも観察されたが、ペプチド刺激の6日後に、Foxp3発現の改変は観察されなかった。

【0202】

同種pDC又は同系pDC及びドナー細胞ライゼートの存在下において、CD8⁺CD40Ig⁻Tregが、同系エフェクターCD4⁺CD25⁻T細胞の増殖をサプレッションすることができることが、以前に証明されている。このことは、CD8⁺CD40Ig⁻Tregが、非自己認識の直接的又は間接的な経路を介して働いたことを示し、CD8⁺CD40Ig⁻Tregが、ナイーブなCD8⁺CD45RC^{low}Tregより効率的なサプレッサー細胞であることを示している(6)。ここで、Du51刺激CD8⁺CD40Ig⁻Tregが、エフェクターT細胞増殖を、6日の共培養後に効率的にサプレッションすることにより、そのサプレッサー能を維持することができるかを、非活性化対照ペプチドにより刺激されたCD8⁺CD40Ig⁻Tregと比較して調査した。CD8⁺CD40Ig⁻Tregを同系pDC及びDu51又は非活性化ペプチドの存在下で6日間刺激するMLRアッセイ法を行った。ついで、ペプチド刺激CD8⁺CD40Ig⁻Tregを、FACS Ariaを使用して分取し、分取した同種pDC及び同系CFSEラベルCD4⁺CD25⁻エフェクターT細胞の直接的なMLRアッセイ法に加えた。エクспанションしたCD8⁺CD40Ig⁻Tregは、直接的な非自己認識経路により刺激されたエフェクターCD4⁺CD25⁻T細胞の増殖におけるバイスタンダーレギュレーションを発揮するであろうと推定された。エフェクターCD4⁺CD25⁻T細胞の増殖を、6日後に測定した(24、25)。Tregの非存在下において、80.5%のCD4⁺CD25⁻エフェクターT細胞が増殖した。Du51刺激Tregの添加は、非活性化ペプチドにより刺激されたTregと比較して、エフェクターT細胞増殖の有意な阻害をもたらした。このため、Du51抗原特異的CD8⁺CD40Ig⁻Tregは、*in vitro*活性化後に効率的なサプレッシブ能を維持した。6日間刺激されないままであったTregは、そのサプレッシブ能を失い、放置により死に始めた。

【0203】

CD40Ig⁻処置レシピエントにおけるその濃縮が証明されたMHCクラスII四量体を使用するDu51特異的CD8⁺CD45RC^{low}Tregの特定

移植における重要な課題は、依然として、抗原特異的Tregの特定である。より活性的なサプレッシブ集団を表わすためである。ここまで、非常に少ない天然エピトープしか特定されていない。加えて、今日、ラット及び移植環境において、抗原特異的CD8⁺Treg集団を、直接的に可視化及び検出するのに利用できるツールは存在しない。そのためにも、フィコエリスリン(PE)及びアロフィコシアニン(APC)でラベルした、MHCクラスII四量体であるRT1.A^a/Du51を生成し、脾臓及び移植片中において

特定集団を染色した。

【0204】

まず、細胞を、PEコンジュゲート、及びAPCコンジュゲートしたRT1.A^a/Du51四量体の混合物により、BV421でラベルされた対照四量体であるRT1.A^a/MTF-Eと共に染色した。この二重蛍光色素戦略は、抗原特異的CD8⁺エフェクターT細胞について以前に説明されており、シグナルとノイズの染色の区別が可能である。特異的CD8⁺Tregが、RT1.A^a/Du51四量体の各バージョンに等しく結合する一方で、ランダムなエレメントは結合しないであろうためである(26)。二重陽性染色イベントの中でも、非ペプチド特異的細胞を可視化し、除外することができる。非ペプチド特異的細胞は、同じ重鎖RT1.A^aを有するが会合した不適切なペプチドを有する対照四量体に結合するためである。細胞を、CD8-PECy7及びCD45RC-FITCにより二次染色して、CD8⁺CD45RC^{low}Treg又はCD8⁺CD45RC^{high}T細胞のいずれかを特定した。このような戦略について、脾臓において2.19±0.6%、移植片において1.16±0.25%のDu51特異的細胞を、CD8⁺CD40Ig Tregの中から特定することができた。ナイーブな脾臓のCD8⁺CD45RC^{low}Treg集団において、前駆体頻度を0.73±0.2%と評価した。このことは、移植及びCD40Ig処置後120日でも、この頻度は、3倍近くに増大し、ナイーブな動物において、ドナー特異的Tregのプールを特定することができたことを証明している。この差異は、脾臓における四量体陽性CD8⁺CD40Ig Treg又はナイーブなCD8⁺CD45RC^{low}T細胞の割合及び絶対数を見た場合に、真であった(脾臓において、割合についてそれぞれ、0.624±0.128 vs. 0.173±0.071、及び、絶対数について、623800±127700 vs. 172600±70500、p<0.05)。また、各集団中の陽性細胞の割合及びトータル脾臓における割合又は絶対数、ならびに移植片における割合の点から、ナイーブ又はCD40Ig処置動物からの、CD8⁺CD45RC^{high}T細胞の中からより、CD8⁺CD40Ig Tregの中からの方が、多くのDu51特異的細胞が有意に存在した。脾臓において、ナイーブな動物からのCD8⁺CD45RC^{low}とCD8⁺CD45RC^{high}とのT細胞間に、差異は存在しなかった。興味深いことに、四量体陽性細胞は、移植片及び脾臓の両方において、CD8⁺CD45RC^{low}TregのCD8^{high}部分集合内に局在した。

【0205】

要するに、これらの結果から、移植及びCD40Ig処置に基づいて有意に増大した集団であるアロ抗原特異的CD8⁺Tregを検出する機能的なRT1A^a/Du51四量体を生成することができたことが証明された。

【0206】

非自己認識の直接的及び間接的経路により媒介されるDu51特異的CD8⁺CD45RC^{low}Tregの優れたサプレッシブ能、ならびに、in vivoでの寛容誘導のための要求

Du51刺激CD8⁺CD40Ig Tregのサプレッシブ能が、以前に証明されている。この実験において、新鮮に分取したRT1A^a/Du51四量体特異的CD8⁺CD40Ig Tregのサプレッシブ能を研究しようとした(図2A)。ナイーブなCD8⁺CD45RC^{low}Treg、トータルCD8⁺CD40Ig Treg、RT1A^a/Du51四量体陰性(四量体⁻)、及びRT1A^a/Du51四量体陽性(四量体⁺)のCD8⁺CD40Igを分取し、同種(直接的経路)又はアロ抗原ロード同系pDC(間接的経路)及びナイーブなCFSEラベル同系CD4⁺CD25⁻T細胞と共に、6日間インキュベートした。このアッセイ法において、RT1A^a/Du51四量体特異的CD8⁺CD40Ig Tregを、四量体結合により活性化させた(データを示さず、及び(27))。以前に説明されたように、トータルCD8⁺CD40Ig Tregは、アロ抗原提示の直接的及び間接的経路の両方により誘導されるエフェクターCD4⁺CD25⁻T細胞の増殖を、ナイーブなCD8⁺CD45RC^{low}Tregよ

り効率的にサブプレッションした(図2A)。興味深いことに、非自己認識の直接的経路により媒介される四量体⁺ vs 四量体⁻ CD8⁺CD40Ig Tregのサブプレッシブ活性間に、有意差が観察された。四量体⁺ CD8⁺CD40Ig Tregが、最も活性なサブプレッサー細胞部分集合であった(図2A)。有意ではなかったが、統計的な傾向を有して(p = 0.0571)、同じ差異が、間接的なアロ抗原提示経路に関して得られた(図2A)。さらに、CD4⁺CD25⁻ T細胞増殖のサブプレッションが、直接的よりむしろ、間接的なアロ抗原提示経路により誘導された場合、Du51特異的Tregにより効果的に達成された。興味深いことに、非特異的四量体⁻ CD8⁺CD40Ig Tregは、トータルCD8⁺CD40Ig Tregより低いサブプレッシブ能を有する傾向にある。このことは、トータルCD40Ig Tregプールの全体的なサブプレッシブ能における、Du51特異的CD8⁺ Tregの重要な寄与を強調している。これらの結果から、Du51抗原特異的CD8⁺ Tregが、トータルCD8⁺CD40Ig Tregプールの最も効率的なTregの部分集団であることが示唆された。

【0207】

Du51特異的CD8⁺CD40Ig Tregについて観察された差動的なex vivoにおけるサブプレッシブ効果のin vivoでの関連性を研究するために、養子細胞送達実験を行った。トータルCD8⁺CD40Ig又はRT1A^a/Du51四量体陰性(四量体⁻)CD8⁺CD40Ig Tregを分取し、ナイーブな移植照射レシピエントに、養子性に送達した(図2B)。トータルCD8⁺CD40Ig Tregとは異なり、(Du51抗原特異的細胞を枯渇させた)四量体⁻CD8⁺CD40Ig Tregは、移植臓器拒絶を防止することができなかった。このことは、移植臓器拒絶を予防し、感染性寛容を促進するトータルCD8⁺CD40Ig Tregプールの免疫寛容誘導活性における、抗原特異的CD8⁺CD40Ig Tregの重要な役割を証明している。

【0208】

in vivoでのペプチド処置による寛容誘導はCD8⁺CD45RC^{low} Treg割合の向上及び抗ドナー抗体応答の総体的な阻害に関与したCD8⁺CD45RC^{low} Tregのin vivoでの生成及び移植臓器生存において特定された免疫ドミナントなペプチドの活性を更に決定するために、動物を他の処置をすることなく、2種類のプロトコルのペプチド投与を使用して別々に処置した。第1のプロトコルにおいて、動物に、500 µg ペプチドの静脈内(i.v)注入を、5回受けさせた(図3A)。対照ペプチド又はDu51のいずれかの注入は、移植臓器生存の有意な延長を誘導するのに十分でなかったことが観察された(それぞれ、11及び9.5日、n = 4)(図3A)。第2のプロトコルにおいて、このような小型のペプチドがレシピエントの体内から急速に排出されることから、処置の有効性を改善するために、1時間当たりに20.8 µg ペプチドの一定の腹腔内送達のためのミニ浸透圧ポンプを、移植前-7日から開始して28日間試験した。興味深いことに、このプロトコルは、対照ペプチドと比較して、Du51を使用する25%の明確でない移植臓器生存を伴って、移植臓器生存の有意な延長を可能にした(対照ペプチド及び未処置と比較して、p < 0.01)(図3A)。ペプチド注入により誘導された寛容が、CD⁺ T細胞及びMHCクラスI提示に依存することを証明するために、以前説明されたように(5)、レシピエントを、ペプチド注入及び枯渇性抗-CD8 mAb(OX8)又は阻害性抗-MHCクラスI mAb(OX18)により同時処置した(図3A)。両抗体の投与により、移植臓器生存が完全に消滅した。このことは、CD8⁺ T細胞によるMHCクラスI/抗原の認識が、ペプチド注入により得られる寛容の確立に必要なことを示している。

【0209】

興味深いことに、1時間当たりに41.6 µg ペプチドを送達する浸透圧ポンプにより投与されたDu51用量の増大により、Lewis 1W(LEW.1W)ドナー心臓の80%のレシピエントにおいて、明確でない移植臓器生存が誘導された(図3A)。しかしながら、Brown Norway(BN)という第三者の移植片は、移植後7日目に著しく拒絶され

10

20

30

40

50

た(図3A)。このことは、ペプチドDu51注入が、 $CD8^+$ Tregにより媒介されるドナー特異的寛容を誘導することを証明している。

【0210】

ペプチドDu51により処置された拒絶している、又は、長期間生存しているレシピエントの移植心及び脾臓を、慢性拒絶のサイン、抗-ドナー抗体の存在、トータル及び四量体陽性 $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregの割合、及び $CD4^+$ エフェクターT細胞に対する*in vitro*抑制について分析した(図3B、C、D)。長期レシピエントの移植片についての解剖病理学的分析から、以前に確立されたスコア(28)に基づく慢性拒絶のサインは示されなかった。加えて、早期に移植片を拒絶した未処置又はDu51処置レシピエントと比較して、脾臓において、トータル $CD8^+$ T細胞、特に、 $CD8^+CD45RC^{low}$ Treg(図3C)、及び、長期生存しているペプチドDu51処置レシピエントにおいて、四量体陽性Du51特異的Treg(図3D)の割合及び絶対数における増大についての傾向が観察された。これらの結果から、抗原特異的 $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregは、*in vivo*でのペプチド処置により誘導/増幅される一方、他の部分集合は、誘導/増幅されないことが示唆され、抗原特異的 $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregは、寛容誘導を担う可能性があった。これらのペプチド誘導活性化 $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregは、*ex vivo*での抑制能を表わすことが確認された。これらのペプチド誘導活性化 $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregが、新鮮に精製された $CD8^+CD40Ig$ Tregと同じ方法で、エフェクター $CD4^+$ T細胞増殖を効率的に阻害するためである。最後に、長期間生存しているDu51処置されたレシピエントにおいて、早期に移植片を拒絶した未処置ラット又はDu51処置レシピエントと比較して、慢性拒絶の非存在に関連する(28)、総IgG、IgG1、IgG2a、及びIgG2bアロ抗体産生の総体的な阻害が観察された(図3B)。

【0211】

Du51単剤治療による感染性寛容

1mg/日 *in vivo*でのペプチドDu51処置により生じた長期移植臓器生存に関する誘導されたレギュラトリ細胞のドミナントな抑制活性を評価するために、ナイーブな移植され、致死量以下で照射されたレシピエントへの、長期生存レシピエントの脾細胞を使用する養子細胞送達実験を、先に行ったのと同様に(5)行った(図4A)。二次的でナイーブな移植照射レシピエントへの 1.5×10^6 個の脾細胞の1回目の養子性送達は、50%のレシピエントにおける移植臓器生存の十分な延長をもたらした。このことは、ドミナントなレギュラトリ細胞の誘導が、新たに移植され照射されたレシピエントにおいて、移植臓器拒絶を防止可能であったことを証明している。1回目に養子性に送達された長期脾細胞レシピエントの移植片の解剖病理学的状態を調査した。血管病変及び障害が完全に存在しない(すなわち、慢性拒絶のサインがない)ことが観察された。最後に、長期間生存している1回目の養子性に送達されたレシピエントにおいて、高いアロ抗体産生を表わす未処置ラットと比較し、慢性拒絶の非存在に関連する(28)ナイーブなラットと比較可能な、総IgG、IgG1、及びIgG2bアロ抗体産生の総体的な阻害が観察された(図4B)。

【0212】

議論

Tregがペプチドを認識する方法及びこの認識の役割についての現在の知識は、非常に限られており、ほとんどが、 $CD4^+$ TregのTCR遺伝子伝達を使用するトランスジェニックマウスモデル(8、11)、又は、自己免疫疾患及びガンに関するマウスQa-1制限 $CD8^+$ Tregのいずれかに基づいている。このQa-1ペプチドレパートリーは、ここ数年で説明されてきた(29)。しかしながら、これらの研究からは、抗原特異的Tregは、長期移植の結果に重要な影響を及ぼし、寛容の確立に寄与することが示唆されている(30)。現在の研究では、ガン(ヘムオキシゲナーゼ-1由来ペプチド)、自己免疫(V由来ペプチド)の間に、又は、妊娠(マイナー抗原由来ペプチド

)の間にも、 $CD8^+ Treg$ により認識されるペプチドが特徴決定されているが、移植においてはまだない(2)。移植は、移植片の存在がアロ抗原の連続的な供給源であり、 $Treg$ により認識される抗原が特定される環境である。このことは、レギュラトリー集団の機能及び維持、このため、移植臓器の生存に最も確かに必須である(31)。レギュレーションの文脈におけるアロ抗原の認識は、特に、 pDC により支持される提示の間接的な経路により主に生じることが、本発明者らにより示されている(6、30、32)。

【0213】

本報告では、 $CD8^+ CD45RC^{low} Treg$ が、提示の間接的経路を介して、天然のドナーMHCクラスII分子の1ドメイン由来の、 $Du51$ と呼ばれる1つのドミナントなアロペプチド(及び、1つのサブドミナント)を認識することができる。初めて証明された。これらのペプチドは、ヒトHLAクラスII分子と80~90%相同性を共有しているため、ヒトにおいて、特異的 $CD8^+ Treg$ を検出するのに使用することができる。MHC-I特異的四量体の使用により、 $Du51$ 特異的 $CD8^+ CD45RC^{low} Treg$ は、 $CD40Ig$ 処置長期生存レシピエントにおいて濃縮され、偏った制限V11鎖を発現し、*ex vivo*での強力なサプレッシブ能を表わし、養子送達に基づく寛容誘導における重要な役割を果たすことが示された。最後に、ペプチド $Du51$ は、ドナー特異的 $CD8^+ Treg$ を誘導して、*in vivo*において移植臓器生存の延長を誘導することが示された。

【0214】

ここで、ペプチド $Du51$ は、15aaの珍しい長さを表わし、試験したより短いペプチドは、 $CD8^+ CD40Ig Treg$ による有意な認識を誘導することができないことが説明された。ほとんどの文献では、MHCクラスIに結合する短いペプチド(8~10aa)に焦点を当てられている。ただし、5~10%のペプチドが、MHCクラスI分子により提示されることができる、より長いペプチド(10aa超)であることが公知である(33、34)。ここまで、このようなペプチドは、CTLモデルについて特定されてきており、ほとんどが、ウイルス抗原由来である。知られている限りにおいて、 $RT1A^d / Du51$ 四量体について示されたように、 $CD8^+ Treg$ により構造的に認識されることができる15aaペプチドの最初の説明が提供される。近年の研究から、これらの長いペプチドは、TCR認識を、そのペプチドにより焦点を当てさせ(35)、TCRが、好ましい長さのMHCクラスIペプチドを認識する(36)ことが示唆された。ラットMHCクラスI分子である $RT1.A^d$ は、特に、P2におけるGln、Met、もしくはLeu、P3におけるPhe、P4におけるPro、及びC末端におけるArg等の重要な位置の残基を有する、長いペプチドを収容することが公知である(21、22)。Speir et al.には、13個の残基の母系的に伝達されたマイナー組織適合抗原(MTF-E)モデルにおいて、重要なアンカー残基(特に、13位(P13)におけるアルギニン)が、かなりのバルジコンホメーションと結合可能であることが、以前に証明されている(37)。また、 $Du51$ が、C末端においてArgを表わすことにより、ペプチドの $RT1.A^d$ 収容に役立つことができることも観察された。興味深いことに、本発明者らにより試験されたペプチドの一部は、本発明者らと同じミスマッチ心移植モデル(LEW.1AへのLEW.1W)における拒絶未処置動物(ドミナントペプチド $Du51$ を含む)から単離された $CD4^+$ 及び $CD8^+$ T細胞について、Ballet et al.によっても試験されていた(18)。彼らは、本発明者らによりペプチド#47及びペプチド#55と呼ばれた、2つの免疫ドミナントなペプチドを見出した。これらのペプチドは全て、LEW.1W $RT1.D^d$ 分子由来であり、非修飾LEW.1Aレシピエントからの移植片の急性拒絶に参与した。重要なことに、ペプチド $Du51$ は、このモデルにおいて、急性拒絶に参与しなかった。Ballet et al.により特定された2つの免疫ドミナントなペプチドは、本発明者らの $CD8^+ CD40Ig Treg$ により認識されなかった。このことは、 $Treg$ 及び非 $Treg$ が、同じ抗原を認識しなかったことを示唆している。

【0215】

また、RT1.A^a/Du51四量体を産生することができた。同四量体は、抗原特異的細胞を追跡する有用なツールであるのに加えて、TCRの優れた特異性及び親和性を決定するのに使用することができる。この四量体に関して、ナイーブな動物において、約0.73%抗原特異的Treg前駆体のプールを特定した。この前駆体は、移植及びCD40Ig処置後120日までに、約3倍にエクспанションした。この前駆体頻度は、マウスの関節炎モデルにおいてなされたLeavenworth et al.の観察と関連した。この観察では、彼らは、Qa-1-Hsp60_{p216}及びQa-1.R72A-Qdm四量体特異的CD8⁺Tregの出現を分析し、それぞれについて、約1.65%及び0.46%陽性CD8⁺T細胞のナイーブな頻度を説明した(38)。これらの観察から、Treg集団における抗原特異的細胞の前駆体頻度は、所定の抗原反応性非Treg T細胞の頻度より高かった可能性があったことが示唆される。

10

【0216】

このMHC-I四量体の使用により、(四量体⁺CD8⁺CD40Ig Tregにおいて枯渇させた)四量体⁻CD8⁺CD40Ig Tregの共培養アッセイ法におけるex vivo及び養子送達によるin vivoでのDu51特異的及び非特異的CD8⁺CD40Ig Tregの抑制能を比較した。四量体⁻CD8⁺CD40Ig Tregを上回る四量体⁺CD8⁺CD40Ig Tregの優れた抑制活性が、ex vivoにおいて証明された。四量体⁺CD8⁺CD40Ig Tregは、提示の直接的及び間接的経路の両方により刺激されるCD4⁺エフェクターT細胞の増殖を有意に阻害し、間接的な非自己認識環境において最も効率的に阻害する。これらの結果は、in vitroにおける間接的な特異性のTregの優れた抑制活性を証明する幾つかの研究(39、40)と一致する。in vivoにおいて、トータルCD8⁺CD40Ig Tregを養子性に送達したレシピエントと比較して、四量体⁻CD8⁺CD40Ig Tregを送達したナイーブな移植照射レシピエントでの急速な移植臓器拒絶が観察された。同様の方法において、(四量体Qa-1/Hsp60_{p216}特異的Tregにおいて枯渇させた)四量体⁻CD8⁺Tregの養子送達は、マウスモデルにおける自己免疫性関節炎の進行を予防できなかった(38)。また、Tsang et al.により、移植寛容における間接的なアロ特異性についてのCD4⁺Tregの重要な役割が示された。このことは、直接的及び間接的特異性の両方におけるTCRトランスダクションCD4⁺Tregの養子送達のみが、移植心拒絶を防止ことができ、直接的特異性のCD4⁺Tregでは防止できないことを証明している。

20

30

【0217】

また、抗原特異的レギュラトリーT細胞により発現される可能性のある種々のマーカーを分析した。Foxp3は、ペプチドにより刺激されない、又は、同ペプチドにより刺激されたCD8⁺CD40Ig Tregの対象となるマーカーであるとは考えられない。ただし、強力な抗-CD3/抗-CD28/IL-2刺激の複数回のラウンドに基づいて、実質的なレベルのFoxp3を検出することができた(データを示さず)。また、ペプチド特異的刺激後における、IFN γ 産生の増大及びIL-12発現の低下も見出された。IFN γ は、本発明者らのモデルにおける重要なサイトカインとして、本発明者らにより既に示されていた(6)。

40

【0218】

誘導されたCD8⁺CD40Ig Tregのレパートリーに関して、これらの細胞により、V11鎖をリコンビネーションし、脾臓において9aaのCDR3を提示するTCRが優先的に使用されることが、以前に示された。このことは、Tregのオリゴクローン性集団のエクспанションを示唆している(5)。ただし、6匹の長期生存動物にわたる約700のCDR3のシーケンシングから、全V11⁺CD8⁺CD40Ig Tregが、脾臓における比較的多様なレパートリーを表わすことが証明された。それにも関わらず、より高頻度の繰返し配列が、一部の動物において見出された。移植片におけるTCRレパートリーの分析から、2つのTCR-V鎖：V11(脾臓において)及びV18のプレドミナント性が証明された。脾臓とは異なり、シーケンシングが

50

ら、長期移植臓器生存誘導のドナー特異的輸血モデルにおけるのと同様に、V 18 TCRについて一部が共有されるクローン形質を伴って、両鎖について偏って、制限されたレパトリーが証明された(41)。しかしながら、Douillard et al.により説明された公開配列は、本発明者らの研究における1匹の動物において、1回のみ見出され、本発明者らのモデルにおいて、V 18レパトリーが表わされなかった。1つの興味深い仮説は、このように偏って制限されたクローン形質を有するCD8⁺CD40Ig Tregは、より強力なサプレッサーであり、早期に移植片に遊走して、その阻害活性を発揮し、ついで、免疫レギュレーションが必要とされる寛容された移植物に局在したままであることであろう(42)。対照的に、脾臓に留まるが、(V 18)制限レパトリーを表わさない、又は、(V 11)制限レパトリーをほとんど表わさない(及びその結果として、ナイーブなTregのレパトリーにより近い)トータルCD8⁺CD40Ig Tregは、その後の炎症に基づいてリクルートされる(同じケモカインレパトリーを発現しない可能性がある)区別できるレギュラトリー集団を特定する可能性がある。V 11及びV 18両方について一部が共有されるクローン形質(添付の表1)にも関わらず、公開されたCDR3配列を見出すことができなかった。四量体Du51⁺Tregに焦点を合わせるにより脾臓における抗原特異的CD8⁺CD40Ig Tregのレパトリーをより正確に分析して、(ナイーブ及びCD40Ig処置した脾臓からのトータルCD8⁺CD40Ig Tregと比較し、移植片のCD8⁺CD40Ig Tregと同様に)Du51特異的V 11⁺CD8⁺CD40Ig Tregのクローン形質多様性の減少を証明した。Du51特異的V 18⁺CD8⁺CD40Ig Tregでは、同減少は証明されなかった。このため、V 18鎖の利用は、この特定の抗原認識については最適でない可能性があった。しかしながら、抗原特異的集団のこの分析によっても、このTreg集団について、公開されたクローン形質は明らかにされなかった。個体間で共有されるTCR配列は、収束性リコンビネーションの過程により効率的に生じる傾向にある(43)ため、ナイーブなT細胞レパトリーにおいて、より高頻度に表われる(44~46)。しかしながら、個体間で共有されるTCR配列は、抗原に対する免疫応答において、必然的にドミナントではない(47)。このことは、本発明者らのモデルにおける場合であると考えられる。このことは、この過程が、TCRエクспанション又はTCR鎖ペアリングのいずれかにより修飾することができることを示唆している。ごく最近の公開により、特異的pMHC認識におけるアルファ鎖の重要な寄与と、一部の特異的TCR V ペアリングが要求し、MHC制限を改変させるために、どのようにTCR多様性が考慮されるべきであるかが証明されている(48、49)。文献において、ナイーブなCD4⁺TregのTCR多様性におけるコンセンサスは、多いほど良いという記述が得られた。著者らは、高いTCR多様性により、最適なTregエクспанション及び抗原特異的クローン応答性を有する可能性を増大させることによる機能を確保することを証明した(13、16、50、51)。本発明者らのモデルにおいて、ナイーブなCD8⁺Tregは、非常に多様なレパトリーを表わした。このレパトリーは、移植及びCD40Ig処置後のDu51特異的CD8⁺Tregのエクспанションにより、再構築され、偏った。

【0219】

最後に、治療的観点から、移植においてレギュラトリーT細胞により認識された天然ペプチドの特定は、ヒトの移植において現在試されている、増幅されたCD4⁺Tregを使用する新たな戦略のための重要な目的である(30、52)。非特異的刺激、例えば、抗-CD3/CD28抗体によるポリクローナル法において増幅されたこれらのヒトCD4⁺Tregが、抗原特異的Tregよりほとんど効率的でなく(2、53)、制限されたエクспанション能を表わし、通常、従来のエフェクターT細胞により増殖され過ぎること(54)が、難点である。短期間の培養において、Tregをエクспанションさせる特異的抗原の使用は、確かに臨床状態を改善するであろう。原理の証明として、ドミナントなペプチドDu51を、免疫サプレッシブ処置をすることなく、ナイーブな移植レシピエントに投与した。移植臓器生存の有意な延長が観察された。この延長した生存が

、げっ歯類において、アロペプチド単独で（すなわち、免疫抑制剤なしに）得ることができたのは、初めてである。このことは、寛容誘導におけるこのペプチドの効率性及び提示の間接的経路の関連性の両方を、明らかに証明している。一部の研究では、アロ免疫応答におけるHLA由来ペプチドのより早期の免疫モデュラトリー効果が説明されている（55）。特に、アロトラップ（allotrap）と呼ばれるHLA-B7由来ペプチドにより、マウス及びラットそれぞれにおいて、シクロスポリン投与と組み合わせた場合、皮膚及び心臓の移植臓器生存が延長することが示された（56、57）。その効果は、ヘムオキシゲナーゼI活性のモデュレーションと関連した（58）。本発明者らのモデルにおいて、ペプチドDu51との組み合わせにおける抗-CD8又は抗-MHC-I抗体のいずれかの投与は、移植臓器生存を完全に消滅させた。このため、ペプチドDu51注入により得られたin vivoでの治療効果は、MHCクラスI提示及びCD8⁺T細胞誘導に直接関連した。さらに、免疫ドミナントなペプチドであるDu51は、第三者の移植片が即座に拒絶された場合、アロ免疫応答のドナー特異的阻害を誘導した。加えて、ペプチドDu51誘導移植臓器生存は、アロペプチド注入後の抗原特異的CD8⁺Tregの発生に関連する可能性のある抗-ドナー抗体の総体的な阻害により達成された。この結果は、ペプチド誘導Tregの活性が急性及び慢性の移植臓器拒絶発生を防止するのを示し、ヒトの移植における新たな可能性を開くため、重要である。加えて、このようにエクспанションした非常にサプレッシブなTregにより、このような条件により過剰発現した、新しく、ほとんど説明されていない遺伝子についての、より基礎的な情報が提供された。この遺伝子は、バイオマーカーとして使用することができた（6）。最後に、一部のグループの患者におけるこのCD8⁺CD45RC^{low}Treg集団の存在は、疾患の経過中のより良好な予後に関連すると、推測することができた（59、60）。

10

20

【0220】

まとめると、本発明者らの研究から、MHCクラスIIドナー抗原は、抗原特異的CD8⁺Treg生成及び/又は機能をブーストするのに使用することができること、次に、これらのTregは、抗-ドナー免疫応答を防止して、真の寛容の確立を可能にすることが示される。また、抗原特異的CD8⁺TregsのTCRは、プライベートで、制限されたレパトリーを表わすことが証明された。このレパトリーは、アロ反応性免疫応答の効率的なエクспанション及びサプレッションを確保する。要するに、これらの結果は、MHC/ペプチドとのその相互作用におけるTCRの重要性を強調しており、ヒトの環境に対して送達可能なこの集団の生成における新たな可能性を開いている。

30

【0221】

参考文献

本願全体を通して、種々の参考文献が、本発明が属する技術分野の状態を説明している。これらの参考文献の開示は、参照により本開示に組み入れられる。

【表 1 2】

1. Bluestone, J.A., Auchincloss, H., Nepom, G.T., Rotrosen, D., St Clair, E.W., and Turka, L.A. 2010. The Immune Tolerance Network at 10 years: tolerance research at the bedside. *Nat Rev Immunol* 10:797-803.
2. Guillonnet, C., Picarda, E., and Aneon, I. 2010. CD8+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 15:751-756.
3. Li, X.L., Menoret, S., Le Mauff, B., Angin, M., and Aneon, I. 2008. Promises and obstacles for the blockade of CD40-CD40L interactions in allotransplantation. *Transplantation* 86:10-15.
4. Guillot, C., Guillonnet, C., Mathieu, P., Gerdes, C.A., Menoret, S., Braudeau, C., Tesson, L., Renaudin, K., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., et al. 2002. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 168:1600-1609.
5. Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X.L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., et al. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:1096-1106.
6. Li, X.L., Menoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 185:823-833.
7. Picarda, E., Aneon, I., and Guillonnet, C. 2011. T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy* 3:35-37.
8. Tsang, J.Y., Ratnasothy, K., Li, D., Chen, Y., Bucy, R.P., Lau, K.F., Smyth, L., Lombardi, G., Lechler, R., and Tam, P.K. 2011. The potency of allospecific Tregs cells appears to correlate with T cell receptor functional avidity. *Am J Transplant* 11:1610-1620.
9. Joffre, O., Santolaria, T., Calise, D., Al Saati, T., Hudrisier, D., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P. 2008. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 14:88-92.
10. Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J.A. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1455-1465.

11. Tsang, J.Y., Tanriver, Y., Jiang, S., Xue, S.A., Ratnasothy, K., Chen, D., Stauss, H.J., Bucy, R.P., Lombardi, G., and Lechler, R. 2008. Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* 118:3619-3628.
12. Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F.O., Lechler, R.I., and Lombardi, G. 2011. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 3:83ra42.
13. Wing, J.B., and Sakaguchi, S. 2011. TCR diversity and Treg cells, sometimes more is more. *Eur J Immunol* 41:3097-3100.
14. Masteller, E.L., Tang, Q., and Bluestone, J.A. 2006. Antigen-specific regulatory T cells--ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol* 18:103-110.
15. Ohkura, N., and Sakaguchi, S. 2010. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol* 32:95-106.
16. Fohse, L., Suffner, J., Suhre, K., Wahl, B., Lindner, C., Lee, C.W., Schmitz, S., Haas, J.D., Lamprecht, S., Koenecke, C., et al. 2011. High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 41:3101-3113.
17. van Denderen, B., Peche, H., Gagne, K., Usal, C., Cuturi, M.C., and Soulillou, J.P. 2001. Identification of immunodominant donor MHC peptides following rejection and donor strain transfusion-induced tolerance of heart allografts in adult rats. *Eur J Immunol* 31:1333-1339.
18. Ballet, C., Renaudin, K., Degauque, N., Le Mai, H., Boëffard, F., Lair, D., Berthelot, L., Feng, C., Smit, H., Usal, C., et al. 2008. Indirect CD4+ TH1 response, anti-donor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long term recipients conditioned by donor antigens priming. *Am J Transplant* 9:697-708.
19. Ettinger, R.A., Moustakas, A.K., and Lobaton, S.D. 2004. Open reading frame sequencing and structure-based alignment of polypeptides encoded by RT1-Bb, RT1-Ba, RT1-Db, and RT1-Da alleles. *Immunogenetics* 56:585-596.
20. Thorpe, C.J., Moss, D.S., Powis, S.J., Howard, J.C., Butcher, G.W., and Travers, P.J. 1995. An analysis of the antigen binding site of RT1.Aa suggests an allele-specific motif. *Immunogenetics* 41:329-331.
21. Powis, S.J., Young, L.L., Joly, E., Barker, P.J., Richardson, L., Brandt, R.P., Melief, C.J., Howard, J.C., and Butcher, G.W. 1996. The rat cim effect: TAP allele-dependent

- changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 4:159-165.
22. Stevens, J., Wiesmuller, K.H., Barker, P.J., Walden, P., Butcher, G.W., and Joly, E. 1998. Efficient generation of major histocompatibility complex class I-peptide complexes using synthetic peptide libraries. *J Biol Chem* 273:2874-2884.
 23. Stevens, J., Wiesmuller, K.H., Walden, P., and Joly, E. 1998. Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries. *Eur J Immunol* 28:1272-1279.
 24. Karim, M., Feng, G., Wood, K.J., and Bushell, A.R. 2005. CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood* 105:4871-4877.
 25. Wan, Q., Kozhaya, L., Imberg, K., Mercer, F., Zhong, S., Krogsaard, M., and Unutmaz, D. 2013. Probing the effector and suppressive functions of human T cell subsets using antigen-specific engineered T cell receptors. *PLoS One* 8:e56302.
 26. Chattopadhyay, P.K., Melenhorst, J.J., Ladell, K., Gostick, E., Scheinberg, P., Barrett, A.J., Wooldridge, L., Roederer, M., Sewell, A.K., and Price, D.A. 2008. Techniques to improve the direct ex vivo detection of low frequency antigen-specific CD8+ T cells with peptide-major histocompatibility complex class I tetramers. *Cytometry A* 73:1001-1009.
 27. Wooldridge, L., Lissina, A., Cole, D.K., van den Berg, H.A., Price, D.A., and Sewell, A.K. 2009. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. *Immunology* 126:147-164.
 28. Guillonau, C., Seveno, C., Dugast, A.S., Li, X.L., Renaudin, K., Haspot, F., Usal, C., Veziers, J., Anegon, I., and Vanhove, B. 2007. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 179:8164-8171.
 29. Kim, H.J., and Cantor, H. 2011. Regulation of self-tolerance by Qa-1-restricted CD8(+) regulatory T cells. *Semin Immunol* 23:446-452.
 30. Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 12:417-430.
 31. Hamano, K., Rawsthorne, M.A., Bushell, A.R., Morris, P.J., and Wood, K.J. 1996. Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor

microchimerism is essential for maintenance of tolerance to alloantigen in vivo in anti-CD4 treated recipients. *Transplantation* 62:856-860.

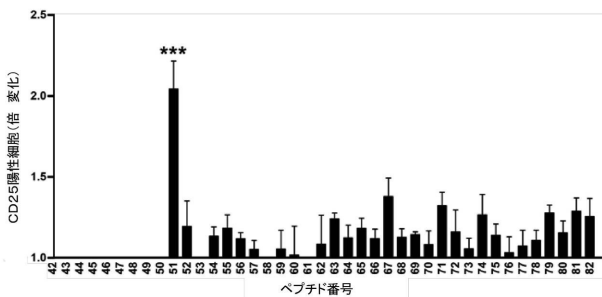
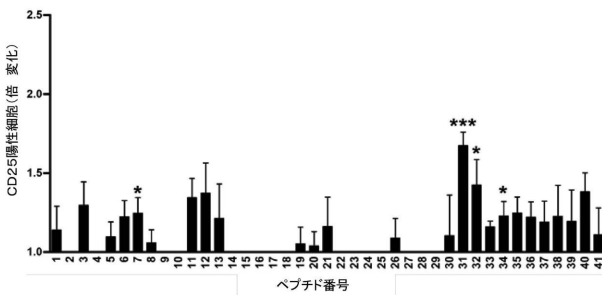
32. Gokmen, M.R., Lombardi, G., and Lechler, R.I. 2008. The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 20:568-574.
33. Burrows, S.R., Rossjohn, J., and McCluskey, J. 2006. Have we cut ourselves too short in mapping CTL epitopes? *Trends Immunol* 27:11-16.
34. Hickman, H.D., Luis, A.D., Buchli, R., Few, S.R., Sathiamurthy, M., VanGundy, R.S., Giberson, C.F., and Hildebrand, W.H. 2004. Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J Immunol* 172:2944-2952.
35. Liu, Y.C., Chen, Z., Burrows, S.R., Purcell, A.W., McCluskey, J., Rossjohn, J., and Gras, S. 2012. The energetic basis underpinning T-cell receptor recognition of a super-bulged peptide bound to a major histocompatibility complex class I molecule. *J Biol Chem* 287:12267-12276.
36. Ekeruche-Makinde, J., Miles, J.J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Cole, D.K., Dolton, G., Schauenburg, A.J., Tan, M.P., Pentier, J.M., Llewellyn-Lacey, S., et al. 2013. Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood* 121:1112-1123.
37. Speir, J.A., Stevens, J., Joly, E., Butcher, G.W., and Wilson, I.A. 2001. Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa. *Immunity* 14:81-92.
38. Leavenworth, J.W., Tang, X., Kim, H.J., Wang, X., and Cantor, H. 2013. Amelioration of arthritis through mobilization of peptide-specific CD8+ regulatory T cells. *J Clin Invest* 123:1382-1389.
39. Hara, M., Kingsley, C.I., Niimi, M., Read, S., Turvey, S.E., Bushell, A.R., Morris, P.J., Powrie, F., and Wood, K.J. 2001. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 166:3789-3796.
40. Jiang, S., Tsang, J., Game, D.S., Stevenson, S., Lombardi, G., and Lechler, R.I. 2006. Generation and expansion of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation* 82:1738-1743.
41. Douillard, P., Pannetier, C., Josien, R., Menoret, S., Kourilsky, P., Soulillou, J.P., and Cuturi, M.C. 1996. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 157:1250-1260.

42. Hayashi, Y., Tsukumo, S., Shiota, H., Kishihara, K., and Yasutomo, K. 2004. Antigen-specific T cell repertoire modification of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5240-5248.
43. Venturi, V., Price, D.A., Douek, D.C., and Davenport, M.P. 2008. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol* 8:231-238.
44. Quigley, M.F., Greenaway, H.Y., Venturi, V., Lindsay, R., Quinn, K.M., Seder, R.A., Douek, D.C., Davenport, M.P., and Price, D.A. 2010. Convergent recombination shapes the clonotypic landscape of the naive T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19414-19419.
45. Robins, H.S., Srivastava, S.K., Campregher, P.V., Turtle, C.J., Andriesen, J., Riddell, S.R., Carlson, C.S., and Warren, E.H. 2010. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci Transl Med* 2:47ra64.
46. Venturi, V., Quigley, M.F., Greenaway, H.Y., Ng, P.C., Ende, Z.S., McIntosh, T., Asher, T.E., Almeida, J.R., Levy, S., Price, D.A., et al. 2011. A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing. *J Immunol* 186:4285-4294.
47. Thomas, P.G., Handel, A., Doherty, P.C., and La Gruta, N.L. 2013. Ecological analysis of antigen-specific CTL repertoires defines the relationship between naive and immune T-cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1839-1844.
48. Day, E.B., Guillonneau, C., Gras, S., La Gruta, N.L., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Purcell, A.W., Rossjohn, J., and Turner, S.J. 2011. Structural basis for enabling T-cell receptor diversity within biased virus-specific CD8+ T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9536-9541.
49. Turner, S.J., and Rossjohn, J. 2011. alphabeta T cell receptors come out swinging. *Immunity* 35:660-662.
50. Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.H., Relland, L.M., et al. 2011. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35:109-122.
51. Adeegbe, D., Matsutani, T., Yang, J., Altman, N.H., and Malek, T.R. 2010. CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cells with limited TCR diversity in control of autoimmunity. *J Immunol* 184:56-66.

52. Safinia, N., Leech, J., Hernandez-Fuentes, M., Lechler, R., and Lombardi, G. 2013. Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy. *Clin Exp Immunol* 172:158-168.
53. Renner, P., Popp, F.C., Eggenhofer, E., Slowik, P., Piso, P., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., and Dahlke, M.H. 2010. Antigen-specific recognition is critical for the function of regulatory CD8(+)CD28(-) T cells. *Transpl Immunol* 22:144-149.
54. Tang, Q., Bluestone, J.A., and Kang, S.M. 2012. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *J Mol Cell Biol* 4:11-21.
55. Zang, W., and Murphy, B. 2005. Peptide-mediated immunosuppression. *Am J Ther* 12:592-599.
56. Buelow, R., Veyron, P., Clayberger, C., Pouletty, P., and Touraine, J.L. 1995. Prolongation of skin allograft survival in mice following administration of ALLOTROP. *Transplantation* 59:455-460.
57. Murphy, B., Kim, K.S., Buelow, R., Sayegh, M.H., and Hancock, W.W. 1997. Synthetic MHC class I peptide prolongs cardiac survival and attenuates transplant arteriosclerosis in the Lewis-->Fischer 344 model of chronic allograft rejection. *Transplantation* 64:14-19.
58. Iyer, S., Woo, J., Cornejo, M.C., Gao, L., McCoubrey, W., Maines, M., and Buelow, R. 1998. Characterization and biological significance of immunosuppressive peptide D2702.75-84(E --> V) binding protein. Isolation of heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 273:2692-2697.
59. Ordonez, L., Bernard, I., L'Faqihi-Olive, F.E., Tervaert, J.W., Damoiseaux, J., and Saoudi, A. 2009. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One* 4:e5287.
60. Ordonez, L., Bernard, I., Chabod, M., Augusto, J.F., Lauwers-Cances, V., Cristini, C., Cuturi, M.C., Subra, J.F., and Saoudi, A. 2013. A higher risk of acute rejection of human kidney allografts can be predicted from the level of CD45RC expressed by the recipients' CD8 T cells. *PLoS One* 8:e69791.
61. Garboczi, D.N., Hung, D.T., and Wiley, D.C. 1992. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in Escherichia coli and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3429-3433.

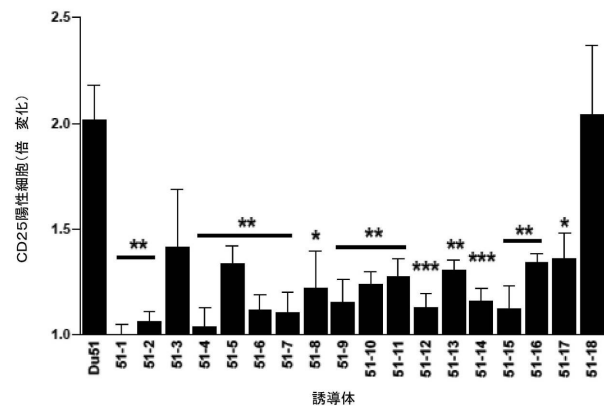
- 62. Venturi, V., Kedzierska, K., Turner, S.J., Doherty, P.C., and Davenport, M.P. 2007. Methods for comparing the diversity of samples of the T cell receptor repertoire. *J Immunol Methods* 321:182-195.
- 63. Guillonneau, C., Louvet, C., Renaudin, K., Heslan, J.M., Heslan, M., Tesson, L., Vignes, C., Guillot, C., Choi, Y., Turka, L.A., et al. 2004. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 172:1619-1629.
- 64. Gras S, Kjer-Nielsen L, Burrows SR, McCluskey J, Rossjohn J. 2008. T-cell receptor bias and immunity. *Curr Opin Immunol.* 20(1):119-25.

【 図 1 A 】

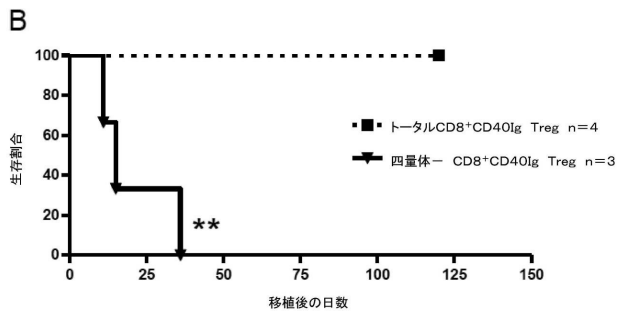
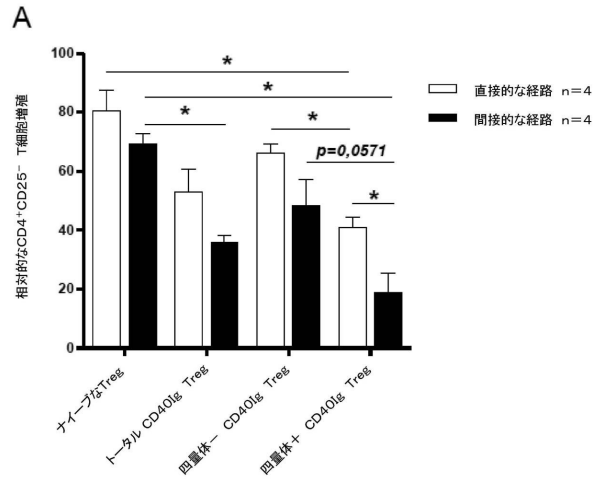


【 図 1 B 】

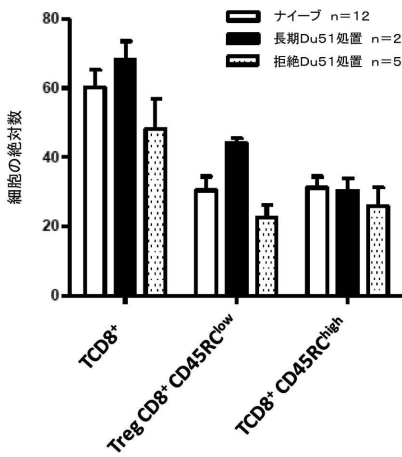
名称	配列	長さ(aa)
Du51	N R E E Y A R F D S D V G E Y R	16
51-1	N R E E Y A R F D	9
51-2	R E E Y A R F D S	9
51-3	E E Y A R F D S D	9
51-4	E Y A R F D S D V	9
51-5	Y A R F D S D V G	9
51-6	A R F D S D V G E	9
51-7	R F D S D V G E Y	9
51-8	F D S D V G E Y R	9
51-9	Y A R F D S D V G E	10
51-10	E Y A R F D S D V G	10
51-11	E Y A R F D S D V G E	11
51-12	Y A R F D S D V G E Y	11
51-13	Y A R F D S D V G E Y R	12
51-14	E Y A R F D S D V G E Y	12
51-15	E E Y A R F D S D V G E	12
51-16	E E Y A R F D S D V G E Y	13
51-17	E E Y A R F D S D V G E Y R	14
51-18	R E E Y A R F D S D V G E Y R	15



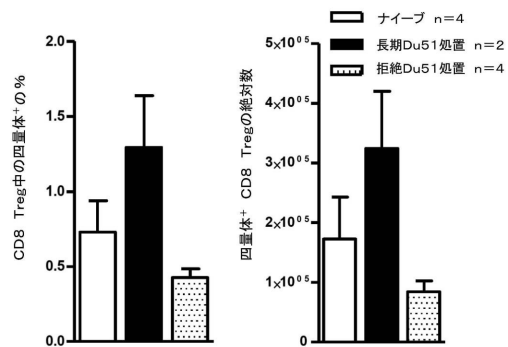
【図2】



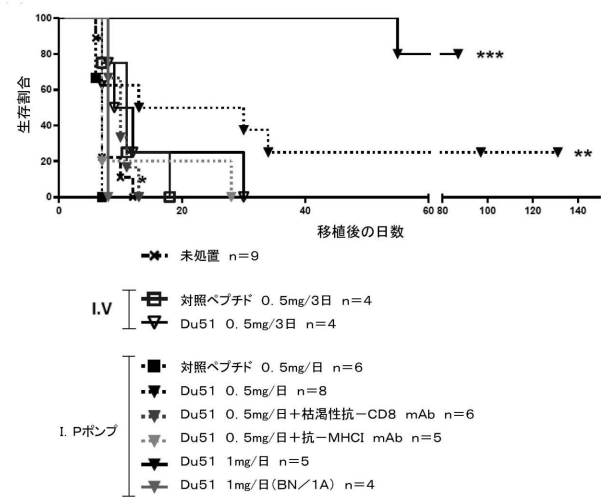
【図3C】



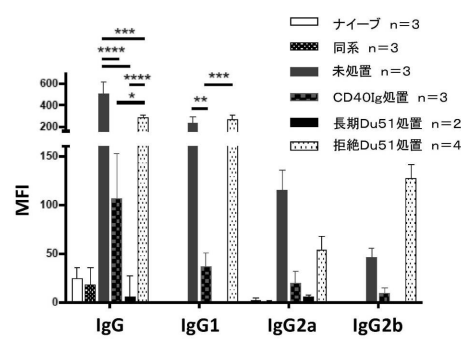
【図3D】



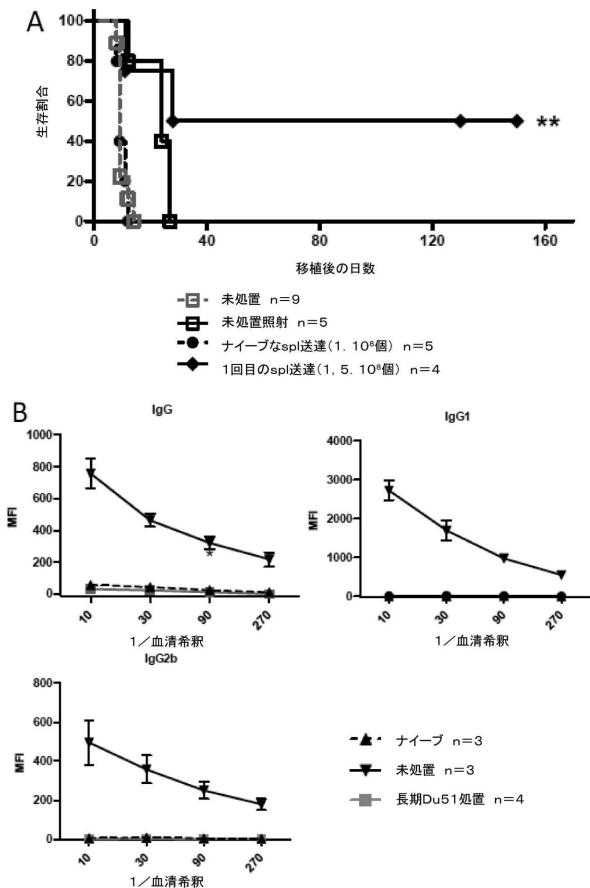
【図3A】



【図3B】



【図4】



【配列表】

2020055845000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年12月26日(2019.12.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R（配列番号：1）又は配列番号：1と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、15～40個のアミノ酸の範囲の長さを有するペプチドであって、下記ペプチド：

【表13】

NREEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 2);

QEEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 29);

NREEFVRFDSVDVGEFR (配列番号: 30);

REEFVRFDSVDVGEFR (配列番号: 31);

HQEEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 32);

HQEEYVRFDSVDVGEYRA (配列番号: 33); 及び

HQEEYVRFDSVDVGEYRAV (配列番号: 34).

を除く、
単離されたペプチド。

【請求項2】

ペプチドが、

【表14】

REEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 1)

REEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 3);

REEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 4);

QEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 5);

REEYARFDSVDVGVYR (配列番号: 6);

NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7);

NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8);

NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9) 及び

NREEYARFDSVDVGVYR (配列番号: 10).

からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1記載のペプチド。

10

30

50

【請求項 3】

アミノ酸配列：REEYARFDS DVGEYR (配列番号：1) 又は配列番号：1 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、15 ~ 25 個のアミノ酸の範囲の長さを有するペプチドを含む、MHC / ペプチド多量体。

【請求項 4】

アミノ酸配列：REEYARFDS DVGEYR (配列番号：1) 又は配列番号：1 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、15 又は 16 個のアミノ酸長の単離されたペプチドを、特異的に認識する、Tリンパ球。

【請求項 5】

請求項 3 に記載される MHC / ペプチド多量体で、MHC / ペプチド多量体染色により CD8⁺CD45RC^{low} Treg 集団を単離する工程を含む、請求項 1 又は 2 記載のペプチドを特異的に認識する CD8⁺CD45RC^{low} Treg 集団を単離するための、in vitro 又は ex vivo 法。

【請求項 6】

アミノ酸配列：REEYARFDS DVGEYR (配列番号：1) 又は配列番号：1 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、15 ~ 40 個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドを含む培養培地により、形質細胞様樹状細胞集団の存在下において、CD8⁺ Treg 集団を培養する工程を含む、CD8⁺CD45RC^{low} Treg 集団を生成するための in vitro 又は ex vivo 法。

【請求項 7】

ペプチドが、アミノ酸配列：NREEYARFDS DVGEYR (配列番号：2) 又は配列番号：2 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 6 記載の in vitro 又は ex vivo 法。

【請求項 8】

請求項 3 記載の MHC / ペプチド多量体を含む培養培地により、CD8⁺ Treg 集団を培養する工程を含む、CD8⁺CD45RC^{low} Treg 集団を生成するための in vitro 又は ex vivo 法。

【請求項 9】

薬剤として使用するための、アミノ酸配列：REEYARFDS DVGEYR (配列番号：1) 又は配列番号：1 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、15 ~ 40 個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチド、及び薬学的に許容し得る担体を含む、医薬組成物。

【請求項 10】

寛容の誘導を必要とする患者において寛容を誘導するのに使用するための、アミノ酸配列：REEYARFDS DVGEYR (配列番号：1) 又は配列番号：1 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、15 ~ 40 個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチド、及び薬学的に許容し得る担体を含む、医薬組成物。

【請求項 11】

寛容が、ドナー特異的寛容である、請求項 10 記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 12】

医薬組成物が、移植拒絶の予防又は減少を必要とする患者において移植拒絶を予防又は減少させるのに使用するための、請求項 10 又は 11 記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 13】

ペプチドが、アミノ酸配列：NREEYARFDS DVGEYR (配列番号：2) 又は配列番号：2 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

単離されたペプチドが、アミノ酸配列：

【表 1 5】

NREEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 2),
 REEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 3);
 REEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 4);
 QEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 5);
 REEYARFDSVDVGVYR (配列番号: 6);
 NREEYARFDSVDVGEFR (配列番号: 7);
 NREEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 8);
 NQEEYARFDSVDVGEYR (配列番号: 9); 又は
 NREEYARFDSVDVGVYR (配列番号: 10).

を含む、15 又は 16 個のアミノ酸長のペプチドである、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 15】

a) アミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R (配列番号：1) 又は配列番号：1 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、15 ~ 40 個のアミノ酸の範囲の長さを有する単離されたペプチドであって、下記ペプチド：

【表 1 6】

QEEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 29);
 NREEFVRFDSVDVGEFR (配列番号: 30);
 REEFVRFDSVDVGEFR (配列番号: 31);
 HQEEYVRFDSVDVGEYR (配列番号: 32);
 HQEEYVRFDSVDVGEYRA (配列番号: 33);
 HQEEYVRFDSVDVGEYRAV (配列番号: 34);

を除く、ペプチド、又は

- b) 該ペプチドをコードする核酸、又は
- c) 該核酸を含むベクター、又は
- d) 該発現ベクターを含む宿主細胞、又は
- e) 請求項 3 記載の MHC / ペプチド多量体、又は

f) 複合体 MHC 分子、及びアミノ酸配列：R E E Y A R F D S D V G E Y R (配列番号：1) 又は配列番号：1 と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、15 ~ 40 個のアミノ酸の範囲の長さを有するペプチドを含む抗原提示細胞、又は

g) 請求項 4 記載 T リンパ球と、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 16】

移植患者が寛容であるかを判定するための *in vitro* 法であって、前記移植患者から得られた生体サンプル中の CD8⁺CD45RC^{low} Treg の存

在を、前記生体サンプルと、請求項3記載のMHC / ペプチド多量体からなり、 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregと選択的に相互作用可能な結合パートナーとを接触させることにより判定する工程を含み、 $CD8^+ CD45RC^{low}$ Tregの存在が寛容を示す、方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K	38/10	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K	35/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	

(72)発明者 ギロンノ - , カロル
フランス国、エフ - 4 4 0 9 3 ナント、ベデ・ジャン・モネ 3 0、 セアッシュユ・オテル -
デュー、アンセルム・ユエムエール 1 0 6 4

(72)発明者 アネゴン , イグナシオ
フランス国、エフ - 4 4 0 9 3 ナント、ベデ・ジャン・モネ 3 0、 セアッシュユ・オテル -
デュー、アンセルム・ユエムエール 1 0 6 4

(72)発明者 ピカーダ , エロディエ
フランス国、エフ - 4 4 0 9 3 ナント、ベデ・ジャン・モネ 3 0、 セアッシュユ・オテル -
デュー、アンセルム・ユエムエール 1 0 6 4

F ターム(参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 AC16 BA02 BC03 BC07 BC11 CA24 CA44
4C084 AA13 BA01 BA02 BA08 BA18 BA19 BA23 CA59 DA01 DC50
NA14 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082
4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 BB65 NA14 ZB07 ZB08
4H045 AA10 AA11 BA10 BA17 BA18 BA19 CA40 DA01 EA20 FA74
GA23

【外国語明細書】
2020055845000001.pdf

专利名称(译)	分离的供体mhc衍生肽及其用途		
公开(公告)号	JP2020055845A	公开(公告)日	2020-04-09
申请号	JP2019219661	申请日	2019-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院 单威赛引用和南特		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 Université南特		
[标]发明人	ギロンノカロル アネゴンイグナシオ ピカーダエロディエ		
发明人	ギロンノ-,カロル アネゴン,イグナシオ ピカーダ,エロディエ		
IPC分类号	C07K14/74 C07K5/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/0783 C12N15/63 A61P37/02 A61P37/06 A61K38/10 A61K38/16 A61K48/00 A61K35/12 A61K35/17 A61K35/15 G01N33/53 C12N15 /12		
CPC分类号	A61P37/06 C07K14/70539 A61K39/001 A61K2039/577 C12N5/0637 C12N2501/50 C12N2502/1121 G01N33/56972 G01N2333/70539 G01N2800/245 G01N2800/52		
FI分类号	C07K14/74.ZNA C07K5/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/0783 C12N15/63.Z A61P37/02 A61P37/06 A61K38/10 A61K38/16 A61K48/00 A61K35/12 A61K35/17.Z A61K35/15.Z G01N33/53.Y C12N15/12		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC16 4B065/BA02 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065 /BC11 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/CA59 4C084/DA01 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084 /ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB64 4C087/BB65 4C087/NA14 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA17 4H045 /BA18 4H045/BA19 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA23		
优先权	2014163081 2014-04-01 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及衍生自供体MHC II类分子的多态性区域的肽，其在需要其的患者中诱导耐受并因此防止移植排斥。本发明涉及一种长的15或16个氨基酸的分离的肽，其包含以下氨基酸序列或由其组成：
REEYARFSDVGEYR (SEQ ID NO : 1) 或用作药物的功能保守的变体。本发明涉及用于确定移植患者是否耐受的体外方法，包括确定从所述移植患者获得的生物样品中CD8 + CD45RClow Treg的存在步骤，其中CD8 + CD45RClow Treg的存在指示公差。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2020-55845 (P2020-55845A)
		(43) 公開日 令和2年4月9日 (2020. 4. 9)
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
C07K 14/74 (2006.01)	C07K 14/74 ZNA	4B065
C07K 5/08 (2006.01)	C07K 5/08	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C087
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	
審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 56 頁) 最終頁に続く		
(2) 出願番号	特願2019-219661 (P2019-219661)	(7) 出願人
(2) 出願日	令和1年12月4日 (2019. 12. 4)	アンスタイチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エドゥ ラ ルシエルシュ メ ディカル
(6) 分類の表示	特願2016-559818 (P2016-559818) の分類	フランス国、エフ-75013 パリ、リ ュ・ドゥ・トルビアク 101
原出願日	平成27年4月1日 (2015. 4. 1)	(7) 出願人
(3) 優先権主張番号	14163081.4	ユニヴェルシテ・ドゥ・ナント フランス国、44000 ナント、ケ・ド ゥ・トルヴィル 1
(3) 優先日	平成26年4月1日 (2014. 4. 1)	(7) 代理人
(3) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	110001508 特許業務法人 津国
最終頁に続く		

(5) 【発明の名称】 単離されたドナーMHC由来ペプチド及びその使用