

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512083

(P2005-512083A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	2 G O 4 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 51/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-551502 (P2003-551502)	(71) 出願人	504222481 バイオテックティッド ゲゼルシャフト ミ ット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ連邦共和国 ライプツィヒ デリッ ツシャー シュトラーセ 1 3 5
(86) (22) 出願日	平成14年12月9日 (2002. 12. 9)	(74) 代理人	100061815 弁理士 矢野 敏雄
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月9日 (2004. 6. 9)	(74) 代理人	100094798 弁理士 山崎 利臣
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/013939	(74) 代理人	100099483 弁理士 久野 琢也
(87) 国際公開番号	W02003/050499	(74) 代理人	100114890 弁理士 アインゼル・フェリックス＝ライ ンハルト
(87) 国際公開日	平成15年6月19日 (2003. 6. 19)		
(31) 優先権主張番号	101 60 653.2		
(32) 優先日	平成13年12月11日 (2001. 12. 11)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(31) 優先権主張番号	102 32 189.2		
(32) 優先日	平成14年7月16日 (2002. 7. 16)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

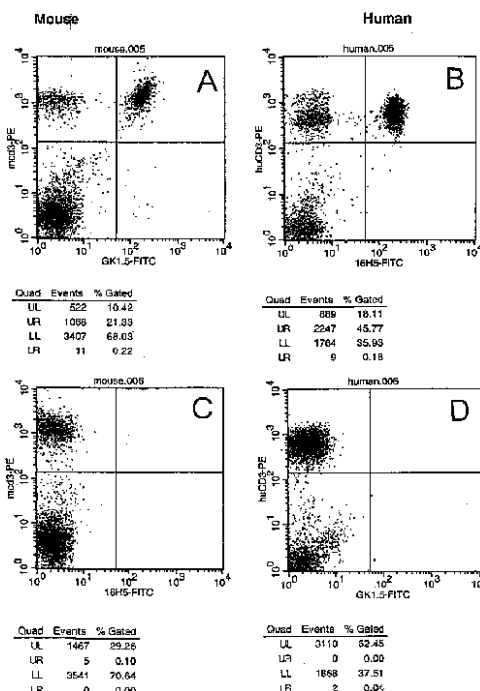
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞集団の移動パターンおよび／または分布パターンを分析するための診断薬を製造するためのヒトCD4分子に特異性を有する標識リガンドの使用

(57) 【要約】

本発明は、ヒトの個体中で、CD4を有する細胞を含有する細胞集団に特定の移動パターンおよび／または分布パターンを分析するための、ヒトCD4分子に親和性を有する診断薬を製造するための標識リガンドの使用に関する。

さらに、本発明は、CD4分子とCD4を有する細胞に特異性を有する標識リガンドを含有する組成物、ならびにヒトCD4を有する細胞が臨床的に重要である疾患の程度と進行を決定する方法に関する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒトの個体中でヒトCD4を有する細胞を含む細胞集団の移動パターンおよび/または分布パターンを分析するための診断薬を製造するためのヒトCD4分子に特異性を有する標識リガンドの使用。

**【請求項 2】**

標識リガンドは、抗体、抗体フラグメント、組換え抗体、組換え抗体フラグメント、CD4表面抗原に対して高い親和性を有する合成ペプチド、ペプチドミメティック、カーボンナノヒドレート、タンパク質およびグリコプロテインおよびアプタマーから成る群から選択される、請求項1に記載の使用。

10

**【請求項 3】**

抗体、抗体フラグメント、組換え抗体または組換え抗体フラグメントは、モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体フラグメントであるか、またはこれらから由来する、請求項2に記載の使用。

**【請求項 4】**

抗体、抗体フラグメント、組換え抗体または組換え抗体フラグメントは、SEQ ID NO.1からSEQ ID NO.6に記載される配列を認識し、これに結合する、請求項2または3に記載の使用。

**【請求項 5】**

抗体、抗体フラグメント、組換え抗体フラグメントの組換え抗体は、ヒトCD4のコンフォメーションエピトープを認識し、かつこれに結合する、請求項2から4までのいずれか1項に記載の使用。

20

**【請求項 6】**

抗体、抗体フラグメントまたは組換え抗体または組換え抗体フラグメントは、抗-CD4-抗体である、請求項2から5までのいずれか1項に記載の使用。

**【請求項 7】**

リガンドの標識は、 $\beta$ -エミッター、ポジトロンエミッター、磁気材料、密度コントラスト材料およびこれらの混合物から成る群から選択される、請求項1から6までのいずれか1項に記載の使用。

**【請求項 8】**

リガンドの標識は、インジウム-111、テクネチウム99m、テクネチウム-99、ヨウ素-132、医学的画像提供法のための他のラジオアイソトープならびにこれらの混合物から成る群から選択される1種以上のラジオアイソトープを含む $\beta$ -エミッターである、請求項6に記載の使用。

30

**【請求項 9】**

ラジオアイソトープがテクネチウム99mまたはインジウム-111である、請求項8に記載の使用。

**【請求項 10】**

リガンドの標識は、フッ素-18、炭素-11、ヨウ素-124、医学的画像提供法のための他のアイソトープならびにこれらの混合物から成る群から選択される1種以上のアイソトープを含むポジトロンエミッターである、請求項7に記載の使用。

40

**【請求項 11】**

リガンドの標識は、ガドリニウム、超常磁性物質、水酸化鉄粒子、医学的画像提供法のための他の材料ならびにこれらの混合物から成る群から選択される磁気材料を含む、請求項7に記載の使用。

**【請求項 12】**

標識リガンドは、密度コントラスト材料を含む、請求項7に記載の使用。

**【請求項 13】**

ヒト-CD4を有する細胞は、T-リンパ球、B-リンパ球、単球、マクロファージ、樹状細胞およびランゲルハンス細胞および好酸性顆粒から成る群から選択される、請求項

50

1 から 1 2 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 4】

リンパ球は、非リンパ性細胞を含むグループまたは集団から選択される、請求項 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 5】

細胞集団はヒトの個体から由来する、請求項 1 から 1 4 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 6】

C D 4 - 分子および C D 4 を有する細胞または粒子に特異性を有する標識リガンドを含む組成物。

【請求項 1 7】

C D 4 を有する細胞または粒子は、ヒト C D 4 を有する細胞または粒子である、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

診断薬としての請求項 1 6 または 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

個体中の移動パターンおよび / または分布パターンを決定するための診断薬を製造するための、請求項 1 6 から 1 8 までのいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 2 0】

疾患の程度と進行を決定する方法において、ヒト - C D 4 を有する細胞は、臨床的に重要であり、以下の段階を有する：

- a) 個体でのヒト C D 4 を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンの *in vivo* 分析を用意する
- b) 個体でのヒト C D 4 を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンのスタンダードな *in vivo* 分析を用意する
- c) 段階 a) と段階 b) で用意された分析の相違を決定し、これにより疾患の程度と進行を決定する

ことを特徴とする、疾患の程度と進行を決定する方法。

【請求項 2 1】

疾患は、自己免疫疾患、腫瘍疾患、感染症、移植後の反発発症から成る群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

段階 b) でのスタンダードな分析は、健康な個体でのヒト C D 4 を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンの分析である、請求項 2 0 または 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

段階 b) でのスタンダードな分析は、同じヒトの個体の先行する分析から得られた個体の分布パターンおよび / または移動パターンである、請求項 2 0 または 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

段階 a) では、付加的に疾患に対する治療を受けた個体でのヒト C D 4 を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンの分析を用意する、請求項 2 0 から 2 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

治療の内容は、化合物または医薬品の投与である、請求項 2 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトの個体で C D 4 を有する細胞を含む特定の細胞集団の移動パターンおよび / または分布パターンを分析するための診断薬を製造するためのヒト C D 4 分子に特異性を有する標識リガンドの使用に関する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 2 】

モノマーのグリコプロテインCD4は、ヘルパーT-リンパ球の特徴的な細胞表面分子である。これは、55kDaの分子量を有し、細胞外領域、疎水性浸透膜ならびに細胞質部分から成る。ヒトCD4は、ヒトのヘルパーT-リンパ球上に発現するだけでなく、僅かな密度で、骨髄と胸腺内のT-リンパ球-前駆体上にも発現する。ヒトの場合は、単球、マクロファージ、樹状細胞および好酸性顆粒は、CD4分子 [ Marsh & Pelchen-Matthews, 1996 ] も有する。ヒトCD4遺伝子は、第12染色体の短腕上に位置している [ Isobe et al., 1986 ]。

## 【 0 0 0 3 】

CD4分子は、免疫グロブリンスーパーファミリーのその4つ免疫グロブリン様細胞外ドメイン(D1~D4)に基づいて分類されている [ Maddon et al., 1985 ]。アミノ末端ドメイン1(D1)は、変化可能な免疫グロブリンドメインのような類似構造を有する。ドメイン2(D2)と一緒に、これは、全部で60オングストロームの長さを有する固い構造を形成する。ドメインD1とD2は、柔軟なジョイントを介してドメインD3とD4に結合する。

## 【 0 0 0 4 】

最も重要な天然のCD-4リガンドは、いわゆる抗原提示細胞(APC)上の主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex, MHC)のクラスII分子である。この場合に、これは抗原構造を選別する免疫系の特殊細胞であり、これは免疫応答を識別することができる。CD4分子の細胞外ドメインD1とD2は、主にMHC-クラスII分子の2-鎖の非多形部位と結合する [ Clayton et al., 1989; Cammarota et al., 1992 ]。おそらく、MHC-クラスII分子(MHC-II)のa2-鎖もCD4との相互作用に重要なものかもしれない [ Vignali et al., 1996 ]。

## 【 0 0 0 5 】

それらのD1-ドメインを介して、CD4分子は相互に結合することができ、これによりT-細胞レセプター(TZR)/MHC-II-ペプチド-錯体を安定化し、シグナルトランスダクションの効果を高める官能性オリゴマーが生じる [ Li et al., 1998 ]。隣接するドメインD3とD4を介して、CD4はTZR/CD3-錯体とも結合する [ Vignali et al., 1996 ]。CD4分子は、TZRと抗原ペプチド提示MHC-IIとの相互作用の間に、T細胞の抗原特異性刺激を強める。よって、CD4-コレセプター系は、抗原の反応性を高めるだけでなく、高い抗原特異性の保持も可能にする [ Koenig et al., 1996 ]。

## 【 0 0 0 6 】

CD4は、T-リンパ球中でのシグナルトランスダクションを活性化する。それらの細胞質ドメインは、いわゆるsrc-ファミリーのT細胞に特異的なタンパク質-チロシンキナーゼ(p56lck)と共有結合しない [ Veillette et al., 1988 ]。細胞質CD4-ドメインの近隣部位は、システイン基を介してp56lckのN-末端領域と相互作用する [ Turner et al., 1990 ]。

## 【 0 0 0 7 】

さらに天然のヒトCD4のCD4-リガンドは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のgp120、化学走性サイトカインIL-16、免疫グロブリンである。gp120とMHC-IIの結合部位は、同一ではなく、近くで並んで、部分的にオーバーラップして存在する。HIV gp120は、主にCD4分子のD1ドメインに結合する [ Clayton et al., 1989 ]。HIVによるCD4+細胞の感染は、細胞表面上のCD4-発現の傷害を招く [ Hoxie et al., 1986a ]。これにより、APCのMHC-IIと相互作用する感染細胞の能力が低減し、疾患の進行を促進してしまう。

## 【 0 0 0 8 】

慢性および慢性-再発性炎症が多くの疾患と共に生じ、この場合に免疫系が重要である。慢性-再発性炎症が、種々の器官もしくは組織を襲う。急性疾患とは異なり、炎症巢中に原則的に質が変化した細胞タイプが蓄積する。これは特異的表面分子を用いて同定することができる。これらの分子は、特にヘルパーT-リンパ球、単球、マクロファージ、樹

10

20

30

40

50

状細胞および好酸性顆粒上に種々の強さで発現するヒトCD4分子である。これらの細胞、特にT-リンパ球は、慢性炎症細胞の実質的な集団である。

【0009】

特定のモノクローナル抗体は、ヒトCD4分子を高い特異性で認識することができ、このタンパク質構造に結合し、ひいては炎症中のヒトCD4発現細胞に高い特性で結合する。

【0010】

生理的条件下では、これらの炎症細胞は不活性な分化状態で存在し、特徴的な移動パターンおよび/または分布パターンで、第一および第二リンパ器官ならびに循環血液を巡る。

【0011】

さらに、ヒトCD4を有する細胞からは、悪性または良性腫瘍疾患を生じる原因である腫瘍細胞が発生する。特定の腫瘍疾患、例えば、特定のリンパ腫の場合には、ヒトCD4分子が発現したままであり得る。従って、CD4発現細胞の質的かつ量的検出が*in vitro*で確立された免疫診断法である。一方でフローサイトメトリック分析は、末梢血管中での量的な検出を可能とし、*ex vivo*免疫組織学的方法を用いて、すなわち、生検により疑わしい組織や、その位置的分布パターンを分析することができる。

【0012】

しかし、両方の方法は、生きた生物中のT-ヘルパー細胞の移動パターンおよび/または分布パターンもしくは疾患のある組織/器官内であり得る蓄積およびそれらの程度の客観的な証言を提供できる状況にない。これは、以下の原因を有する：

- 1) 末梢血管は、最大5%が、体のあらゆるヒトCD4発現細胞の限られた代表的部分だけを有する。
- 2) 各固体は、日を追って、末梢のヒトCD4発現細胞の数に相当の多様性がある。
- 3) 末梢のヒトCD4発現細胞数は、慢性炎症巢中で空間的に限定された蓄積の同定および局在化を決して可能にできず、または局在化はヒトCD4発現細胞を腫瘍へと変質させてしまう。
- 4) 生検が、診断薬にとって決定的な炎症巢または腫瘍または転移の領域に命中する可能性が低い。
- 5) 生検材料から、炎症領域または腫瘍または転移の実際の空間的な広がりを推論することができない。
- 6) 経過コントロールまたは治療コントロールは、繰り返し生検によってのみ可能であり、かつ当事者自体に重大な負担をもたらす。

【0013】

米国特許第6146614号明細書には、画像提供法を使用して哺乳類でのリンパ球分布および移動を決定する方法および種々の疾患の経過を診断するため、ならびにこのような疾患に関する種々の治療の応答を監視するため、および前記疾患を治療するための医薬品を同定するための、これらの決定の使用が記載されている。米国特許第6146614号明細書の実施例は、マウスCD4抗原に対するモノクローナル抗体の使用に関する。1実施例は、ヒトの細胞を標識するためのこのような抗体の使用に関する。しかし、これらの実施例は、ヒトCD4とマウスCD4との間で何の交叉反応も無いという一般的に公知の事実に対して反論している。本明細書の例7は、相応する比較試験を示しており、これから米国特許第6146614号明細書に記載されているマウスCD4に対する抗体がヒトCD4に対して何の交叉反応も示されないことが判明する。従って、米国特許第6146614に記載された方法は、ヒトの個体でのCD4を有する細胞の分布パターンおよび移動パターンを決定するために適切ではない。

【0014】

上記の慣習的診断法の制限に基づき、移動パターンおよび/または分布パターン、およびCD4表面分子を有する炎症細胞と腫瘍細胞の蓄積を非侵襲的に決定するための方法、ならびに治療条件(治療コントロール)下で、それらを再分散もしくは分解する至急の必要性がある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

従って、本発明は、上記先行技術の欠点を克服することに課題の根底を成している。特に、侵襲性診断法を用いてヒトの個体中でヒトCD4発現細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを決定できることが本発明の課題である。

## 【 0 0 1 6 】

本発明のもう一つの課題は、慢性炎症疾患、感染疾患または腫瘍疾患またはヒトの個体が移植後に免疫抑制治療に（疑いのある）診断を有する患者においてヒトCD4発現細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを安全で効果的かつ簡単に決定することである。

## 【 0 0 1 7 】

本発明のもう一つの課題は、慢性炎症浸潤の場合に前記表面抗原を有する細胞が急性浸潤の場合よりも多く存在する認識に基づいて、慢性炎症病巣、例えば自己免疫疾患と、急性炎症、例えば、感染に条件付けられる炎症との識別を可能にすることである。よって、リウマチ様関節炎の際に慢性炎症滑膜内には、CD4発現細胞が増えていることが証明できる。ここでは、末梢血管に対してCD4/CD8の比が2~7倍に高まる [Immunology of rheumatic diseases. Hrsg. S. Gupta & N. Talal. Plenum Medical Book Company, New York and London, 1985]。さらに、ヘルパーT-リンパ球の抗原特異的活性は、結果としてCD4-表面発現の著しい増大を伴う [Ridgeway et al., 1998, J. Immunology 161:714-720]。

10

## 【 0 0 1 8 】

本発明のもう一つの課題は、自己免疫疾患の場合の空間的広がりおよび炎症巣の強度の局在化と決定を可能にし、ならびに自己免疫疾患の経過または自己免疫疾患の場合の治療法の影響を評価することである。

20

## 【 0 0 1 9 】

本発明のもう一つの課題は、造血系の悪性および良性疾患において（疑いのある）診断を有するヒトの個体中でヒトCD4発現腫瘍もしくはそれらの転移を、安全に、効果的かつ簡単に局在化し、ヒトCD4を有する腫瘍もしくはそれらの転移の空間的広がりを決定し、腫瘍疾患（経過コントロール）の経過と腫瘍疾患（治療コントロール）の場合の治療法を評価することである。

## 【 0 0 2 0 】

本発明によれば、これらの課題は、ヒトの個体中でヒトCD4を有する細胞を含む特定の細胞集団の移動パターンおよび/または分布パターンを分析するための診断薬を製造するためのヒトCD4分子に特異性を有する標識リガンドを使用することにより解決された。

30

## 【 0 0 2 1 】

ヒトの生体での細胞集団でヒトCD4を有する細胞の空間的位置もしくは配置は、本発明による意味では分布パターンと称される。ヒトCD4発現細胞の位置または配置は、固有の組織内または導入された外部組織内での分布および合成材料もしくは上記外部組織および合成材料の境界面での配置に関する。

## 【 0 0 2 2 】

ヒトCD4を有する粒子の分布は、ヒトの生体に投与された後に生じる。分布パターンは、全部の生体でも、生体の一部に関しても決定することができる。

40

## 【 0 0 2 3 】

ヒトCD4を有する粒子に関しては、ヒトCD4分子を組換え生成物系で製造することができる (recCD4)。recCD4で、様々な大きさの適切な担体を被覆することができる。担体材料は、プラスチック粒子であることができるが、しかし膜に包囲され、内部に治療上活性な物質を含有している形成物であることもできる。従って、ヒトCD4分子を、担体または粒子または小胞体、例えば、リポソームに認識構造（ガイド）として取り付けることができ、これらを例えば、薬理学的物質で充填して、CD4と相互作用した分子を再び有する目的細胞の近くに持って行くことができる。これらの分子は、種々の

50

体細胞上に発現するMHC - クラスII抗原のメンバー（ヒトHLA - クラスII抗原）、例えば、単球、マクロファージ、樹状細胞、B - 細胞であり、更なる一連の細胞上で、環境因子、例えば、特定のサイトカインの影響下に調節することができる。MHC - クラスII分子の調節（Heraufregulierung）は、病原性プロセスと関連してもたらされるため、特定の組織領域内でヒトCD4に誘導された薬理学的作用物質を統制する可能性が生じる。CD4を有する粒子は、例えば、相補的構造を検出するために、例えば、HIVの表面タンパク質gp120に使用し、抗ウイルス性作用物質の局所的富化を伝えることができる。しかし、抗CD4抗体または抗体フラグメントを粒子、分子または小胞体へ結合し、次にCD4を有する組織領域中に誘導される分子の“ガイド”として考えることもできる。

【0024】

ヒトCD4を有する細胞もしくは粒子の移動パターンとは、本発明の意味の範囲内では、組織および末梢血管を含めたヒトの生体内でのヒトCD4を有する細胞もしくは粒子の移動であると解釈される。ヒトCD4を有する細胞もしくは粒子の移動は、全体の生体またはその特定の部分もしくは器官に関して決定することができる。

【0025】

ヒトCD4発現細胞は、本発明の意味の範囲内では、単球、マクロファージ、樹状細胞およびランゲルハンス細胞、好酸性顆粒およびヘルパーT - リンパ球を含むことができる。特定の場合には、これらの細胞は、自己免疫疾患、感染症、悪性疾患の場合、または移植もしくはインプラントの場合の炎症性浸潤の組成物中に含有される。他の場合には、これらの細胞は、腫瘍が形成されるように、その制御を変更（変質）する。その他の場合には、器官または組織を移植した後、または合成代替物をインプラントした後の合併症が関係する。合併症が、移植片またはインプラントの損失を生じ得ることは共通である（免疫学的反発反応）。

【0026】

CD4を有する細胞と特異的に相互作用できる物質/化合物は、本発明の意味の範囲内ではリガンドと称される。リガンドは、例えば、細胞表面上で発現するか、または粒子の表面上で固定される特定の分子、この場合にはCD4分子と相互作用することができる。リガンドは、専らまたは広く大部分がCD4表面分子と相互作用し、かつこれらに結合する特性を有する、それぞれ任意の物質または化合物であることができる。

【0027】

本発明により使用可能な診断薬には、ヒトCD4分子に特異性を有する高親和性標識リガンドが含まれる。

【0028】

標識リガンドは、有利に、抗体、抗体フラグメント、組換え抗体、組換え抗体フラグメント、CD4表面抗原に高い親和性を有する合成ペプチド、ペプチドミメティック、カーボンハイドレートおよびグリコプロテインから成る群から選択される。標識リガンドは、特に有利にヒトCD4分子のD1 - ドメイン中のエピトープを認識するのが有利である。

【0029】

特に、抗体、抗体フラグメント、組換え抗体および/または組換え抗体フラグメントが有利であり、その際、モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体フラグメントまたはそれから由来する抗体または抗体フラグメントがとりわけ有利である。さらに、抗体、抗体フラグメント、組換え抗体または組換え抗体フラグメントは、有利にSEQ ID NO.1~SEQ ID NO.6に記載された配列を認識し、かつこれに結合する。特に有利には、抗体、抗体フラグメント、組換え抗体または組換え抗体フラグメントは、ヒトCD4のコンフォメーションエピトープ（図2）を認識し、かつこれに結合する。抗体、抗体フラグメントまたは組換え抗体または組換え抗体フラグメントは、抗 - CD4抗体であることができる。抗体フラグメントは、本発明により特に有利に使用可能である。

【0030】

リガンドは、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であることができ、その際、モノクローナル抗体が有利であり、特にモノクローナル抗体Max. 16H5が有利である。しか

10

20

30

40

50

し、全部の抗体は、イムノゲンであることができ、ヒトの生体に投与後に、それ自体に向けられた免疫反応を誘発する。小さなリガンドは、僅かなイムノゲンであるので、これらは有利なリガンドである。

【0031】

小さなリガンドとして、抗体フラグメント、例えば、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'またはFabが有利である。特に、抗 - ヒト - CD4 - Fab' - フラグメント、とりわけモノクローナル抗体Max.16H5のものが有利である。

【0032】

小さなリガンドの1例は、OKT3(Orthoklon)である。Orthoklonは、マウスハイブリドーマ細胞から形成されるモノクローナル抗 - ヒト - CD3 - 抗体であり、Orthoによる製剤学的例示は、移植後の免疫学的反発反応を治療するために使用できる。他のモノクローナル抗体または抗体フラグメント(例えば、ヒトCD4に対する)は、自体公知の方法でハイブリドーマテクニックを使用して製造できる。

10

【0033】

リガンドとして、組換え法を用いて微生物中で製造されるような抗体または抗体フラグメント、例えば、一本鎖抗体、例えば、single chain Fv(scFv)、抗体類似構造、例えば、微抗体(minibody)、およびヒトCD4(human-CD4)のような表面分子に特異的に結合できる、例えば組換え抗体のような別のフラグメントを使用できる。

【0034】

さらに、リガンドとして、ヒトCD4のような表面分子に高い特異性で結合できるタンパク質、グリコプロテイン、ペプチド、ペプチドミメティック、脂肪族および環式炭水素化合物およびアプタマーを使用できる。ペプチドミメティックとは、ペプチドではないが、サイズ分布および電荷分布のような重要な特性について類似している化合物を意味する。アプタマーは、上記の表面分子、例えば、ヒトCD4に高い親和性を有するDNA-構造またはRNA-構造である。

20

【0035】

リガンドの標識は、医学的画像提供の方法を用いて標識リガンドの時間的かつ空間的に局在化を可能にする、それぞれの標識分子により行うことができる。

【0036】

標識リガンドは、有利に、<sup>99m</sup>Tc-エミッター、<sup>111</sup>In-エミッター、<sup>67</sup>Ge-エミッター、磁気材料、密度コントラスト材料およびこれらの混合物から成る群から選択される。

30

【0037】

標識リガンドは、インジウム-111、テクネチウム-99m、テクネチウム-99、ヨウ素-132、医学的画像提供法のための他のラジオアイソトープならびにこれらの混合物から成る群から選択される1種以上のラジオアイソトープを含む<sup>99m</sup>Tc-エミッターであることができる。前記ラジオアイソトープは、特に有利にはテクネチウム-99mまたはインジウム-111である。

【0038】

さらに有利な実施態様では、標識リガンドは、フッ素-18、炭素-11、ヨウ素-124、医学的画像提供法のための他のアイソトープならびにこれらの混合物から成る群から選択される1種以上のアイソトープを含む<sup>99m</sup>Tc-エミッターである。

40

【0039】

もう1つの有利な実施態様では、標識リガンドは、常磁性物質、例えば、ガドリニウム、超常磁性物質、水酸化鉄粒子、他の医学的画像提供法のための材料ならびにこれらの混合物から成る群から選択される磁気材料を含むことができる。

【0040】

標識リガンドは、密度コントラスト材料を有することもできる。

【0041】

ヒト-CD4を有する細胞は、有利にT-リンパ球およびB-リンパ球、単球、マクロファージ、樹状細胞および長腕細胞ならびに好酸性顆粒から成る群から選択され、特にリ

50

ンパ球は、非リンパ性細胞を含むグループまたは集団から選択されることができる。

【0042】

ヒトCD4を有する細胞を含む細胞集団の移動および/または分布パターンの分析は、診断薬とCD4を有する細胞との特異的な相互作用により、ヒトの個体に標識リガンドを投与した後に行われる。in vivo-診断薬の特異的な相互作用は、結果として標識された細胞中で生じる。これらの細胞は、炎症浸潤、特に慢性炎症の場合に決定的に関与する。

【0043】

二者択一的に、ヒトCD4を有する細胞を含む細胞集団の移動パターンと分布パターンの分析は、ヒトの生体から生じ、CD4を有する細胞を含有する細胞集団との特異的な相互作用により、ヒトの生体外で行うことができる。この場合にも、生体内に導入された標識細胞内で特異的な相互作用が生じる。体外の細胞の標識を同じ患者に使用することは、核医学では十分に通常である。しかし、これまでに、この方法で細胞は直接に種々のアイソトープで標識されてきた。このことは、患者の健康保護（患者に戻る前に結合していない放射能を除去する）に役立つ技術的理由（標識に必要な十分に高い濃度）によるか、または/および経済的理由（高価な製品を標識に効果的な極めて少ない量で使用する）がある。

10

【0044】

この場合に、ヒトの生体の外側での標識は、次のように行われる：患者から血液を取る。この血液から細胞を作成し、体の外側で、アイソトープで標識されたリガンド、例えば、抗CD4抗体と一緒にインキュベーションする。この後に、結合していないリガンドを除去し、かつ精製した細胞プレパレーションを同じ患者に再び注射する。次に、公知かつ記載された方法（ガンマカメラまたは検出器ソング）で体内の標識細胞の分布を追う。これらの方法は、例えば、手術の際に標識細胞を腫瘍または腫瘍の周囲に注射する場合に使用するのが有利である。よって、これらは流出するリンパ管と後続のリンパ節を探す。このように、鉛筆に似た検出器ソングを用いて、手術の間どのリンパ節に前記細胞が優先的に流れ込むかを確認することに成功する。特によく利用されるリンパ節は、おそらく転移の場所であるので、外科医は、これらをすぐに取り除くことができる。

20

【0045】

本発明による診断薬の使用によって、医学的画像提供法を用いて、CD4表面分子を有する細胞の生体内での移動パターンおよび/または分布パターンを決定することができる。前記移動パターンおよび/または分布パターンの描写の可能性は、通常かつ病理学的条件下で可能であり、疾患の程度と進行度が決定され、この場合に前記細胞は臨床的に重要である。

30

【0046】

特に、本発明による診断薬の使用を用いて、ヒトCD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンの分析により、ヒトの生体内での慢性炎症巣が局在化し、かつ急性炎症と区別できる。ヒトCD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンの分析は、とりわけ疑いのある診断を解明し、臨床上の経過をモニターし、抗炎症治療の結果コントロールに適切である。

【0047】

ヒトCD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを分析するためのもう一つの適用分野は、悪性細胞（腫瘍細胞）を見つけ出すことであり、この上に前記表面分子が発現し、かつ診断薬と相互作用するため、標識された腫瘍細胞が生じる。特に、ヒトCD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンの分析は、造血系の腫瘍の局在化もしくはそれらの転移に役立ち、これらの上に、前記表面分子が発現する。

40

【0048】

さらに、診断薬を用いて、いわゆる放射免疫治療（RIT）を実施できる。このRITに関しては、診断的ラジオアイソトープは、これに対して、例えば、 $^{125}\text{I}$ -エミッターとしてのRe-186、Re-188、J-131、Y-90、Sm-153、 $^{125}\text{I}$ -エミッターとしてのBi-213のような強い $\alpha$ -または/および $\beta$ -放射線と交換される。この場合に、誘導化された同じ種類の抗

50

体、それらのフラグメントもしくはリガンドが使用される。DTPA - 誘導化分子は、例えば、In-111とY-90である。J-123とJ-131ならびにTc-99とRe-188は、診断と治療のための異なるアイソトープのペアである。治療で費やされたラジオアイソトープにより放射された - または / および - 放射線は、放射免疫治療薬の直接的な環境にあるか、またはこれにより標識される細胞を破壊する。このように、標識された腫瘍細胞もしくは有害な炎症細胞または他の不所望な細胞を選択的に破壊することができる。ここでは、CD4分子を有する細胞だけではなく、直接的に囲んでいる細胞も損害または分解されるのが有利である。広く除去されて存在する組織は妨害されない。

#### 【0049】

本発明による診断薬は、さらに感染症、例えば、ウイルス性疾患の場合に炎症細胞を作成および定量化するために使用できる。これにより、例えば、リンパ節膨張、特定の腫瘍疾患の段階評価、経過コントロールおよび治療コントロール、および抗ウイルス性治療のモニターが可能である。

10

#### 【0050】

特に、以下のFormenkreisの疾患に疑いのある診断の場合に、ヒトの個体中で特定の細胞集団の移動パターンと分布パターンの分析に本発明を使用することが適切である：

自己免疫疾患、感染症、造血系の悪性および良性疾患、感染症、またはCD4もしくはCD8を有するT-リンパ球の病原性の意味を仮定するための疾患。

#### 【0051】

自己免疫疾患は、リウマチ性関節炎、多重硬化症、全身性エリテマトーデス、乾癬、または炎症性腸疾患、例えば、クローン病または潰瘍性大腸炎であることができる。悪性または良性疾患は、造血系の疾患、例えば、骨髄腫、リンパ腫、または白血病または充実性腫瘍、例えば、メラノーマ、腎細胞カルチノーマ、卵巣ガンまたは肺ガンであることができる。感染症は、バクテリアまたはウイルスにより引き起こされる全ての疾患、例えば、HIVであることができる。

20

#### 【0052】

診断薬としての標識リガンドの本発明による使用は、ヒトの個体で1種以上の移植組織片、例えば、細胞、組織または器官および / またはインプラント、例えば、組織代替物または血管代替物、デポー剤、ポンプまたはフィルターが存在する場合に、CD4を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンを決定することもできる。

30

#### 【0053】

移動パターンおよび / または分布パターンの決定は、有利に、医学的画像提供法、例えば、放射線画像、磁気共鳴法または場合によりコンピューター制御された断層画像提供法で実施できる。画像提供は、個別または連続撮影から成る。これは、個人の完全な撮影によるか、または部分的な撮影により行うことができる（スキヤニング）。

#### 【0054】

ガンマ放射線で標識されたリガンドの移動パターンおよび / または分布パターンは、ガンマカメラまたは単光子放射型コンピューター断層撮影法（single photon emission computed tomography, SPECT）用のカメラを用いて決定できる。ポジトロンエミッターは、例えば、ポジトロン断層撮影（positron emission tomography, PET）により決定することもできる。人体中での磁気粒子の移動および / または分布パターンは、磁気共鳴断層撮影法（MRT）または“磁気共鳴画像”（MRI）により決定できる。これらの画像提供法の使用は公知である。

40

#### 【0055】

全身分析（Scan）の医学的画像提供法は、有利である。本発明は、個々の生体部分または器官のスキヤンも含める。スキヤンは、分、時間、日、週、またはそれ以上長く、標識リガンドの投与に応じて実施することができる。正確な時点は、種々のファクターに左右され、例えば、標識リガンドの種類、量、ヒトCD4を有する細胞もしくは粒子の含量、または疾患の経過に左右される。正確な時間のファクターは、通常使用される最適アルゴリズムを用いて、経験豊かな当業者により算出することができる。医学的画像提供法は、

50

最後に個別または連続したスキャンを行う。

【0056】

CD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを分析するための標識リガンドを診断薬として本発明により使用することで、前記の1種以上の疾患を患ったヒトの個体中で治療的応答または治療的効果をさらに決定することができる。各個体は、相応する疾患の治療で処置される。治療上の反応として処置された個体中でCD4を有する移動パターンおよび/または分布パターンは、医学的画像提供法を用いて決定される。これは、治療がヒトCD4発現細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを変化するかどうかを決定するように行われる。

【0057】

CD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを分析するための標識リガンドを診断薬として本発明により使用することで、前記のような医学的画像提供法を用いることにより、化合物または医薬品がヒトの体内中でのヒトCD4発現細胞の分布パターンおよび/または移動パターンを変化させるかどうかを決定することにより、ヒトの生体中でのヒトCD4発現細胞の分布パターンおよび/または移動パターンを変化させる化合物もしくは医薬品のポテンシャルを見積もることができる。よって、分布パターンおよび/または移動パターンは、標準化した分布パターンおよび/または移動パターンと相違する場合に変化する。

【0058】

CD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを分析するための標識リガンドを診断薬として本発明により使用することで、化合物または医薬品がヒトの体内でヒトCD4発現細胞の分布パターンおよび/または移動パターンを変化させるかどうかを決定することにより、自己免疫疾患、腫瘍疾患または感染症を治療するための医薬品の同定に利用できる。化合物または医薬品の投与により得られる分布パターンおよび/または移動パターンは、前記の疾患を患っていないヒトの個体のものと比較される。

【0059】

CD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを分析するための診断薬としての標識リガンドを本発明により使用することで、非自己を移植した後、または他の理由で、可能性のあるイムノゲン細胞、組織器官を受け取るための、ならびに組織、器官およびそれらの機能を交換もしくは援助するための合成および半合成材料をインプラントーションした後に、免疫抑制療法の最適なガイドも可能にする。このことは、前記のような医学的画像提供法を用いて、ヒトCD4を有する細胞の分布パターンおよび/または移動パターンが、移植片/インプラントから連想される炎症反応もしくは免疫反応を解明するように変化するかどうかを決定することにより行われる。これらの推測を、標準化したパターンの前記の分布パターンおよび/または移動パターンとの相違によるか、または前記個人での以前の時点までに決定されたパターンとの相違により行うことができる。

【0060】

本発明のもう1つの対象は、CD4分子およびCD4を有する細胞または粒子に特異性を有する標識リガンドを含む組成物である。CD4を有する細胞またはヒトCD4を有する細胞の粒子または粒子が有利である。

【0061】

組成物が、治療または診断薬であるのが有利であり、組成物が個体、有利にはヒトの個体でCD4を有する細胞もしくは粒子の分布パターンおよび移動パターンを決定するための診断薬であるのが特に有利である。

【0062】

標識リガンドとCD4を有する細胞は、有利に上記のものである。粒子は、有利に種々の材料の球状粒子から選択される。粒子は、例えば、リポソームであることができる。CD4を有する粒子は、相補的な構造を有することができ、例えば、体細胞、バクテリアまたはウイルス上で相互作用し、これで標識されるか、または作用物質を近くに運ぶ。粒子は、医薬、有利には診断薬または治療薬を含有することもできる。

10

20

30

40

50

## 【0063】

本発明による組成物、特に診断薬は、ヒトの個体中でヒトCD4発現細胞もしくは合成粒子の移動を決定するために適切である。この目的のために、CDを有する細胞、例えば、炎症性細胞、または標識リガンドを有する粒子を、標識細胞または粒子を含む。

## 【0064】

本発明の組成物が得られるようにインキュベーションする。標識した細胞または粒子を含有する組成物、特に診断薬は、患者に投与でき、かつそれらの分布パターンと移動パターンは、前記のように医学的画像提供法により決定することができる。

## 【0065】

本発明による組成物、特に診断薬は、CD4を有する細胞および/または粒子を有する標識リガンドと接触させることにより製造することができる。CD4を有する細胞は、CD4を有する細胞の移動パターンおよび/または分布パターンを決定すべき、自体のヒトの個体から生じるか、または他のヒトの個体から生じることができる。組成物、特に診断薬の製造は、CD4を有する細胞または粒子に特異的な標識リガンドが相互作用され、その結果、標識されたヒトCD4を有する細胞または粒子が生じるようにin vitroで実施することができる。本発明による組成物が、CD4を有する細胞を含む場合には、ヒトCD4を有する細胞をリガンドで特異的に標識するために、分離または単離させてはならない。これらは、例えば、細胞集団で存在する。このような細胞集団は、ヒトCD4を有する細胞を標識するために、標識リガンドとインキュベーションすることができ、これにより、本発明による診断薬が得られる。ヒトCD4を有する細胞または粒子と相互作用された標識リガンドは、特異的な標識した細胞または粒子を生じる。この場合に、相互作用は、例えば、結合、会合、複合または共役を意味する。

## 【0066】

標識リガンドをヒトの個体へ投与することは、あらゆる方法を用いて実施でき、ヒトCD4を有する細胞または粒子とのその特異的相互作用がヒトの生体内で可能であり、その際、標識されたヒトCD4を有する細胞または粒子が発生または形成される。方法には、注射、注入、デポ剤への封入、インプランテーション、経口摂取および直腸投与ならびに局所投与が含まれる。有利な投与法は、注射であり、例えば、これは静脈内、皮内、皮下、筋肉内または腹腔内で行うことができる。特定の場合には、複数または組み合わせた投与法が使用される。標識リガンドは、溶解した形またはコロイド状で存在することができ、その際、ヒトの体内に投与するための担体液、例えば、注射用の水、生理食塩水が適切である。

## 【0067】

本発明による診断薬は、有利に0.01mg/kg~7mg/kg体重の投与量で使用される。リガンドが抗体の場合には、投与量は、0.2mg/診察から7mg/診察の間、もしくは0.003mg/kg~0.1mg/kg体重の間である。必要な放射能の量は、使用されるアイソトープにより決定され、経験豊かな専門家により決定することができる。リガンドを放射性アイソトープで標識する場合には、使用される活性は、インジウム-111の場合には1回用量で1.5~10.0mCiであり、テクネチウム-99の場合に1回用量で10~30mCiであり、ヨウ素-123の場合に1回用量で5~10mCiであり、ヨウ素-124の場合に1回用量で5~10mCiであり、フッ素-18の場合に1回用量で10~20mCiであり、炭素-11の場合に1回用量で20~30mCiである。

## 【0068】

診断薬がヒトCD4を有する粒子を含有する場合には、これを前記のように標識リガンドが特異的に粒子と相互作用し、標識されたヒトCD4を有する粒子を含有する本発明による診断薬が得られるようにin vitroで製造することができる。

## 【0069】

ヒトの生体内でのヒトCD4を有する標識粒子の投与は、CD4を有する細胞と標識リガンドを含有する本発明による診断薬に関して上記したように、種々の方法により行うこ

とができる。

【0070】

本発明による組成物の移動パターンと分布パターンの決定、特に本発明による診断薬の決定は、本発明によるヒトCD4分子に対して特異性を有する標識リガンドの本発明の使用に関して上記したように、自体の適用分野において有利に使用可能である。

【0071】

さらなるアспектにおいて本発明は、疾患の程度と進行を決定する方法に関し、その際、ヒトCD4を有する細胞は、下記の段階を含み臨床的に重要である。

- a) 個体中でヒトCD4を有する細胞の分布パターンおよび/または移動パターンの *in vivo*分析を用意する。
- b) 個体中でヒトCD4を有する細胞の分布パターンおよび/または移動パターンのスタンダードな *in vivo*分析を用意する
- c) 段階a)と段階b)で用意された分析の相違を決定し、これにより疾患の程度と進行を決定する。

10

【0072】

段階a)および/または段階b)で用意された分析は、標識リガンドまたは本発明による診断薬を前記のように個人に投与し、同様に前記のような医学的画像提供法を用いて、個体中でCD4を有する細胞または診断薬の分布パターンおよび/または移動パターンを決定することにより有利に得られる。

【0073】

段階a)で用意された分析は、有利に病気にかかったヒトの個体からのものである。疾患は、有利に前記のような移植後の自己免疫疾患、腫瘍疾患、感染症および反発発症から成る群から選択される。

20

【0074】

段階b)でのスタンダードな分析は、有利に病気にかかっていない個体中でヒトCD4を有する細胞の分布パターンおよび/または移動パターンの分析である。

【0075】

さらに有利な実施態様では、段階b)でのスタンダードな分析は、同じヒトでの前記分析から得られる個体の分布パターンおよび/または移動パターンである。

【0076】

段階a)では、付加的に疾患に対する治療を受けた個人でのヒトCD4を有する細胞の分布パターンおよび/または移動パターンの分析も用意できる。治療の内容は、有利に化合物または医薬品の投与である。治療における個人の応答は、医学的画像提供法を用いて、治療がヒトCD4を有する細胞の分布パターンおよび/または移動パターンを変化させるかどうかを決定することに特徴付けられる。有利には、これらのパターンを、病気の個体のものと、例えば、治療開始前もしくは以前の治療の時点までと比較するか、または病気ではない個体のものと比較する。

30

【0077】

以下に本発明を図と実施例を用いて説明する。

【0078】

図の説明

図1は、マウスとヒトヘルパーT-リンパ球の特異的染色のドット-プロットを示す。ドット-プロットは、次の二重染色を示している：A. マウス細胞：マウスCD3 / マウスCD4 (GK 1.5)；B. ヒトの細胞；ヒトCD3 / ヒトCD4 (最大16H5)；C. マウス細胞：マウスCD3 / ヒトCD4 (最大16H5)；D. ヒトの細胞：ヒトのCD3 / マウスCD4 (CK1.5)。

40

【0079】

図2は、ヒトCD4のコンフォメーションアイソトープの図式を半球体モデルの形で示す。

【0080】

50

## 実施例

### 例 1 : 抗 - ヒト C D 4 の製造と Fab' - フラグメントへの酵素的分離

実施例は、ヒト C D 4 に特異性を有するモノクロナールマウス抗体の製造と精製ならびに Fab' - フラグメントへの酵素的分離を記載する。

#### 【 0 0 8 1 】

モノクロナール抗体 Max.16H5 は、ヒト C D 4 の D 1 ドメイン中のエピトープを認識する。イムノグロブリン ( IgG1 ) は、プロテイン - A - アフィニティークロマトグラフィーにより、ハイブリードマの上澄みから単離した。タンパク質 A カラムの溶出液を中和し、P B S で透析し、かつイムノグロブリン濃度を 1 m g / m l に調節した。モノクロナール抗体の同一性と特異性は、S D S - ゲル電気泳動により、Maus-IgG1 をコントロールとして使用して、ウエスタンブロットでリコンビナントヒト C D 4 を用いて検出した。天然に発現するヒト C D 4 への結合 ( 生物活性 ) は、フローサイトメトリー ( FACS ) により FACScan ( Becton-Dickinson ) を使用して検出した。指標細胞として、ヒト C D 4 発現ヘルパー T リンパ球の ( 個々に種々の ) 割合を含有する凍結貯蔵したヒト末梢単球細胞 ( PBMZ ) を使用した。これは解凍後に抗 - ヒト - C D 4 でインキュベーションし、洗浄し、かつ結合したマウス - IgG を蛍光 ( FITC ) 標識した目的の抗 - マウスイムノグロブリン - Fab2 - フラグメント ( DAKO F 0479 ) を FACScan 中で定量的に測定した。

10

#### 【 0 0 8 2 】

抗 - C D 4 の全ての IgG を、パパインで Fab' - フラグメントと Fc - フラグメントまで消化した。酵素による分離は、予め相応して最善の状態にした反応時間で分解し、反応混合物をカラムクロマトグラフィーによりプロテイン - A を分画した。この場合に、プロテイン - A に結合し、かつ溶出液中に Fab' - フラグメントが現れた。溶出された Fab' - フラグメントのサイズ ( 約 5 0 k D ) と割合 ( 約 9 0 % ) を S D S - ゲル電気泳動により決定した。抗 - ヒト C D 4 - Fab' - フラグメントの生物活性、すなわち、選択的に天然に発現するヒト C D 4 に結合するそれらの能力を、FACS 分析により定量的に測定した。このために、ヒトと PBMZ を相互に Fab' - フラグメントと FITC で標識した目的の抗 - マウス - イムノグロブリンとインキュベーションし、ヒト - C D 4 発現細胞をフローサイトメトリー中で分析した。

20

#### 【 0 0 8 3 】

### 例 2 : 1 1 1 - In を用いる抗 - ヒト C D 4 - Fab' - フラグメントの放射化学的標識

この実施例は、キレート形成剤を用いる抗 - ヒト C D 4 - Fab' - フラグメントの誘導化を説明する。

30

#### 【 0 0 8 4 】

抗 - ヒト C D 4 - Fab' を 0 . 1 M の NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液中で、サイクリックジエチレントリアミン - ペンタ酢酸 ( cDTPA ) と脱水反応により反応させた。次に、この Fab' - DTPA - 誘導体を 0 . 5 M 酢酸ナトリウム緩衝液中で p H 5 . 4 に変え、1 0 k D の濾過フィルターを介して大型交換クロマトグラフィーにより精製した。誘導化したフラグメントの分取を 0 . 5 ~ 1 m g / m l のタンパク質濃度まで調節し、放射化学的に標識されるまで + 4 で貯蔵した。

#### 【 0 0 8 5 】

1 1 1 - インジウム ( 半減期 : 2 . 6 日、約 2 4 7 keV の平均エネルギーガンマ放射 ) を用いる抗 - ヒト C D 4 - Fab' - DTPA - 誘導体の標識により、放射線診断薬を注射の直前に調製した。このために、約 1 0 g の DTPA で誘導化したフラグメントを、3 0 0 C i 1 1 1 - 塩化インジウムと室温で 3 0 分間インキュベーションした。遊離塩化インジウムを、PD - 1 0 - カラムにより、放射線診断薬 ( 1 1 1 - インジウムで標識された抗 - ヒト C D 4 - Fab' - ) から分離した。

40

#### 【 0 0 8 6 】

### 例 3 : 抗 - C D 4 - Fab' - DTPA との結合アッセイ

この実施例は、例 1 からの抗 - C D 4 - Fab' と例 2 からの DTPA で共役した抗 - C D 4 - Fab' - DTPA の特異性と生物活性が相違しないことを証明する。

50

## 【0087】

指標細胞を、徐々に濃度を上げた抗 - ヒト - C D 4 の Fab' - もしくは DTPA で誘導化した Fab' とインキュベーションし、結合しないリガンドをリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) で洗浄した。指標細胞 ( ヒト PBMZ ) に結合したリガンドを蛍光 ( FITC ) で標識した目的の抗 - マウス - イムノグロブリン - Fab2 - フラグメント ( DAKOF0479 ) とインキュベーションし、再び洗浄し、かつヒト C D 4 発現細胞の蛍光を FACS 中で定量的に算出した。

## 【0088】

抗 - C D 4 - Fab' - フラグメント ( ヒト C D 4 の ) の特異性は、DTPA の誘導化により影響しなかった。DTPA で誘導化され、かつ DTPA で誘導化されていない抗 - ヒト C D 4 - Fab' - フラグメントが、同じサイズの蛍光を発するヒト - C D 4 を有する指標細胞のフラクシ 10  
 ヨンと同一であった。両方のリガンドの生物活性は、この場合に比較可能であり、同じ濃度の Fab' もしくは Fab' - DTPA の場合に、蛍光染色の飽和度が達成された。同様に、リガンドの濃度が減少する場合に、蛍光損失が比較可能であった。

## 【0089】

例 4 : 1 1 1 - インジウムで標識された抗 - ヒト - C D 4 - Fab' - フラグメントの生物内分布

この実施例は、高いヒト - C D 4 発現を有する組織内での 1 1 1 - インジウムで標識された抗 - ヒト - C D 4 - Fab - DTPA ( 放射線診断薬 ) の選択的富化を示した。

## 【0090】

放射線診断薬の生物内分布を in vivo で試験するための症状発現前モデルとして、ヒト 20  
 C D 4 のトランスジェニック発現を有するマウスモデルを使用した ( C D 4 / D R 3 - マウス ) 。固有の ( “ 野生型 ” - ) C D 4 の代わりに、C D 4 / D R 3 - マウスモデル中でヒト C D 4 を発現させ、その際、ヒト C D 4 の発現パターンを、レセプターの自然な分布に正しく適応させた ( Laub 2001 ) 。

## 【0091】

C D 4 / D R 3 - マウスと野生型 - マウス ( C57/BL6 ) に放射線診断薬それぞれ 2 0 Ci を静脈内注射した : 注射の 1、4、24 および 48 時間後にリンパ性およびリンパ性ではない器官を取り出し、計量し、かつ組み込まれた放射能をガンマーカウンターで測定した ( LKB model 1282, Wallac-Perkin Elmer, Turku Finland ) 。半減期を校正するために、放射線診断薬の分取を手元に残しておき、同時にプローブを測定した。生物内分布を分析 30  
 するために、放射性シグナル ( Counts ) を、グラム組織ごとの注射活性 ( % ) に換算した。

## 【0092】

C D 4 / D R 3 - マウスでは、リンパ節、脾臓および骨髄において著しく高い活性が測定された。リンパ性ではない器官 ( 肝臓、筋肉、肺および心臓 ) では、1 1 1 - インジウムで標識された抗 - ヒト - C D 4 - Fab' - フラグメント ( Laub 2000 ) の富化は何も行われなかった。腎臓では、放射線診断薬の腎排除を言及するシグナルが見つかった。

## 【0093】

生物内分布の試験は、C D 4 / D R 3 - マウスのリンパ組織内の放射線診断薬の分布が、トランスジェニック発現したヒト C D 4 と、1 1 1 - インジウムで標識された抗 - ヒト 40  
 - C D 4 - Fab' の間での特異的相互作用に基づくことを示した。

## 【0094】

例 5 : ヒト C D 4 発現への特異的富化の依存性

この実施例を用いて、放射線診断薬の特異的シグナルがヒト C D 4 の存在が必要であることが証明される。

## 【0095】

マウス - C D 4 の正常発現を有する Balb/c - マウス ( 野生型 ) では、例 2 からの放射線診断薬の 2 0 Ci を静脈内に注射した。1、4、24 および 48 時間後に、それぞれ 3 つの Balb/c - マウスから、例 4 のようにプローブを取り出し、組み込まれた放射能を測定した。腎臓だけで、全ての時間で高いシグナルが算出され、このことは、放射線診断薬もしくは 50

は放射性核種の腎排除を示している。脾臓、リンパ節、骨髄のようなリンパ性器官が、20%までのマウス - CD4 - 発現細胞を含有するにもかかわらず、ここでは何のシグナルも把握できなかった。結果は、111 - Inで標識された抗 - ヒト - CD4 - Fab'がヒトCD4に特異的に結合し、マウスのリンパ性器官内では非特異的に富化しないことを示している。

**【0096】**

例6：ヒトCD4のトランスジェニック発現を用いるマウスモデルでのヘルパーT - リンパ球のin vivoでの局在化

この例は、放射線診断薬を用いて、ヒトCD4発現細胞の高い割合を有する器官と組織をin vivoで局在化できることを証明する。

10

**【0097】**

放射線診断薬のそれぞれ20Ciを、野生型マウスと、野生型CD4の代わりにヒトCD4を発現させたトランスジェニックCD4 / DR3 - マウスの尾の静脈に注射した。注射の1、24、48時間後に、動物に麻酔をかけ、腹臥位にガンカメラ (Siemens Icon) の計測範囲内に置いた。平均エネルギー線に平面のコリメーターを用いて、光子のシグナルを30分間富化し、平面の全身シンチグラムにまとめた。シンチグラムの使用は、医学的画像提供法用のソフトウェア (Osiris, Universitaetshospital Genf, Schweiz) を用いて行った。

**【0098】**

放射線診断薬を注射した1時間後に、ヒトCD4を有し、野生型マウスにおいて特に強いシグナルが腎臓中で証明された。野生型マウスでは、僅かに分化可能なバックグランドが持続し、かつ腎臓シグナルが全体の測定時間にわたり残り、このことは、他の器官での特異的富化を生じない放射線診断薬の腎臓排除を証明する。ヒトCD4のトランスジェニック発現を有するCD4 / DR3 - マウスでは、注射の4時間後に、腎臓シグナルの他に、脾臓の範囲内でも見つかった。著しいシグナルは、さらに前と後の四肢で測定され、これは骨髄中のヒトCD4発現細胞から生じた (例えば、ヘルパーTリンパ球、好酸顆粒)。バックグランドシグナルは、強く構造化され、かつ造血系とリンパ系のコンパートメントを証明したが、これは明瞭なリンパ節または血管の描写を生じず、このことは、111 - インジウム - シンチグラム (約4mm) の場合には、僅かな溶解を説明した。放射線診断薬を注射した24と48時間後のCD4 / DR3 - マウスのシンチグラムは、腎臓シグナルの著しい減少を示し、これから改善された脾臓の描写が得られた。結果は、ヒト - CD4発現細胞の高い割合を証明している。CD4 / DR3 - マウスのFACS - 分析は、ヒト - CD4を発現するヘルパーTリンパ球の高い割合を、特に脾臓において確認した [Laub 2001, JIM]。

20

30

**【0099】**

分化シグナルは、ヒト - CD4発現細胞を有する器官中で放射線診断薬の選択的富化を証明した。この富化は、特異的である。それというのも、これらはトランスジェニックヒトCD4のない野生型マウス中では目的分子として生じず、かつ特異的相互作用により、ヒトCD4と111 - インジウムで標識された抗 - ヒトCD4 - Fab'フラグメントの間で決定されるからである。

40

**【0100】**

例7：マウスとヒトヘルパーTリンパ球の特異的染色

この実施例により、モノクロナール抗体がヒトもしくはマウスCD4に対して相互に交叉反応しないことが証明される。

**【0101】**

ヒトとマウスの末梢血管をフルオレセインイソチオシアネート (FITC) で標識された、マウスCD4 (Klon GK 1.5; US 6,146,614参照) とヒトCD4 (Klon Max. 16H5) に対するモノクロナール抗体と一緒にインキュベーションした。Tリンパ球を検出するために、この細胞懸濁液を、付加的にフィコエリトリン (PE) で標識された、マウスもしくはヒトCD3に対する抗体と一緒にインキュベーションした。30分間のインキュベーション時

50

間の後に、前記細胞懸濁液を洗浄し、フローサイトメトリー (FACScan, Becton Dickinson) により分析した。

【0102】

マウスの細胞懸濁液中では、CD3 - 陽性またはCD3 - 陰性の細胞が見つかり、Max. 16H5 (Quadranten UR und UL in Blot C) にも結合した。反対に、ヒト細胞では、GK 1.5 (Quadranten UR und UL in Blot D) に結合した細胞は見つからなかった。よって、図1の染色は、GK 1.5がマウスのヘルパーTリンパ球 (Blot A) だけに結合し、かつMax. 16H5がヒトヘルパーTリンパ球 (Blot B) だけに結合することを示している。

【0103】

例8：ヒトCD4 (エピトープマッピング) へのMax. 16H5 (抗 - ヒト - CD4) の結合部位の分析 10

この実施例は、ヒトCD4の細胞外領域へのMax. 16H5 - 結合部位の同定を示す。

【0104】

このために、Auto-Spot Robot (ASP222) 177を用いて、PEG - スプレーで誘導化した膜の点状の面積 (スポット) に、ヒトCD4 - 分子のドメイン1 ~ 4 (D1 ~ D4) の線状アミノ酸配列からペプチドを合成した。スポット中のペプチド配列は、12個のアミノ酸配列の長さであり、それぞれ前記配列の最後のアミノ酸10個 (スキッピング: 12個のうち10個がオーバーラップ) が得られた。

【0105】

これらのを粉乳2%でブロックし、かつ10 µg/mlのMax. 16H5と室温で120分 20  
間インキュベーションした。この後に、膜を洗浄し、過酸化水素で標識した目的の抗 - マウス抗体 (ZAM-POD, Dianova) と室温で75分間インキュベーションした。さらなる洗浄工程の後に、化学発光物質 (Super Single Wes Dura, Pierce) を用いてZAM-PODの検出を行った。膜上の化学発光物質 - シグナルを、蛍光イメージリーダー (Fujifilm LAS-1000) を用いて検出し、かつデジタル化した。

【0106】

スポットしたペプチドへのMax. 16H5の結合は、以下のアミノ酸配列に基づく：

【0107】

【化1】

p34:	GDT	VEL	TCT	ASQ	(SEQ ID NO. 1)	30
p46:	KKS	IQF	HWK	K	(SEQ ID NO. 2)	
p115:	KEE	VQL	LVF		(SEQ ID NO. 3)	
p151:	PSV	QCR	SPR		(SEQ ID NO. 4)	
p223:	FPL	AFT	VEK	LTG	SGE (SEQ ID NO. 5)	
p307:	KLII	QEV	NLV	VMR	(SEQ ID NO. 6)	

【0108】

ポジティブのスポットから、Max. 16H5の結合に使用されたアミノ酸配列をヒトCD4の三次元モデルにより再構築した。この場合に、Max. 16H5は空間的に構築された結合部位 (コンフォメーションエピトープ) と相互作用することが示された。

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1】図1は、マウスとヒトヘルパーT - リンパ球の特異的染色をドット - プロットで示した図である。

【0110】

【図2】図2は、ヒトCD4のコンフォメーションアイソトープを半球体モデルの形で示した図である。

## 【配列表】

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> BIOTECTID GmbH	
<120> Verwendung eines markierten Liganden mit Spezifität für das humane CD4-Molekül zur Herstellung eines Diagnostikums zur Analyse von Wanderungs- und/oder Verteilungsmustern von Zellpopulationen.	
<130> 24222PDE-1_DR	10
<140>	
<141>	
<150> DE 101 60 653.2	
<151> 2001-12-11	
<160> 6	
<170> PatentIn Ver. 2.1	
<210> 1	20
<211> 12	
<212> PRT	
<213> Human	
<400> 1 Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln 1 5 10	
<210> 2	30
<211> 10	
<212> PRT	
<213> Human	
<400> 2 Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Lys 1 5 10	
<210> 3	40
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Human	

<400> 3

Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe  
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg  
1 5

10

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu  
1 5 10 15

20

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

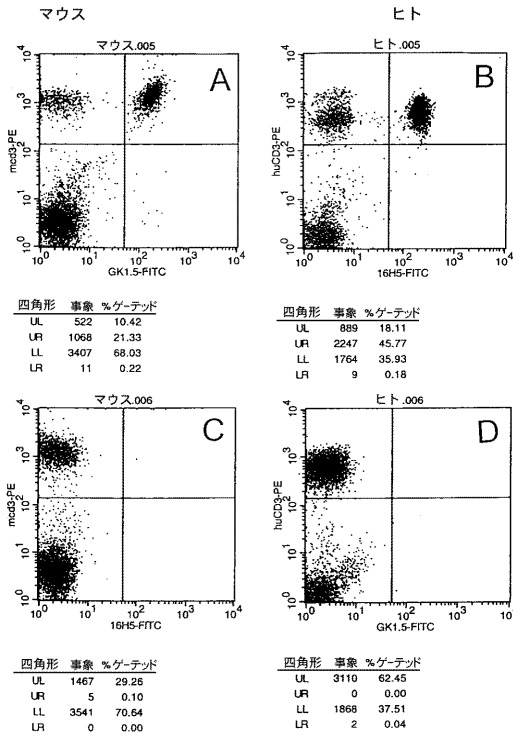
<213> Human

<400> 6

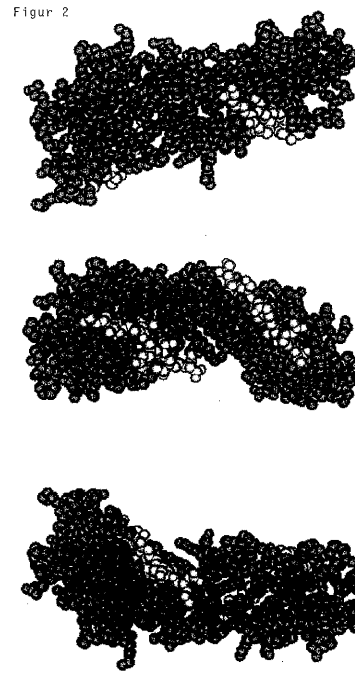
Lys Leu Ile Ile Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg  
1 5 10

30

【 図 1 】



【 図 2 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成16年2月3日(2004.2.3)

【 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 】

ヒトの個体中で、ヒトCD4を有する細胞を含む細胞集団の移動パターンおよび/または分布パターンを分析するための診断薬を製造するための、抗体フラグメントおよび組換え抗体フラグメントから成る群から選択されるヒトCD4分子に特異性を有する標識リガンドの使用。

【 請求項 2 】

抗体フラグメントまたは組換え抗体フラグメントは、モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体フラグメントであるか、またはこれらから由来する、請求項1に記載の使用。

【 請求項 3 】

抗体フラグメントまたは組換え抗体フラグメントは、SEQ ID NO.1からSEQ ID NO.6に記載される配列を認識し、これに結合する、請求項1または2に記載の使用。

【 請求項 4 】

抗体フラグメントまたは組換え抗体フラグメントは、ヒトCD4のコンフォメーションエピトープを認識し、かつこれに結合する請求項1から3までのいずれか1項に記載の使用。

【 請求項 5 】

抗体フラグメントまたは組換え抗体フラグメントは、抗 - C D 4 - 抗体である、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

リガンドの標識は、 $\beta$  - エミッター、ポジトロンエミッター、磁気材料、密度コントラスト材料およびこれらの混合物から成る群から選択される、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7】

リガンドの標識は、 $\beta$  - エミッター、ポジトロンエミッター、磁気材料、密度コントラスト材料およびこれらの混合物から成る群から選択される、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

リガンドの標識は、インジウム - 111、テクネチウム 99m、テクネチウム - 99、ヨウ素 - 132、医学的画像提供法のための他のラジオアイソトープならびにこれらの混合物から成る群から選択される 1 種以上のラジオアイソトープを含む  $\beta$  - エミッターである、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 9】

ラジオアイソトープがテクネチウム 99m またはインジウム - 111 である、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

リガンドの標識は、フッ素 - 18、炭素 - 11、ヨウ素 - 124、医学的画像提供法のための他のアイソトープならびにこれらの混合物から成る群から選択される 1 種以上のアイソトープを含むポジトロンエミッターである、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 11】

リガンドの標識は、ガドリニウム、超常磁性物質、水酸化鉄粒子、医学的画像提供法のための他の材料ならびにこれらの混合物から成る群から選択される磁気材料を含む、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 12】

標識リガンドは、密度コントラスト材料を含む、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 13】

ヒト - C D 4 を有する細胞は、T - リンパ球、B - リンパ球、単球、マクロファージ、樹状細胞およびランゲルハンス細胞および好酸性顆粒から成る群から選択される、請求項 1 から 12 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 14】

リンパ球は、非リンパ性細胞を含むグループまたは集団から選択される、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 15】

細胞集団はヒトの個体から由来する、請求項 1 から 14 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 16】

C D 4 - 分子および C D 4 を有する細胞または粒子に特異性を有する標識リガンドを含む組成物。

【請求項 17】

C D 4 を有する細胞または粒子は、ヒト C D 4 を有する細胞または粒子である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

診断薬としての請求項 16 または 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

個体中の移動パターンおよび / または分布パターンを決定するための診断薬を製造するための、請求項 16 から 18 までのいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 20】

疾患の程度と進行を決定する方法において、ヒト - C D 4 を有する細胞は、臨床的に重要であり、以下の段階を有する：

- a) 個体でのヒト C D 4 を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンの *in vivo* 分析を用意する
- b) 個体でのヒト C D 4 を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンのスタンダードな *in vivo* 分析を用意する
- c) 段階 a) と段階 b) で用意された分析の相違を決定し、これにより疾患の程度と進行を決定する

ことを特徴とする、疾患の程度と進行を決定する方法。

【請求項 2 1】

疾患は、自己免疫疾患、腫瘍疾患、感染症および移植後の反発発症から成る群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

段階 b) でのスタンダードな分析は、健康な個体でのヒト C D 4 を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンの分析である、請求項 2 0 または 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

段階 b) でのスタンダードな分析は、同じヒトの個体の先行する分析から得られた個体の分布パターンおよび / または移動パターンである、請求項 2 0 または 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

段階 a) では、付加的に疾患に対する治療を受けた個体でのヒト C D 4 を有する細胞の分布パターンおよび / または移動パターンの分析を用意する、請求項 2 0 から 2 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

治療の内容は、化合物または医薬品の投与である、請求項 2 4 に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/13939
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/50 G01N33/569 A61K51/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BECKER W ET AL: "IMAGING RHEUMATOID ARTHRITIS SPECIFICALLY WITH TECHNETIUM-99M CD4-SPECIFIC T-HELPER LYMPHOCYTES ANTIBODIES" EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 17, no. 3-4, 1990, pages 156-159, XP008020066 ISSN: 0340-6997 abstract	1-25
X	US 6 146 614 A (BALTIMORE DAVID ET AL) 14 November 2000 (2000-11-14) cited in the application abstract; example 7 column 2, line 27-47	1-25
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *I* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 July 2003		Date of mailing of the international search report 05/08/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vadot-Van Geldre, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/EP 02/13939

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAUB R ET AL: "A multiple transgenic mouse model with a partially humanized activation pathway for helper T cell responses" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 246, no. 1-2, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 37-50, XP004220739 ISSN: 0022-1759 cited in the application abstract page 38, column 2 -page 39 ---	16-18
X	EP 1 118 858 A (PFIZER LTD ;PFIZER (US)) 25 July 2001 (2001-07-25) paragraphs '0232!, '0233!; claims -----	16,17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP02/13939

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

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  

**Although Claims 20-24 relate to a diagnostic method practised on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.**
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 02/13939

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6146614	A	14-11-2000	WO 9800560 A2	08-01-1998
EP 1118858	A	25-07-2001	CA 2328634 A1	12-07-2001
			EP 1118858 A2	25-07-2001
			JP 2001255329 A	21-09-2001
			US 2001039026 A1	08-11-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationale Zeichen PCT/EP 02/13939
<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 G01N33/50 G01N33/569 A61K51/10		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	BECKER W ET AL: "IMAGING RHEUMATOID ARTHRITIS SPECIFICALLY WITH TECHNETIUM-99M CD4-SPECIFIC T-HELPER LYMPHOCYTES ANTIBODIES" EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, Bd. 17, Nr. 3-4, 1990, Seiten 156-159, XP008020066 ISSN: 0340-6997 Zusammenfassung	1-25
X	US 6 146 614 A (BALTIMORE DAVID ET AL) 14. November 2000 (2000-11-14) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Beispiel 7 Spalte 2, Zeile 27-47	1-25
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
28. Juli 2003		05/08/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Vadot-Van Geldre, E

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internat. Pat. Anzeichen  
 PCT/EP 02/13939

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LAUB R ET AL: "A multiple transgenic mouse model with a partially humanized activation pathway for helper T cell responses" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, Bd. 246, Nr. 1-2, 1. Dezember 2000 (2000-12-01), Seiten 37-50, XP004220739 ISSN: 0022-1759 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 38, Spalte 2 -Seite 39 ---	16-18
X	EP 1 118 858 A (PFIZER LTD ;PFIZER (US)) 25. Juli 2001 (2001-07-25) Absätze '0232!', '0233!; Ansprüche -----	16,17

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen  
 PCT/EP 02/13939

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
 Obwohl die Ansprüche 20-24 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

## Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

 Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

 Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen  
PCT/EP 02/13939

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6146614	A	14-11-2000	WO 9800560 A2	08-01-1998
EP 1118858	A	25-07-2001	CA 2328634 A1	12-07-2001
			EP 1118858 A2	25-07-2001
			JP 2001255329 A	21-09-2001
			US 2001039026 A1	08-11-2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/02	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/58	Z
	A 6 1 K 49/02	B
	A 6 1 K 49/02	C

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

(74) 代理人 230100044

弁護士 ラインハルト・アインゼル

(72) 発明者 フランク エムリッヒ

ドイツ連邦共和国 ライプツィヒ ナウンホーファー シュトラーセ 2 2

(72) 発明者 ライムント ヴェー キンネ

ドイツ連邦共和国 イエナ アウグスト - ベーベル - シュトラーセ 1 9

(72) 発明者 リュディガー ラウブ

ドイツ連邦共和国 ライプツィヒ エルンスト - トラー - シュトラーセ 2 0

(72) 発明者 ウルリッヒ ピグラ

ドイツ連邦共和国 ハレ ヨハン - アンドレアス - ゼグナー - シュトラーセ 5 アー

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA15 CA17 CA18 CA19 CA20 CB01 DA36 DA77 FB03

FB07 FB08 FB12

4C085 HH03 KA11 KA26 KA28 KA29 KA40 KB07 KB09 KB18 KB20

KB38 LL01 LL03 LL18

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005512083A5</a>	公开(公告)日	2009-04-09
申请号	JP2003551502	申请日	2002-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	生物科技股份有限公司GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu		
申请(专利权)人(译)	生物科技股份有限公司GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	フランクエムリッヒ ライムントヴェーキンネ リュディガーラウプ ウルリッヒピグラ		
发明人	フランク エムリッヒ ライムント ヴェー キンネ リュディガー ラウプ ウルリッヒ ピグラ		
IPC分类号	G01N33/48 A61K49/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 G01N33/53 G01N33/58 A61K51/00		
CPC分类号	A61K41/13 G01N33/564 G01N33/56972 G01N2333/70514		
FI分类号	G01N33/48.M A61K49/00.Z A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/58.Z A61K49/02.B A61K49/02.C		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA15 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB08 2G045/FB12 4C085/HH03 4C085/KA11 4C085/KA26 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KA40 4C085/KB07 4C085/KB09 4C085/KB18 4C085/KB20 4C085/KB38 4C085/LL01 4C085/LL03 4C085/LL18		
代理人(译)	矢野俊夫		
优先权	10160653 2001-12-11 DE 10232189 2002-07-16 DE		
其他公开文献	JP2005512083A		

#### 摘要(译)

本发明涉及对人CD4分子具有特异性的标记配体在生产诊断剂中的用途，该诊断剂用于分析某些在人类个体中包含CD4的细胞的细胞群的迁移和/或分布模式。另外，本发明涉及包含对CD4分子和带有CD4的细胞或颗粒具有特异性的标记配体的组合物，以及确定其中带有人CD4的细胞具有临床重要性的疾病的程度和进程的方法。