



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : A61K 39/00, 49/00, C12P 21/08 G01N 33/577</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 91/09620</b> (43) Date de publication internationale: 11 juillet 1991 (11.07.91)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00948 (22) Date de dépôt international: 27 décembre 1990 (27.12.90) (30) Données relatives à la priorité: 89/17443 29 décembre 1989 (29.12.89) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BENSUSSAN, Armand [FR/FR]; 16, rue S.-Christophe, F-94000 Creteil (FR). BOUMSELL, Laurence [FR/FR]; 3, rue Arago, F-92800 Puteaux (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: ANTIGENIC sTA PROTEIN PRESENT ON CELLS, CORRESPONDING ANTIBODIES, AND USES THEREOF</p>		
<p>(54) Titre: PROTEINE ANTIGENIQUE sTA PRESENTE SUR DES CELLULES, ANTICORPS CORRESPONDANTS ET LEURS APPLICATIONS</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>An antigenic protein is described, particularly sTA protein or a derivative thereof, namely non-glycosylated sTA protein, sTA protein comprising non-natural glycosylations, or an sTA protein fragment having the essential antigenic sites of glycosylated or non-glycosylated sTA protein; sTA protein being : a 110 + 10 kDa glycoprotein; and expressed on some T cells which carry heterodimer <math>\gamma\delta</math>. Antibodies directed against this protein, diagnostic kits comprising said protein or the antibodies, and a drug comprising the above-mentioned protein or its corresponding antibodies as the active principle, are also described.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>La présente invention concerne une protéine antigénique caractérisée en ce qu'il s'agit de la protéine sTA ou d'un dérivé de cette protéine, à savoir la protéine sTA non glycosylée ou comportant des glycosylations non naturelles ou un fragment de la protéine sTA ayant les sites antigéniques essentiels de la protéine sTA, glucosylé ou non glucosylé, la protéine sTA étant: une glycoprotéine de 110 ± 10 kDa, exprimée sur certaines cellules T portant l'hétérodimère <math>\gamma\delta</math>. Elle concerne également les anticorps dirigés contre cette protéine, les trousse de diagnostic comportant ladite protéine ou les anticorps et un médicament comportant à titre de principe actif la protéine selon l'invention ou les anticorps correspondants.</p>		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

PROTEINE ANTIGENIQUE sTA PRESENTE SUR DES CELLULES,  
ANTICORPS CORRESPONDANTS ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention concerne notamment une protéine antigénique, présente sur des cellules, appelée sTA, ainsi que les anticorps correspondants et leurs applications.

Les cellules qui portent la molécule sTA ont d'abord été  
5 identifiées à un sous groupe des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> portant un type particulier de récepteur antigénique (TcR). Les TcR sont des glycoprotéines hétérodimériques associées de façon non covalente au complexe CD3. La plupart des lymphocytes T du thymus et des tissus lymphoïdes périphériques expriment un TcR de 90 kDa composé de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Mais un  
10 petit pourcentage de thymocytes, cellules spléniques et lymphocytes sanguins périphériques présente une forme de TcR alternative  $\gamma\delta$ , de spécificité mal connue.

Jusqu'à présent les sous-populations de lymphocytes  $\gamma\delta$  ont été définies par des Ac monoclonaux contre des régions variables du TcR ou par  
15 caractérisation biochimique de la forme moléculaire du TcR. Mais on n'a pas rapporté d'Ac caractérisant fonctionnellement un sous-ensemble de cellules TcR $\gamma\delta$  spécialisées.

C'est pourquoi, la présente invention concerne plus particulièrement une protéine appelée sTA.

20 Cette protéine est portée par une fraction de cellules T qui ne répondent pas vigoureusement à une stimulation par CD3. Ces cellules qui portent la molécule sTA se trouvent dans le sang d'individus normaux, mais sont surtout isolées de sang de patients, soit ayant subi une transplantation de moelle osseuse, soit de leucémiques en rémission complète. Cette  
25 molécule sTA a été initialement trouvée sur une population de lymphocytes  $\gamma\delta$ , mais elle existe également sur d'autres cellules à des quantités moindres et donc difficilement détectable par les techniques classiques.

La présente invention concerne plus particulièrement une protéine antigénique caractérisée en ce qu'il s'agit de la protéine sTA ou  
30 d'un dérivé de cette protéine à savoir la protéine sTA non glycosylée ou comportant des glycosylations non naturelles ou un fragment de la protéine sTA ayant les sites antigéniques essentiels de la protéine sTA, glycosylé ou

non glycosylé, la protéine sTA étant :

- une glycoprotéine de  $110 \pm 10$  kDa,
- exprimée sur certaines cellules T portant l'hétérodimère  $\gamma\delta$  .

5 Cette protéine est un Ag d'activation produit par un sous-ensemble de cellules à un stade (jour 4) du cycle de stimulation, ces cellules ayant sans doute une activité cytotoxique, stimulables par IL2.

10 Cette glycoprotéine sTA est caractérisée par un poids moléculaire de  $110 \pm 10$  kDa, déterminé en conditions réductrices. En conditions non réductrices, sa masse apparente déterminée par immunoprécipitation et migration en SDS est de 103 kDa. Elle est différente de la molécule CD26 précédemment décrite, ainsi que de CD30, CD31.

15 sTA peut notamment être obtenu par l'action d'un Ac spécifique sur le surnageant de culture de cellules TCR $\gamma\delta$  . L'invention concerne également les anticorps, notamment les anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine, et particulièrement l'Ac monoclonal spécifique de sTA décrit dans les exemples, obtenu par immunisation de souris BALB/c de 6 semaines par voie I.P. et I.V. (voir matériel et méthodes) par le clone de cellules DS6 et par la technique des hybridomes. Cet Ac est une IgG1.

20 La molécule sTA détectée par l'anticorps monoclonal, lorsqu'elle interagit avec son ligand, transduit un signal d'activation cellulaire. Ce signal agit uniquement en synergie avec l'activation principale induite par le récepteur spécifique des lymphocytes T.

25 L'invention concerne également l'expression de cette protéine par des techniques d'ADN recombinant chez les eucaryotes ou les procaryotes.

Elle concerne également l'obtention de cette protéine par purification à partir de cellules productrices, par des techniques d'immunoprécipitation ou d'autres techniques.

30 L'invention concerne également l'emploi de cette protéine ou des anticorps correspondants à titre de médicament pour le traitement notamment dans des processus tumoraux, éventuellement en coopération avec d'autres produits anticancéreux.

L'invention concerne également l'emploi de la protéine ou de l'Ac correspondant dans un but diagnostic d'états pathologiques.

Elle concerne également l'emploi de ces molécules dans le suivi du traitement d'affection ou comme voyant d'apparition de ces affections.

5 Les exemples ci-après permettront de mieux comprendre les autres avantages et caractéristiques de la présente invention.

Sur les dessins annexés,

- 10 - la figure 1 représente la cinétique d'expression de la molécule sTA sur des clones de cellules T, DS6, L10 et D1, stimulés par PHA et des cellules nourricières ; les études ont été pratiquées par analyse par tri des cellules activées par fluorescence ; DS6 et D1 sont des clones exprimant les TcR $\gamma\delta$  et TcR $\alpha\beta$  liés par liaison disulfure, provenant du sang d'un patient après transplantation de moëlle osseuse ; L10 est un clone exprimant le TcR $\gamma\delta$  lié par liaison disulfure, provenant du sang  
15 d'un individu normal ;
- la figure 2 représente l'analyse SDS-PAGE d'immunoprécipités d'anti-sTA provenant de lysat de cellules DS6 ; le lysat de cellules marquées à l'iode-125 utilisé pour l'immunoprécipitation est un lysat à 1 % de NP40 provenant de cellules DS6 ; les anticorps utilisés pour l'immuno-  
20 précipitation sont des anti-sTA (lignes 1 et 2) et CD26 "TA1" (lignes 3 et 4) ; les immunoprécipités ont été réalisés en conditions réductrices (lignes 1 et 3) ou non réductrices (lignes 2 et 4) sur SDS-PAGE 7,5 % ; des marqueurs Mr( $10^{-3}$ ) sont indiqués sur la gauche du gel.

25

#### MATERIELS ET METHODES

##### Production d'anticorps anti- $\gamma\delta$ 1.

30 Une souris BALB/c ayant 6 semaines est immunisée par voie intrapéritonéale avec  $20 \times 10^6$  cellules du clone cellulaire DS6 T déjà décrit (19). Deux semaines plus tard, une seconde injection intrapéritonéale de  $20 \times 10^6$  cellules est effectuée, et une semaine plus tard  $10 \times 10^6$  cellules sont injectées par voie intrapéritonéale et  $20 \times 10^6$  cellules sont

35

injectées par voie intraveineuse. Quatre jours après la dernière immunisation, les cellules sont collectées à partir de la rate et sont fusionnées avec des cellules de myelome NS-1. Les cultures d'hybridomes sont effectuées en suivant les protocoles connus.

5 Les surnageants d'hybridomes sont testés pour leur réactivité sélective avec les cellules DS6 en utilisant l'immunofluorescence indirecte et une cytométrie de flux.

Le surnageant de l'une des 822 cultures d'hybridomes réagit violemment avec les cellules DS6 et ne marque pas 5 clones de cellules T exprimant TcR $\alpha\beta$ . Cette culture dénommée anti-sTA est clonée deux fois 10 par la technique de dilution en limite. Les hybridomes clonés sont passés à plusieurs reprises par injection intrapéritonéale dans des souris BALB/c (primées avec du pristane). Les ascites sont collectées, ultracentrifugées et purifiées par affinité sur une colonne de protéine A sepharose. L'anticorps 15 est un IgG1.

#### Isolement de population cellulaire

Des cellules mononuclées de sang périphérique humain (PBMC) sont préparées par centrifugation en gradient de densité Ficoll-Isopaque. La population non fractionnée est séparée entre populations négative au test 20 rosette ( $E^-$ ) et positive au test de rosette ( $E^+$ ), ceci par test de rosette sur des erythrocytes de mouton à 5 %. Le mélange de test est étalé sur Ficoll-Isopaque et les populations  $E^-$  et  $E^+$  sont séparées par centrifugation. Les cellules  $E^-$  sont récupérées à partir de l'interface, tandis que les cellules  $E^+$  sont obtenues sous forme de culot après lyse hypotonique des 25 erythrocytes de mouton. Les cellules du sang périphérique CD3/TcR $\alpha\beta$  sont obtenues par sélection en utilisant l'immunofluorescence directe et le microfluoromètre Facstar (Becton Dickinson Mountain View, CA). Les monocytes sont obtenus à partir des cellules  $E^-$  par adhérence sur du verre une nuit. Les lymphocytes granulaires de grande taille sont obtenus par 30 gradient percoll. Environ  $10^8$  PBMC sont étalés sur un percoll 7-étapes (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). Le gradient discontinu

contenant des couches de 1,5 ml donne 42,5, 45,0, 47,5, 50,0, 52,5, 55,0 et 66,7 % de Percoll ajusté à 285 mOsm/kg H<sub>2</sub>O avec 10 x PBS, pH 7,3, avant utilisation. L'analyse FACS montre que les fractions correspondantes au LGL ne réagissent pas avec des anticorps monoclonaux OKT3 mAb. Les cellules thymiques sont isolées selon la procédure standard (Gelin C. et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:4912). Les lignées cellulaires leucémiques et les lignées de cellules B transformés par EBV sont exempts de mycoplasme et maintenus en croissance logarithmique dans un milieu RPMI-1640 contenant 15 % de sérum de veau foetal et des antibiotiques. Des échantillons de sang cryoconservés provenant de patients ayant une leucémie lymphocytaire aigüe et une leucémie myelocytaire aigüe, ainsi que des échantillons de moelle osseuse cryoconservée provenant de donneurs volontaires sains, ont été fournis par la banque du sang de l'Hôpital Saint Louis.

15 Clones de cellules T humaines.

Les cellules T clonées sont obtenues à partir du sang de patients présentant un immunodéficit prolongé après une transplantation de moelle osseuse allogénique (Vilmer E. et al., 1988, J. Clin. Invest. 82:755), ou de patients présentant une leucémie lymphoblastique aigue non-T, non-B en complète rémission (Bensussan A. et al., Blood (sous presse)). En plus, les clones TcR $\gamma\delta$  sont également dérivés à partir du sang d'individus normaux et sont obtenus en suivant le procédé déjà décrit précédemment (David V. et al. Scand. J. Immunol. 27:473). Des clones de cellules T portant TcR $\alpha\beta$  et TcR $\gamma\delta$  sont isolées de chaque individu. Les cellules T clonées sont obtenues par la technique de dilution limite dans laquelle les PBMC sont étalées à une concentration de 0,3 cellule par puits dans une plaque à 96 puits ayant un fond en V (Greiner, Nürtingen, FRG). Les plaques sont tout d'abord alimentées avec des couches nourricières contenant du matériau autologue irradié ( $6 \times 10^4$  cellules par puits) dans un milieu complet contenant 25 U/ml de rIL2 (Roussel Uclaf, Romainville, France) et 1  $\mu$ g/ml de PHA (Wellcome, Beckenham, UK). Le milieu de culture utilisé est RPMI 1640 (GIBCO,

Paisley, Scotland) auquel on a ajouté 10 % de sérum AB humain inactivé par la chaleur, avec 2 mmol/l de L-glutamine et de la pénicilline (100 U/ml) streptomycine (100 µg/ml). Après 72 heures, le milieu de culture est remplacé et les clones sont soumis à un milieu contenant rIL2 et les cellules en croissance sont expansées comme cela était décrit précédemment (David V. et al., 1987, J. Immunol. 138:2831). Le sous-clonage est effectué dans les mêmes conditions de culture à 0,3 cellules par puits. Les cellules reclonées sont restimulées chaque 12 jours en présence de couches nourricières dans une plaque à 96 puits présentant un fond en V ( $5 \times 10^4$  cellules clonées sont étalées avec  $5 \times 10^4$  PBMC irradié dans chaque puits).

#### Analyse phénotypique des antigènes de surfaces cellulaires

L'analyse phénotypique est effectuée par immunofluorescence indirecte avec un  $F(ab')_2$ IgG de chèvre anti-souris conjugué avec la fluorescéine. Des échantillons sont analysés sur un cytofluorographe (Facstar, Becton-Dickinson, Mountain View, CA).  $10^4$  cellules sont analysées dans chaque échantillon. Les ascites dérivées d'un hybridome non réactif sont utilisées comme témoin négatif pour déterminer la fluorescence correspondant à un bruit de fond. Les anticorps monoclonaux WT31 et BMA031, qui réagissent avec les déterminants partagés sur les molécules humaines constantes  $Ti\alpha\beta$  ont été respectivement fournis par le Docteur J.E. de Vries (Unicet Laboratories, Dardilly, France) et le Docteur A. Musitelli (Behring, Rueil, France). L'anticorps monoclonal anti-TCR $\zeta$  1 est réactif avec un épitope constant de la chaîne TcR $\zeta$  (les ascites ont été communiquées par le Dr. M. Brenner, DFCI, Boston MA). L'anticorps monoclonal BB3 qui détecte V $\zeta$  2 était communiqué par le Dr. A. Moretta (INRC, Gêne, Italie et TCS1 qui réagit avec V $\zeta$  1 a été acheté chez T Cell Science, Cambridge, Ma. CD4, CD8 et CD3 ont été produits dans notre laboratoire.

#### Etudes biochimiques

Les protéines de surface cellulaire ont été marquées par iodination catalysée à la lactoperoxydase comme cela a été décrit par



Hubbard A.L. et Cohn Z.A., 1976 In Biochemical analysis of membranes. A.H. Maddy, ed. Chapman & Hall, London, p. 427. Les cellules sont alors lysées ( $2 \times 10^7$ /ml) par maintien pendant 15-30 mn à 0°C dans un tampon de lyse (10mM Tris-HCl, pH 7,4, contenant 1 % (poids/volume) Nonidet P40, 0,15 M NaCl, 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA) et 2 mM de fluorure de phényl-méthylsulphonyle, 20mM d'iodoacétamide et de l'aprotinine 1 unité internationale (Sigma) comme inhibiteur de protéase). Les noyaux sont éliminés par centrifugation pendant 10 mn à 2000 g et le surnageant est centrifugé pendant 30 mn à 100 000 g 4°C. Après centrifugation, les lysats sont dialysés à 4°C pendant une nuit pour éliminer le matériel radioactif dialysable. Les lysats cellulaires sont préclarifiés de façon très importante avec des billes de protéines A sepharose 4B liées à CD18. Des aliquots des lysats préclarifiés sont absorbés séquentiellement soit par anti-sTA ou anti-Tal (les ascites ayant été communiquées par Dr. E. Reinherz DFCl, Boston, MA) ces anticorps étant réticulés sur de la protéine A-sepharose (5 à 10 mg d'anticorps purifiés par ml de gel) en utilisant le diméthylpimelimidate -HCl comme cela est décrit (Schneider C. et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:766). Les aliquots de lysats spécifiquement appauvris sont alors immunoprécipités soit par des anti-Tal soit par des anti-sTA. Les précipités immuns sont lavés, élués en conditions réductrice et non réductrice et analysés sur 7,5 % SDS-PAGE. L'autoradiographie des plaques de gel séchées est effectuée à -70°C. Les poids moléculaires sont calculés par référence à la mobilité de protéines standards.

#### Essais de calcium ionisé intracellulaire

La procédure utilisée pour la mesure de  $[Ca^{2+}]_i$  dans des cellules uniques a été décrit par Rabinovitch P.S. et al., 1986, J. Immunol. 137:952).

#### Exemple 1

#### Spécificité des anticorps monoclonaux anti-sTA

De façon à obtenir des anticorps monoclonaux contre les structures de surface TcRYs des cellules, on immunise des souris avec des cellules portant les structures TcRYs comme cela était décrit précédemment,

puis on compare les surnageants des différents hybridomes par capacité à se lier avec les cellules ayant servi à l'immunisation et à ne pas se lier avec des clones de cellules T autologue exprimant l'hétérodimérique  $\alpha\beta$ TcR. L'anticorps correspondant est nommé anti-sTA et purifié à partir des fluides d'ascites pour des expériences complémentaires.

Le tableau I rassemble les résultats observés avec les anti-sTA purifiés et montre qu'ils reconnaissent une structure exprimée par la majorité des clones TcR $\gamma\delta$ .

Parmi les cellules clonées exprimant TcR $\alpha\beta$ , seuls 3 des 18 clones CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, et un des deux clones CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> sont marqués par l'anti-sTA.

En tout état de cause, aucun des 20 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ne réagit avec l'anticorps et en accord avec ces dernières observations, les lymphocytes de sang périphérique de différents individus, y compris les donneurs des clones de cellules TsTA<sup>+</sup> stimulés avec la PHA aussi bien que les cellules PB non T stimulées avec PWM sont trouvés comme n'étant pas réactifs avec les anti-sTA à différents stades après la stimulation. L'analyse de l'expression de sTA par des clones NK CD3<sup>-</sup> montre que l'un des 5 clones est réactif avec l'anti-sTA.

L'absence de la réactivité anti-sTA sur des cellules de sang périphérique au repos, grands lymphocytes granuleux, les thymocytes, les cellules de rate et les cellules de moelle osseuse, les cellules de lignées de cellules B et les populations tumorales, affirme que l'anti-sTA définit une structure exprimée sur des cellules d'une population très restreinte. En outre, des cellules TcR $\gamma\delta$  au repos ne se marquent pas avec des anti-sTA, ce qui confirme que cet anticorps monoclonal est uniquement réactif avec une sous-population de cellules activées. En outre, il est intéressant de noter qu'aucune des 7 lignes tumorales, incluant la lignée cellulaire Peer, exprimant le TcR $\gamma\delta$  ne montre de réactivité avec l'anti-sTA. Ainsi, la croissance continue des cellules in vitro n'induit pas l'expression sTA.

30

35

### Exemple 2

#### Cinétique d'expression de sTA pendant le cycle de stimulation des clones de cellules T.

L'anti-sTA ne marque pas les cellules TcR $\gamma\delta$  qui viennent d'être  
5 isolées du sang périphérique, mais apparaît après un un temps d'activation assez long dans les populations de cellules clonées.

La figure 1 montre l'expression de sTA sur trois clones de  
cellules T représentatives à différents intervalles après leur stimulation  
avec la PHA.

10 L'intensité de la réaction anti-sTA sur les clones sTA positifs est maximale 4 jours après la stimulation et décroît de façon significative au jour 10 ou 12.

Le niveau de l'expression sTA varie suivant les clones mais est  
indépendant de la nature du stimulus appliqué puisque les résultats sont  
15 obtenus de la même façon lorsque l'on utilise d'autres modes de stimulation.

### Exemple 3

#### Caractérisation biochimique des clones cellulaires T DS6 portant sTA.

De façon à caractériser la structure moléculaire reconnue par  
20 l'anticorps anti-sTA des cellules DS6 sont marquées en surface avec de l'iode 125 et la lactoperoxydase.

Comme cela est indiqué dans la figure 2, les anticorps  
monoclonaux anti-sTA immunoprécipitent une bande unique ayant une  
masse moléculaire apparente de 103 kDa en condition non réductrice (ligne  
25 2). Cette bande n'est pas présente dans l'immunoprécipité de contrôle.

En condition réductrice, la bande se déplace et apparaît à un  
poids moléculaire de 110 kDa (ligne 1). Compte tenu du fait que sTA est  
présent sur certaines cellules activées, il est important de comparer cette  
molécule à des structures déjà décrites de 103-105 kDa ayant une  
30 distribution moléculaire analogue et dénommée molécule CD26 et qui sont reconnues par l'anticorps monoclonal Ta1. Les essais effectués montrent que la molécule CD26 et sTA sont des molécules différentes.

Tableau I  
Réactivité d'anti-sTA avec des cellules humaines hématopoïétiques variées

Cellules testées	Nombre de positives (*) / nombre de testées
A. Clones de cellules dépendantes de rIL2 CD3/TcR $\gamma\delta$ +, CD4- et CD8- CD3/TcR $\gamma\delta$ +, CD4- et CD8+ CD3/TcR $\alpha\beta$ +, CD4+ et CD8- CD3/TcR $\alpha\beta$ +, CD4- et CD8+ CD3/TcR $\alpha\beta$ +, CD4- et CD8- CD3/TcR-	16/27 4/6 0/20 3/18 1/2 1/5
B. Populations de cellules hématopoïétiques normales cellules du sang périphérique E+, cellules de sang périphérique E-, grands lymphocytes granuleux, cellules de sang périphérique CD3/TcR $\gamma\delta$ +, monocytes, thymocytes, cellules spléniques et cellules de moëlle osseuse	0/5
C. Lignées de cellules leucémiques Rex, Jurkat, CEM, K562, Peer, U937 et HL60	0/7
D. Cellules malignes leucémie aiguë lymphocytaire (T, B ou non-T, non-B) leucémie aiguë myélocytaire	0/4
E. Lignée de cellules B lignée de cellules B transformées par le virus EB	0/10

(\*) Réactivité de différentes populations cellulaires analysée par cytométrie de flux : + = 50% et - = 10%

REVENDICATION

- 1) Protéine antigénique caractérisée en ce qu'il s'agit de la protéine sTA ou d'un dérivé de cette protéine, à savoir la protéine sTA non glycosylée ou comportant des glycosylations non naturelles ou un fragment de la protéine sTA ayant les sites antigéniques essentiels de la protéine sTA, glycosylé ou non glycosylé, la protéine sTA étant :
- une glycoprotéine de  $110 \pm 10$  kDa,
  - exprimée sur certaines cellules T portant l'hétérodimère  $\gamma\delta$ .
- 2) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte un marquage permettant son dosage in vitro ou sa localisation in vivo ou ex vivo.
- 3) Anticorps dirigé contre une protéine antigénique selon l'une des revendications 1 et 2.
- 4) Anticorps selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comporte un marquage permettant son dosage in vitro ou sa localisation in vivo ou ex vivo.
- 5) Trousse de diagnostic comportant une protéine ou un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4.
- 6) Médicament comportant à titre de principe actif une protéine ou un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4.

25

30

35

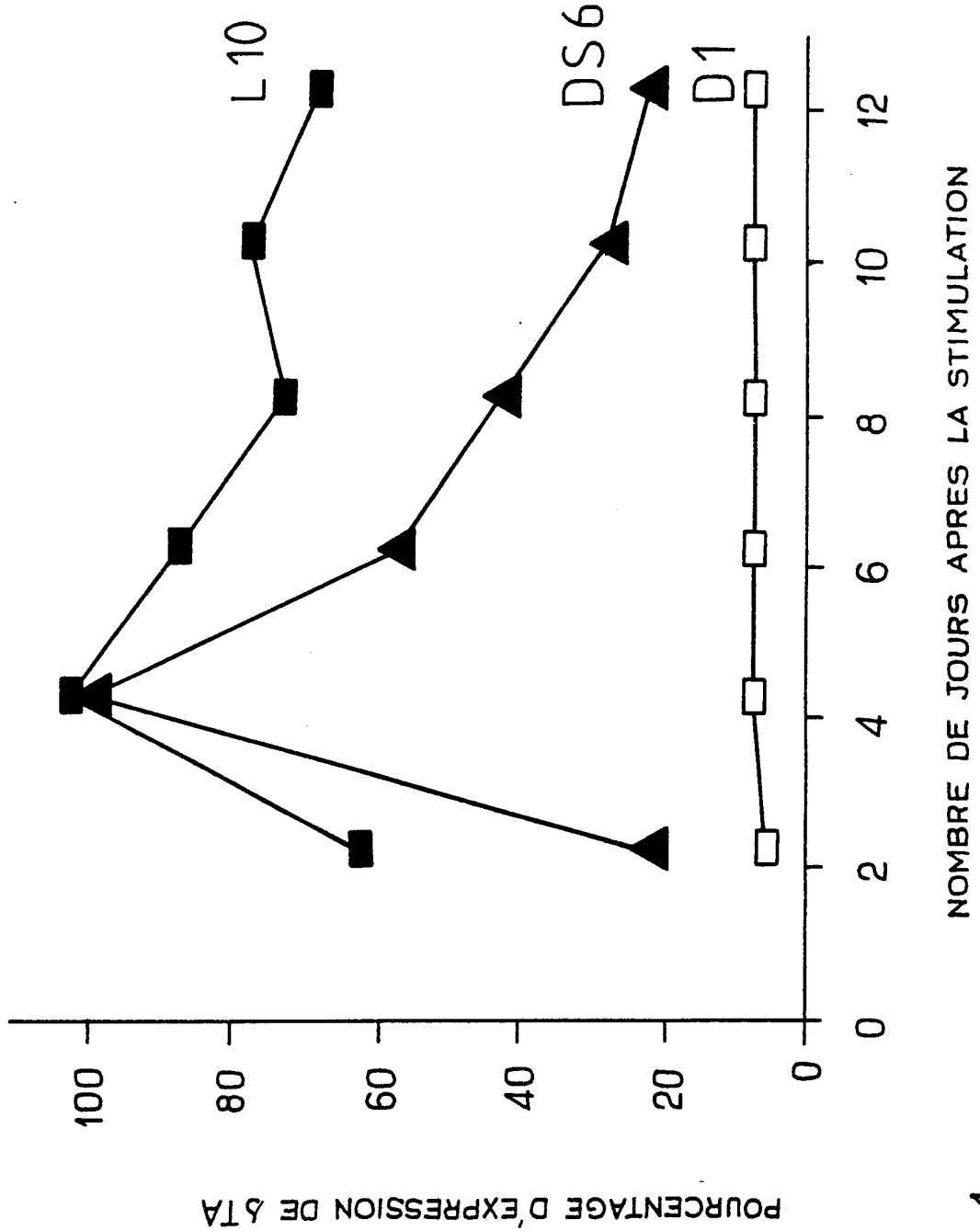


FIG.1

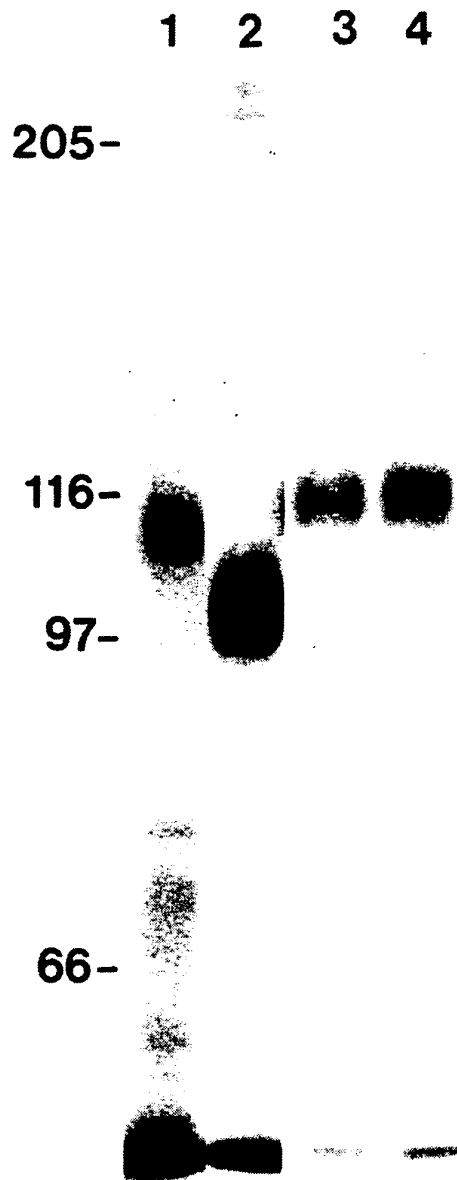


FIG. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 90/00948

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl. <sup>5</sup> A 61 K 39/00, A 61 K 49/00, C 12 P 21/08, G 01 N 33/577				
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>				
Classification System	Classification Symbols			
Int. Cl. <sup>5</sup>	C 12 P			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>				
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>				
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>		
Y	WO, A, 88/00209 (T CELL SCIENCES, INC.) 14 January 1988 see page 17, line 1 - page 28, line 10	1-6		
Y	FR, A, 2621127 (INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 31 March 1989 see page 3, line 3 - page 13, line 9	1-6		
-----				
<p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>			
<b>IV. CERTIFICATION</b>				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
26 April 1991 (26.04.91)	3 June 1991 (03.06.91)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			
EUROPEAN PATENT OFFICE				



**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000948  
SA 43575

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 28/05/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8800209	14-01-88	AU-A- 7709587	29-01-88
		EP-A- 0312542	26-04-89
		JP-T- 2500322	08-02-90
FR-A- 2621127	31-03-89	AU-A- 2526788	18-04-89
		EP-A- 0393062	24-10-90
		WO-A- 8902899	06-04-89

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00948

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB <sup>5</sup> : A 61 K 39/00, A 61 K 49/00, C 12 P 21/08, G 01 N 33/577		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>5</sup>	C 12 P	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
Y	WO, A, 88/00209 (T CELL SCIENCES, INC.) 14 janvier 1988 voir page 17, ligne 1 - page 28, ligne 10  --	1-6
Y	FR, A, 2621127 (INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 31 mars 1989 voir page 3, ligne 3 - page 13, ligne 9  -----	1-6
<p>* Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
26 avril 1991	3. Oct. 91	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	M. PEIS <span style="font-size: 1.5em; font-family: cursive;">M. Peis</span>	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000948  
SA 43575

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28/05/91  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 8800209	14-01-88	AU-A- 7709587	29-01-88
		EP-A- 0312542	26-04-89
		JP-T- 2500322	08-02-90
FR-A- 2621127	31-03-89	AU-A- 2526788	18-04-89
		EP-A- 0393062	24-10-90
		WO-A- 8902899	06-04-89

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82