

(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2013-532274

(P2013-532274A)

(43) 公表日 平成25年8月15日(2013.8.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/245	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-508372 (P2013-508372)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月4日(2011.5.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月13日(2012.12.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2011/000041
 (87) 国際公開番号 W02011/137902
 (87) 国際公開日 平成23年11月10日(2011.11.10)
 (31) 優先権主張番号 10161843.7
 (32) 優先日 平成22年5月4日(2010.5.4)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71) 出願人 509062952
 ヴィドローヴェ・ホスピタル
 デンマーク・DK-2650・ヴィドロー
 ヴェ・ケッテガーズ・アレー・30
 (74) 代理人 100113376
 弁理士 南条 雅裕
 (74) 代理人 100179394
 弁理士 瀬田 あや子
 (74) 代理人 100156443
 弁理士 松崎 隆
 (74) 代理人 100168491
 弁理士 武井 紀英

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高温で増大される *in vitro* 免疫認識

(57) 【要約】

本発明は、高温状態でインキュベーションすることによって試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法に関し、より詳細には、高温状態でのインキュベーション、ならびに任意選択でIL-7の添加および/またはIL-10の遮断によって、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法に関する。さらにより詳細には、本発明は、全血または他の適切な生体試料を使用して抗原に対する細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法を提供する。この方法は、多くの感染性疾患を免疫診断するため、免疫応答性のマーカーとして、ならびに非自己抗原(すなわち感染およびワクチン)に対するT細胞応答を検出するために有用である。

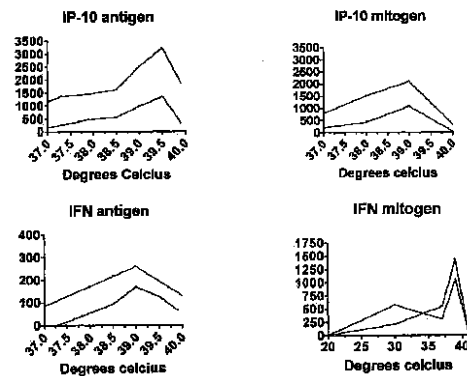


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 哺乳動物由来の、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む試料を提供するステップと、

b) 前記試料を、高温状態で、少なくとも 1 つの試験抗原と共にインキュベーションするステップと、

c) 前記試料における試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を決定するステップと、を含み、前記高温状態でのインキュベーションが、摂氏 37 の通常の熱条件下でのインキュベーションによって得られる参照レベルと比較した場合に、試験抗原に特異的な免疫応答の増大を生じさせる、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法。

10

【請求項 2】

前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答が、少なくとも 1 つの免疫シグナル伝達分子のレベルを測定することによって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫シグナル伝達分子がサイトカインまたはケモカインである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫シグナル伝達分子のレベルが、mRNA および / またはタンパク質のレベルを測定することによって決定される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫シグナル伝達分子のレベルの前記決定を、qPCR、RT-PCR、qRT-PCR、ELISA、ELISPOT、Luminex、Multiplex、免疫プロットティング、免疫クロマトグラフィー側方流動アッセイ、酵素増幅免疫アッセイ技法、RAST 試験、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光および様々な免疫学的ドライスティックアッセイからなる群から選択される方法を使用して行う、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記免疫シグナル伝達分子が、IP-10、INF-、IL-2、MIG、TNF-、MIP-1a、MCP-1、MCP-2、MCP-3、IL-1b、IL-RA、sIL-2R、および IL-12 からなる群から選択される、請求項 2 から 5 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 7】

前記免疫シグナル伝達分子が IP-10 である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫シグナル伝達分子が IFN- である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

サイトカイン IL-7、IL-15、IL-21；IL-10、IL-4、IL-5 と結合する中和抗体、抗 CD25 抗体でコーティングしたビーズ、抗 CD39 抗体でコーティングしたビーズ、IL-10、JAK1 または TYK2 をコードしている遺伝物質に対するセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、CpG 含有オリゴヌクレオチド、TLR 変調剤として作用するオリゴヌクレオチド、および TLR 変調剤からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫変調剤を、ステップ b で加える、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの試験抗原が、ESAT-6、CFP-10、TB7.7、ならびに他の RD-1 および RD-11 抗原を含む群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記試料が、全血、または血液、胸膜液、気管支液、組織生検、腹水、および / もしくは脳脊髄液に由来する細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試料が、末梢単核細胞、T細胞、CD4 T細胞、CD8 T細胞、ガンマ・デルタ T細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞および NK細胞からなる群から選択される細

50

胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記高温状態が、摂氏 38.5 ~ 41.0 の温度でのインキュベーションである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記高温状態が、摂氏 39 ~ 40 の温度でのインキュベーションである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

炭化水素および/またはグリカンの形態の糖をステップ b で加える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記方法が前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の改善されたシグナル対ノイズ比を生じる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を使用して、前記試験抗原を発現することができる微生物によって引き起こされる感染症を診断する、請求項 1 から 1 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8】

前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を使用してワクチン接種の応答を検出する、請求項 1 から 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 9】

前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を使用して、癌または新生物または悪性腫瘍を検出する、請求項 1 から 1 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 0】

前記微生物が、マイコバクテリア属 (*Mycobacteria*)、リーシュマニア属 (*Leishmania*)、クラミジア属 (*Chlamydia*) およびサイトメガロウイルスからなる群から選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記マイコバクテリア属が結核菌 (*M. tuberculosis*) 複合生物 (結核菌 (*M. tuberculosis*)、ウシ結核菌 (*M. bovis*) およびエム・アフリカヌム (*M. africanum*))、および相違領域 (region of difference) (RD1) が欠失していないマイコバクテリア属 (カンサシ菌 (*M. kansasii*)、エム・ツルガイ (*M. szulgai*)、エム・マリヌム (*M. marinum*)、エム・フラベセンス (*M. flavescens*)、エム・ガストリイ (*M. gastrii*)) またはヒトに病原性のあるマイコバクテリア属 (トリ結核菌 (*M. avium*)、らい菌 (*M. lepra*) もしくは他の非結核性マイコバクテリア) に属している、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記マイコバクテリア属が結核菌 (*M. tuberculosis*) である、請求項 2 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高温 (hyperthermic) 状態でインキュベーションすることによって試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる一般方法に関し、より詳細には、高温状態でのインキュベーション、ならびに任意選択で IL-7 の添加および/または IL-10 の遮断によって、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法に関する。さらにより詳細には、本発明は、全血または他の適切な生体試料を使用して抗原に対する細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法を提供する。本方法は、ヒト、家畜および獣医学、ならびに野生生物に適用するための、治療および診断プロトコルにおいて有用である

10

20

30

40

50

。

【0002】

細胞媒介性免疫応答の測定は、多くの感染性疾患を免疫診断するため、免疫応答性 (immunocompetent) のマーカーとして、ならびに非自己抗原 (すなわち感染およびワクチン) に対するT細胞応答を検出するために重要である。

【0003】

本発明は、免疫応答を誘発することができる免疫系の細胞を含む哺乳動物由来の試料を、少なくとも1つの抗原の存在下で、高温状態でインキュベーションすることによって、哺乳動物において試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせるおよび/またはそれを評価する方法を提供する。この方法は、IL-7および/またはIL-10と結合する抗体などの少なくとも1つの免疫変調剤を加えることを含む、補足ステップを含み得る。その後、IP-10および/またはIFN- γ などの少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子の産生を検出する。したがって、免疫シグナル伝達分子の存在またはレベルは、対象の細胞媒介性免疫応答性のレベルの指標である。

10

【背景技術】

【0004】

高温インキュベーション

一般に、免疫学的方法における発熱様の温度 (fever like temperatures) の有用性は、かなりの議論の余地がある。

【0005】

免疫診断方法における示差的インキュベーション温度の効果に関するいくつかの研究が発表されており、これらは、畜牛からの全血をマイトジェンと共にインキュベーションした際に、37.5 $^{\circ}$ CでのIFN- γ 産生がより低い温度 (約21 $^{\circ}$ C) と比較して減少することを報告している (Watersら、2007、Robbe-Austermaierら、2006)。それにもかかわらず、インターフェロン (IFN) - γ 放出アッセイ (IGRA) の製造者は37 $^{\circ}$ Cのインキュベーション温度を推奨しており (www.celltestis.com)、これはかなり良好なIFN- γ 応答を与えると見られるが、本発明者らが知る限り、このインキュベーション温度の選択を支持するデータは発表されていない。

20

【0006】

温度を上昇させることがin vitroで免疫系の細胞にどのように影響を与えるかに関する研究は、現在確証的でない。免疫系の細胞を高温でインキュベーションした研究からの結果は、摂氏40~41 $^{\circ}$ Cまでの温度が免疫応答性を増大させるかどうかについて相反している。

30

【0007】

一部の研究は、高温インキュベーションでの免疫機能の改善を示している。Basuraによる研究は、OVA特異的SIINFELペプチドで負荷を与えた精製および「熱ショックを与えた」(摂氏41 $^{\circ}$ Cで6時間のインキュベーション) マウス樹状細胞 (DC) を使用し、SIINFELペプチドに特異的なT細胞系との相互作用に関する「熱ショックを与えた」DCと正常なDCとの効果を比較する。この研究では、「熱ショックを与えた」DCは、IFN- γ の産生を正常なDCと比較して3倍まで増大させることができたことが実証された (Basura、2003)。

40

【0008】

別の研究では、ヒトPBMCを摂氏40 $^{\circ}$ Cまたは41 $^{\circ}$ Cに6時間曝し、次いで37 $^{\circ}$ Cでマイトジェンまたは破傷風 (tetanous) トキソイドを用いた刺激に曝した場合に、IFN- γ を産生するT細胞の数が増加され、増殖性応答が増加されたことが実証された。モノクローナル抗体をMHCクラスIIに加えることで効果が完全に抑止された (Huangら、1996)。同様の効果がPPDを用いた刺激で実証されている (Kappelerら、1991)。高温が、抗原提示細胞に関する、MHCクラスIIおよびB7ファミリーメンバーCD80/86などの共刺激分子の上方制御を介した効果を媒介すると考

50

えられる。

【0009】

しかし、これらの研究はどれも、より高い温度、すなわち高温状態でのインキュベーションが、疾患に特異的な抗原認識に対する効果を有することを示していない。

【0010】

最も近い従来技術は、疾患に特異的な抗原認識を研究する、Schillerら、2009による研究である。この研究では、結核菌(M. tuberculosis)に感染した畜牛からの全血を摂氏25、29、33および39の様々な温度でインキュベーションし、結核菌特異的抗原ESAT6およびCFP10に対するIFN- γ の応答を研究した。しかし、著者らは摂氏33~39でIFN- γ の応答性に差異を観察していない。(試料は37では測定しなかった。)(Schillerら、2009)。このことは、高温状態でのインキュベーションが試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答をどのように増大させるかを実証する、本発明の教示と相反する。

10

【0011】

IL-7および抗IL-10

試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答をさらに改善させることが望ましい。これは、インキュベーションステップ中に免疫変調剤を加えることによって行うことができる。本発明者らは、本発明において、IL-7および/またはIL-10と結合する中和抗体を加えることによってこの改善を例示した。

【0012】

Feskeらは、IL-7をTB患者からのESAT6/CFP10で刺激した血液に加えることの効果を研究しており、IFN- γ の産生の増加を実証した(Feskeら、2008)。しかし、高温とIL-7の組合せによってバイオマーカーの応答を改善させることが可能であることは、まったく試験または示唆されていない。

20

【0013】

Denisらは、ESAT6/CFP10の存在下でウシ血液を培養中に、IL-10に対するモノクローナル抗体を加えることで、IFN- γ の応答およびこのTB試験の感度が改善されることを実証した[Denisら、2007]。高温とIL-10の遮断の組合せによってバイオマーカーの応答を改善させることは新規であり、提案または試験されていない。

30

【0014】

結核

結核菌(mycobacterium tuberculosis, MTB)に特異的な免疫優性抗原の発見は、結核(TB)を診断するための顕著な新しい手段を導いている。初期の研究により、定義されたMTB抗原に応答したT細胞によるインターフェロンガンマ(IFN- γ)のin vitro産生をアッセイした試験が、ツベルクリン皮膚試験(TST)を置き換える潜在性を有することが示された。ほぼ同時期、大きな進歩として、特異性を顕著に改善させた免疫原性の高い抗原である、初期分泌性抗原性標的6(ESAT-6)、培養濾液タンパク質10(CFP-10)およびTB7.7の発見があった。これらの抗原は、病原体の相違領域(region of difference)1(RD1)およびRD11内にコードされており、したがって、すべてのカルメットゲラン桿菌(BCG)ワクチン株ならびにほとんどの非結核性マイコバクテリア中に不在である(例外にはカンサシ菌(Mycobacterium kansasii)、マイコバクテリウム・マリヌム(Mycobacterium marinum)、およびマイコバクテリウム・ツルガイ(Mycobacterium szulgaiが含まれる)。RD1およびRD11の重複ペプチドにコードされている抗原ESAT-6、CFP-10、TB7.7に対するIFN- γ の応答が、2つの認可かつ市販されている試験におけるMTB感染症の検出の基礎を形成する。

40

【0015】

QuantIFERON-TB Gold(Cellestis Limited、才

50

ー ストラリア、ビクトリア州 Carnegie) および全血の酵素結合免疫測定法 (ELISA) は、潜伏性 TB 感染症および疾患をどちらも検出するための、欧州 CE 認証 (European CE mark) および米国食品薬品局 (FDA) の承認を有する。

【 0016 】

末梢血単核球を使用する酵素結合免疫スポットアッセイ (ELISPOT) である T - SPOT . TB (Oxford Immunotec、英国 Oxford) は欧州 CE 認証を有しており、2005年にカナダ内での使用が承認された。T - SPOT . TB は ESAT - 6 および CFP10 のみを使用する。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

10

【 0017 】

残念ながら、これらの試験の感度は、免疫不全の個体 (HIV に感染した個体または免疫抑制治療を受けている患者など) では損なわれる。したがって、そうしなければ抗原に対して不十分な免疫応答を有するこれらの患者診断を可能にする、より感度の高い試験を開発することが望ましい。このことは、偽陰性試験結果および不確定試験結果の数を低下させ、したがって免疫診断試験の感度および対費用効果を改善させるであろう。

【 課題を解決するための手段 】

【 0018 】

本発明は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を増大させる方法を提供する。この方法は、より良好な、疾患に特異的な抗原認識を可能にする。

20

【 0019 】

本発明の一態様は、生体試料と少なくとも1つの抗原との *in vitro* インキュベーション中における、上昇した温度の使用に関する。上昇した温度でのインキュベーションは、37 でのインキュベーションと比較して、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の増加をもたらす。

【 0020 】

したがって、本発明は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む生体試料を、少なくとも1つの試験抗原と共に、38 ~ 42 の温度などの高温状態でインキュベーションするステップを含む方法を提供する。高温状態でのインキュベーションは、37 の通常の熱条件下でのインキュベーションによって得られる参照レベルと比較した場合に、試験抗原に特異的な免疫応答を増大させる。

30

【 0021 】

また、本発明は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を改善させるために、IL - 7 および / または抗 IL - 10 などの少なくとも1つの免疫変調剤を加えるステップをさらに含む方法にも関する。

【 0022 】

本発明の一態様は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を開始させる対象の性能または能力を決定するための、最適化された方法に関する。この方法は、抗原性刺激に応答した免疫系の細胞からの1つまたは複数の免疫シグナル伝達分子の産生を測定することに基づく。免疫シグナル伝達分子は、免疫シグナル伝達分子に特異的な抗体などのリガンドを使用して、または免疫シグナル伝達分子をコードしている遺伝子の発現レベルを決定することによって検出し得る。

40

【 0023 】

本発明の別の態様は、免疫原性、すなわち細胞媒介性免疫応答を生じさせる抗原の潜在性または能力を決定するための、最適化された方法に関する。細胞性免疫応答を監視するためのこの方法は、ワクチンの合理的な開発のための1つの必須条件である。

【 0024 】

したがって、本発明は、対象における試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の応答性を決定する手段を提供し、ひいては、感染性疾患、病的状態、免疫応答性のレベルの推定、および内在性または外因性の抗原に対する T 細胞応答性のレベルを診断する手段を提供

50

する。

【0025】

本発明によって提供される方法は、偽陰性および不確定試験結果の数を低下させ、したがって、通常のインキュベーション温度、すなわち37で行われた試験と比較して感度を増加させる。したがって、この方法は試験および診断を改善させる。

【0026】

本発明によれば、通常のインキュベーション条件下で低いまたは弱い免疫応答を有する患者/ドナーは、インキュベーション温度を上昇することによって、特にIL-7および/または抗IL-10などの少なくとも1つの免疫変調剤の存在下で、強く応答するようにさせることができる。これにより、本発明は、そうでなければ抗原に対して不十分な免疫応答を有する患者の免疫学的診断を可能にし、また、偽陰性試験結果の数も低下させる。したがって、本発明は、重要なことには免疫不全の個体においても、免疫診断試験の感度および対費用効果を改善させる。さらに、これはワクチン開発ならびにたとえば感染性因子および癌の監視において役割を果たし得る。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】IP-10およびIFN-の応答性に対するインキュベーション温度の影響を示す図である。全血を採血し、18時間、摂氏25、35、37、38、38.5、39、39.5、40、41および43で、抗原TB10.4またはPHAからのペプチドのカクテルと共にインキュベーションした。一部の試験では、より少ない温度を試験した。示したデータは、2人の代表的なドナーを用いた1つの試験からのものである。濃度はpg/mlである。

【図2】最低から最高の応答者の順序にした、34人の健康なドナーからの血漿におけるIP-10の応答を示す図である。全血を採血し、18時間、摂氏37で、抗原TB10.4からのペプチドのカクテルと共にインキュベーションした。>500pg/mlのIP-10で応答したドナーを応答者とみなした。

【図3A-B】摂氏37対39での抗原およびマイトジェンの刺激に対するIP-10の応答、ならびにIL-7の添加およびIL-10の遮断の影響を示す図である。全血を採血し、18時間、摂氏37または39で、IL-7、およびIL-10に対する遮断抗体の存在下または非存在下でインキュベーションした。最初の4列は摂氏37での試験であり、最後の4列は摂氏39での試験である。図3Aは、抗原TB10.4からの重複ペプチドを用いて刺激した11人の「TB10.4非応答者」からのデータを表す図である。値は無刺激の試料におけるレベルが減算してある。図3Bは、抗原TB10.4からの重複ペプチドを用いて刺激した23人の「TB10.4応答者」からのデータを表す図である。値は無刺激の試料におけるレベルが減算してある。

【図3C-D】摂氏37対39での抗原およびマイトジェンの刺激に対するIP-10の応答、ならびにIL-7の添加およびIL-10の遮断の影響を示す図である。全血を採血し、18時間、摂氏37または39で、IL-7、およびIL-10に対する遮断抗体の存在下または非存在下でインキュベーションした。最初の4列は摂氏37での試験であり、最後の4列は摂氏39での試験である。図3Cは、応答者および非応答者からのプールしたバックグラウンドレベルを表す図である。図3Dは、応答者および非応答者からの、プールしたマイトジェンで刺激したレベルを表す図である。値は無刺激の試料におけるレベルが減算してある。

【図4A-B】摂氏37対39での抗原およびマイトジェンの刺激に対するIFN-の応答、ならびにIL-7の添加およびIL-10の遮断の影響を示す図である。全血を採血し、18時間、摂氏37または39で、IL-7、およびIL-10に対する遮断抗体の存在下または非存在下でインキュベーションした。最初の4列は摂氏37での試験であり、最後の4列は摂氏39での試験である。図4Aは、抗原TB10.4からの重複ペプチドを用いて刺激した11人の「TB10.4非応答者」からのデータを表す図である。値は無刺激の試料におけるレベルが減算してある。図4Bは、抗原TB

10

20

30

40

50

10 . 4 からの重複ペプチドを用いて刺激した 23 人の「TB 10 . 4 応答者」からのデータを表す図である。値は無刺激の試料におけるレベルが減算してある。

【図 4 C - D】摂氏 37 対 39 での抗原およびマイトジェンの刺激に対する IFN - の応答、ならびに IL - 7 の添加および IL - 10 の遮断の影響を示す図である。全血を採血し、18 時間、摂氏 37 または 39 で、IL - 7、および IL - 10 に対する遮断抗体の存在下または非存在下でインキュベーションした。最初の 4 列は摂氏 37 での実験であり、最後の 4 列は摂氏 39 での実験である。図 4 C は、応答者および非応答者からのプールしたバックグラウンドレベルを表す図である。(無刺激のレベル) 図 4 D は、応答者および非応答者からの、プールしたマイトジェンで刺激したレベルを表す図である。値は無刺激の試料におけるレベルが減算してある。

10

【図 5】培養により TB であると確認された 9 人の患者からの Qu a n t i F E R O N TB G o l d I n t u b e 試験管からの、IP - 10 の応答を示す図である。全血を Qu a n t i F E R O N TB G o l d I n t u b e システム中に回収し、18 時間、摂氏 37 または 39 で、IL - 7 の添加および IL - 10 の遮断を用いてまたは用いずにインキュベーションした。それぞれのカラムの中央値レベルを示す。

【図 6】培養により TB であると確認された 9 人の患者からの Qu a n t i F E R O N TB G o l d I n t u b e 試験管からの、IFN - の応答を示す図である。全血を Qu a n t i F E R O N TB G o l d I n t u b e システム中に回収し、18 時間、摂氏 37 または 39 で、IL - 7 の添加および IL - 10 の遮断を用いてまたは用いずにインキュベーションした。それぞれの列の中央値レベルを示す。

20

【図 7】摂氏 37 対 39 での、無刺激の試料 (n i l) 中、および TB 10 . 4 抗原やマイトジェンの刺激に応答した IFN - の応答、ならびに IL - 7 の添加および IL - 10 の遮断の影響を示す図である (実施例 2 ~ 5) 。全血を採血し、24 時間、摂氏 37 または 39 で、IL - 7、および IL - 10 に対する遮断抗体の存在下または非存在下でインキュベーションした。最初の 12 列は摂氏 37 での実験であり、最後の 12 列は摂氏 39 での実験である。

【図 8】摂氏 37 対 39 での、無刺激の試料 (n i l) 中、および TB 特異的抗原やマイトジェンの刺激に応答した IFN - の応答、ならびに IL - 7 の添加および IL - 10 の遮断の影響を示す図である。全血を採血し、24 時間、摂氏 37 または 39 で、IL - 7、および IL - 10 に対する遮断抗体の存在下または非存在下でインキュベーションした。最初の 6 列は摂氏 37 での実験であり、最後の 6 列は摂氏 39 での実験である。

30

【図 9】摂氏 37 対 39 での、無刺激の試料 (n i l) 中、および TB 特異的抗原やマイトジェンの刺激に応答した IP - 10 の応答、ならびに IL - 7 の添加および IL - 10 の遮断の影響を示す図である。全血を採血し、24 時間、摂氏 37 または 39 で、IL - 7、および IL - 10 に対する遮断抗体の存在下または非存在下でインキュベーションした。最初の 6 列は摂氏 37 での実験であり、最後の 6 列は摂氏 39 での実験である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

40

本発明は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を増大させるための新規方法に関する。

【0029】

サイトカインおよびケモカインの応答が、伝統的な摂氏 37 でのインキュベーションと比較して高温インキュベーションで劇的に増加したことが、初めて示された。

【0030】

また、本発明は、高温インキュベーションでの増大した免疫認識が、疾患またはワクチンに特異的な抗原に対する免疫応答に適用される現象であることも、初めて示す。また、本発明は、高温インキュベーションでの増大した免疫認識を、どのように診断試験またはワクチン応答の評価に適用できるかも示す。

50

【0031】

さらに、生存サイトカインIL-7を、抗炎症性サイトカインIL-10を遮断する抗体と合わせて加える場合、高温（および通常）インキュベーション温度のどちらでも免疫応答が顕著に増大されることも、初めて実証されている。

【0032】

本発明の一態様は、生体試料と少なくとも1つの抗原とのin vitroインキュベーション中における、上昇した温度の使用に関する。上昇した温度でのインキュベーションは、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の増加をもたらす。

【0033】

また、本発明は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を改善させるための、IL-7および/または抗IL-10などの免疫変調剤の使用にも関する。

10

【0034】

したがって、本発明は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を増大させる手段を提供し、ひいては、試験抗原に特異的な細胞媒介性応答の存在および/またはレベルを決定することが所望される方法および試験を改善させる手段を提供する。

【0035】

本発明の別の態様は、試験抗原の細胞媒介性免疫応答を開始させる対象の潜在性または能力を測定する方法である。

【0036】

試験抗原に特異的な免疫応答は、抗原刺激に応答した、免疫系の細胞による免疫シグナル伝達分子の産生を測定することによって決定することができる。免疫シグナル伝達分子は、免疫シグナル伝達分子に特異的な抗体などのリガンドを使用して、および/または免疫シグナル伝達分子をコードしている遺伝子の発現レベルを測定することによって検出される。

20

【0037】

したがって、本発明は、感染性疾患を診断する、および/またはワクチン中で使用される抗原に対する免疫反応性の存在を診断してワクチンの有効性の監視を可能にする手段を提供する。

【0038】

したがって、本発明は、免疫アッセイおよび他の免疫学的ツールを改善することができる単純な方法を提供する。

30

【0039】

本発明の一態様は、試験抗原に特異的な細胞媒介性応答を増大させる方法に関する。この方法は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む試料を、少なくとも1つの抗原と共に、高温状態でインキュベーションすることに基づく。

【0040】

本発明の別の態様は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む試料を、少なくとも1つの抗原と共に、高温状態で、IL-7の存在下でインキュベーションすることに基づく、試験抗原に特異的な細胞媒介性応答を増大させる方法に関する。

40

【0041】

本発明の第3の態様は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む試料を、少なくとも1つの抗原と共に、高温状態で、抗IL-10の存在下でインキュベーションすることに基づく、試験抗原に特異的な細胞媒介性応答を増大させる方法に関する。

【0042】

本発明のさらなる態様は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む試料を、少なくとも1つの抗原と共に、高温状態で、IL-7および抗IL-10の存在下でインキュベーションすることに基づく、試験抗原に特異的な細胞媒介性応答を増大させる方法に関する。

50

【0043】

試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答は、抗原性刺激に応答したIP-10および/またはIFN- γ などの免疫シグナル伝達分子のレベルを測定することによって決定することができる。IP-10およびIFN- γ のレベルは、IP-10およびIFN- γ に特異的な抗体などのリガンドを使用して、またはIP-10およびIFN- γ をコードしている遺伝子の発現レベルを測定することによって検出し得る。本発明者らは、結核菌に特異的およびBCGワクチンに特異的な刺激ならびに続くIP-10およびIFN- γ のレベルの決定に基づく方法を使用して、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の増大の原理を実証した。この方法で結核菌に感染した人を同定することができる。また、この方法でワクチン接種が成功した人を同定することもできる。

10

【0044】

本発明者らは、高温状態でのインキュベーションが、抗原およびマイトジェンの刺激に対するT細胞および単球からの免疫シグナル伝達分子の応答(IP-10およびIFN- γ)を増加させることができることを示している(実施例2~4)。この効果は、炎症性サイトカインIL-10に対する中和抗体(抗IL-10)を用いてまたは用いずに、T細胞生存サイトカインIL-7を添加することによって、さらに増大させることができる。本発明者らは、抗IL-10およびIL-7の存在下における高温インキュベーションが、バイオマーカーの産生を相乗的に増加させることができることを示している(実施例3~4)。したがって、記載した方法は、摂氏37度でのインキュベーションを用いた伝統的な方法と比較して、より高いレベル(またはより高い規模)の免疫シグナル伝達分子IP-10およびIFN- γ をもたらす。

20

【0045】

本発明者らは、高温状態でのインキュベーションが、理論的には応答するべきである2人のBCGワクチン接種した非応答者を、IP-10およびIFN- γ の両方による応答者へと変換したことを示している。また、これは、2人のTB患者からの不確定結果をそれぞれ陽性および陰性の結果へと変換した。したがって、この方法は偽陰性および不確定試験結果の数を低下させる。高温状態でのインキュベーションは、バックグラウンドのIP-10産生をわずかに増加させたが、IFN- γ のバックグラウンド産生を低下させた(実施例3~4および6)。したがって、本発明の方法は、摂氏37度のインキュベーションを使用した古典的な方法に基づく試験と同等に特異的かつより感度が高く、また、低応答者、たとえば免疫不全の個体の試験および診断を改善させる。

30

【0046】

IFN- γ は主にTリンパ球によって産生され、IP-10は主に単球などの抗原提示細胞によって産生されるが、本発明者らは、バイオマーカーレベルでリンパ球または単球の計数に対していかなる影響も示すことができなかつた(データ示さず)。

【0047】

本発明に記載されている方法は、一連の問題を解決する。細胞媒介性免疫を監視する現在利用可能な方法は、効果パラメータIFN- γ を測定する。IFN- γ は、最も高感度な検出方法の限界にさえ近い、非常に低いレベルで発現される(結核試験の場合、Quantiferon試験は0.35国際単位/ml(17.5pg/ml)、T-SPOT.TB試験は5スポット形成単位/フィールドの陽性試験カットオフレベルを有する)。感度を増強させるためにカットオフを減少させると、最終的には試験の特異性が損なわれる。低い範囲のIFN- γ レベルを有する人の繰返しQuantiferon試験に基づく出版物は、この領域のIFN- γ レベルがカットオフ付近で揺れる傾向にあることを見出ししている。すなわち、細胞媒介性免疫を監視する伝統的な方法は、アッセイの制限、すなわち免疫シグナル伝達分子またはバイオマーカーの低濃度での再現性の不良によって、損なわれている。このことは、偽陽性および偽陰性の結果の潜在的な危険性を強調している。

40

【0048】

記載した方法は、応答、たとえばIFN- γ およびIP-10のレベルを増加させ、こ

50

れにより、細胞媒介性の免疫アッセイ、たとえば結核試験の感度が増加され、これは、摂氏37で行われる伝統的な試験と比較して偽陽性および偽陰性の結果の危険性を低下させる。

【0049】

さらに、通常のインキュベーション条件下で低い免疫応答を有する患者/ドナーは、インキュベーション温度を上昇することによって、特にIL-7および抗IL-10の存在下で、応答するようにさせることができる。これにより、本発明は、そうでなければ抗原に対して不十分な免疫応答を有する患者の診断を可能にするため、偽陰性試験結果または不確定結果を有する患者の数を低下させる。

【0050】

したがって、本発明は、重要なことには免疫不全の個体においても、免疫診断試験の感度および対費用効果を改善させる。さらに、これは感染性因子および癌のどちらのワクチン開発においても役割を果たし得る。

【0051】

方法

本発明は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を増大させる方法を提供する。

【0052】

本発明の一態様は、生体試料と少なくとも1つの抗原との*in vitro*インキュベーション中における、上昇した温度の使用に関する。上昇した温度でのインキュベーションは、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の増加をもたらす。

【0053】

したがって、本発明は、

a) 哺乳動物由来の、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む試料を提供するステップと、

b) 前記試料を、高温状態で、少なくとも1つの試験抗原と共にインキュベーションするステップと、

c) 前記試料における試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を決定するステップとを含み、前記高温状態でのインキュベーションが、37の通常の熱条件下でのインキュベーションによって得られる参照レベルと比較した場合に、試験抗原に特異的な免疫応答の増大を生じさせる、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法に関する。

【0054】

試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答とは、診断することを望む疾患または状態に特異的な抗原に対する応答として理解されたい。言い換えれば、細胞媒介性免疫応答の特異性は試験抗原の特異性から派生する。

【0055】

ワクチンの有効性の監視の場合、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答は、ワクチン中に含まれる抗原に対して生じさせる。

【0056】

試験抗原に特異的な細胞の免疫応答の例は、結核菌(*M. tuberculosis*)に感染した個体におけるESAT-6に対する応答である。

【0057】

好ましい実施形態では、試料は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む。特に好ましい実施形態では、試料は免疫適格細胞を含む。免疫適格細胞は、抗原に曝露された後に、細胞媒介性免疫応答などの免疫応答を生じることができる。

【0058】

免疫シグナル伝達分子

試験抗原に特異的な免疫応答は、特異的な抗原刺激に反応した免疫系の細胞による免疫シグナル伝達分子の産生を測定することによって決定することができる。

【0059】

10

20

30

40

50

したがって、本発明の一態様は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を、少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のレベルを測定することによって決定する方法である。

【0060】

したがって、本発明によれば、1、2、3、4、5、6、7または8つの免疫シグナル伝達分子のレベルを決定する。好ましくは、1つまたは2つまたは3つまたは4つの免疫シグナル伝達分子のレベルを決定する。最も好ましくは、1つまたは2つの免疫シグナル伝達分子のレベルを決定する。

【0061】

したがって、好ましい実施形態では、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたは少なくとも5つの免疫シグナル伝達分子のレベルを測定する。最も好ましいのは、少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のレベルを測定することである。

10

【0062】

最も好ましいのは、1~2つの免疫シグナル伝達分子のレベルの測定、または1~3つの免疫シグナル伝達分子のレベルもしくは1~4つの免疫シグナル伝達分子のレベルである。最も好ましい実施形態では、1つまたは2つの免疫シグナル伝達分子のレベルを測定する。

【0063】

本発明の一実施形態では、複数の免疫シグナル伝達分子のレベルを測定することは、この方法を診断試験に適用した際に、偽陽性の数を低下させ、判別力を増加させ得る（たとえば増加した感度および/または特異性）。このことは、たとえば、この方法を、対象における試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を決定することができる試験として使用する場合に有用であり、ひいては、たとえば感染性疾患、癌を診断する、および/またはワクチンの有効性を監視するための手段を提供する。

20

【0064】

したがって、一実施形態では、この方法は、前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答が、少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のレベルを測定することによって決定されるステップをさらに含む。

【0065】

したがって、一実施形態では、この方法は、前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答が、サイトカインまたはケモカインの応答などの少なくとも1つのバイオマーカーのレベルを測定することによって決定されるステップをさらに含む。

30

【0066】

免疫シグナル伝達分子とは、特定の免疫系の細胞によって分泌される、および/または免疫系の細胞に対して効果を有する物質の大きなファミリーとして理解されたい。したがって、免疫シグナル伝達分子は免疫系の細胞などの細胞間の情報の伝達に参与している。

【0067】

好ましい本実施形態では、免疫シグナル伝達分子または少なくとも1つのシグナル伝達分子は、サイトカイン、ケモカイン、可溶性受容体および可溶性受容体拮抗剤の群から選択される。

40

【0068】

本発明の特に好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子はサイトカインまたはケモカインである。

【0069】

本発明の最も好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子はサイトカインである。

【0070】

サイトカインとは、細胞間でシグナルを局所的に運ぶ免疫系の特定の細胞によって分泌され、したがって他の細胞に対して効果を有する、いくつかの物質のうちの任意のものとして理解されたい。サイトカインはシグナル伝達分子として分類することができる。これらは、タンパク質、ペプチド、または糖タンパク質である。用語サイトカインには、身体

50

全体にわたって多様な発生学的起源の細胞によって広く産生される、ポリペプチド調節因子の大きくかつ多様なファミリーが包含される。基本的に、用語「サイトカイン」とは、それだけには限定されないが、インターロイキン、インターフェロンなどの免疫変調剤をいう。免疫シグナル伝達分子は、サイトカイン I N F - 、 I L - 2、 T N F - 、 I L - 1 b および I L - 1 2 からなる群から選択される。

【 0 0 7 1 】

本発明の別の最も好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子はインターフェロンである。

【 0 0 7 2 】

本発明の別の最も好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子は I F N - である。

10

【 0 0 7 3 】

I F N -

インターフェロン - ガンマ (I F N -) とは、ウイルスおよび細菌の感染症に対する免疫応答に重要なサイトカインである。ヒトでは、 I F N - タンパク質は I F N G 遺伝子によってコードされている。 I F N - は、免疫賦活性および免疫調節性の効果の両方を有する。 I F N - は、主にナチュラルキラーおよびナチュラルキラー T 細胞によって自然免疫応答の一部として、ならびに、抗原に特異的な免疫が発生した後は C D 4 および C D 8 細胞毒性 T リンパ球エフェクター T 細胞によって、産生される。

【 0 0 7 4 】

別の最も好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子はケモカインである。ケモカインとは、小さなサイトカイン、または細胞によって分泌されるタンパク質のファミリーである。その名前は、付近の応答性細胞において定方向の走化性を誘導するその能力に由来しており、これらは走化性サイトカインである。これらのタンパク質は、その標的細胞の表面上に選択的に見つかる、ケモカイン受容体と呼ばれる G タンパク質結合膜貫通受容体と相互作用することによって、その生物学的効果を発揮する。ケモカインは、免疫系の発生、恒常性、および機能において基礎的な役割を果たし、中枢神経系の細胞および血管形成若しくは血管形成阻害 (a n g i o s t a s i s) に関与する内皮細胞に対して効果を有する。ケモカインは、4 個の保存的なシステイン残基のうち最初の 2 個の配置に基づいて、2 つの主要なサブファミリー、すなわち C X C および C C に分類される。2 個のシステインは、C X C ケモカイン中では単一のアミノ酸によって分離されており、C C ケモカイン中では隣接している。C X C ケモカインは、C X C モチーフに隣接し、かつ N 末端側にある g l u - l e u - a r g 配列の存在または非存在に基づいて、E L R および非 E L R 型へとさらに亜分類される。E L R 型は好中球で走化性である一方、非 E L R 型はリンパ球で走化性である。

20

30

【 0 0 7 5 】

好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子は C C - ケモカインからなる群から選択される。

【 0 0 7 6 】

別の好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子は、C X C - ケモカインからなる群から選択される。

40

【 0 0 7 7 】

さらに別の好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子は、I P - 1 0、M I G、M C P - 1、M C P - 2、M C P - 3 からなる群から選択される。

【 0 0 7 8 】

本発明に関連する他の免疫シグナル伝達分子は、I L - 1 受容体の拮抗剤である I L - 1 R A および可溶性受容体である s I L - 2 R である。

【 0 0 7 9 】

本発明の好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの免疫シグナル伝達分子は、I P - 1 0、I N F - 、M I G、I L - 2、T N F - 、M I P - 1 a、M C P - 1、M C P - 2、M C P - 3、I L - 1 b、I L - 1 R A、s I L - 2 R、C D 4 0 - リガンドおよび

50

IL - 12 からなる群から選択される。本発明の別の好ましい実施形態では、少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子は、IP - 10、INF - およびIL - 2 からなる群から選択される。

【0080】

本発明の別の好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子はINF - である。

【0081】

本発明の最も好ましい実施形態では、免疫シグナル伝達分子はIP - 10である。

【0082】

また、免疫シグナル伝達分子のレベルの概念は、それだけには限定されないが、少なくとも2つのサイトカインの応答の乗算、除算および/または加算などの、濃度測定値の数学的な操作もカバーする。

10

【0083】

IP - 10

INF - 誘導タンパク質10 (IP - 10) またはCXCL10は、ケモカインである。IP - 10の遺伝子は、in situハイブリダイゼーションによって4q21にマッピングされている。IP - 10の発現は、インターフェロン (INF、すなわちインターフェロンガンマ (INF -)) および炎症性刺激によって上方制御されており、これは多くのTh1型の炎症性疾患において様々な組織および細胞種中で発現されている。

【0084】

20

ヒト遺伝子配列は、Gene Bank中で受託番号BC010954号 (gi15012099) の下で見つけることができる。

【0085】

IP - 10は、骨髄コロニー形成を阻害し、in vivo抗腫瘍活性を有しており、ヒト単球およびT細胞の化学誘引物質であり、内皮細胞へのT細胞接着を促進する。IP - 10は、in vivo血管形成の強力な阻害剤である。IP - 10は、炎症および腫瘍形成中の血管形成の調節に関与し得る。IP - 10はRAS標的遺伝子でもあり、大多数の結腸直腸癌において過剰発現されている。IP - 10が、IL8などの他のケモカインの相互作用表面に類似のIP - 10のN - ループおよび40s - ループ領域によって形成される疎水性の裂け目を介して、CXCR3のN末端と相互作用することが、核磁気共鳴分光分析を使用して示されている。IP - 10のN末端および30sループによって形成される疎水性の裂け目からなる追加の相互作用領域が同定されている。このことは、30sループに関与する機構およびベータ鎖2の立体配置がIP - 10とCCR3との相互作用および拮抗機能を説明し得ることを示唆している。

30

【0086】

結核の場合、高レベルのIP - 10は、TB患者および免疫再構築症候群を経験しているTB - HIV同時感染患者のリンパ節および肺結核性肉芽腫中、胸水中、および血清または血漿中に見つかっている。

【0087】

したがって、一実施形態では、この方法は、IP - 10およびINF - の両方のレベルを測定することをさらに含む。したがって、本発明の一態様は、

40

a) 哺乳動物由来の、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む試料を提供するステップと、

b) 前記試料を、高温状態で、少なくとも1つの試験抗原と共にインキュベーションするステップと、

c) 前記試料中のIP10および/またはINF - のレベルを決定するステップとを含み、前記高温状態でのインキュベーションが、37の通常の熱条件下でのインキュベーションによって得られる参照レベルと比較した場合に、試験抗原に特異的な免疫応答の増大を生じさせる、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法に関する。

50

【0088】

さらに別の実施形態では、この方法は、IP-10および/またはIFN- γ ならびに少なくとも1つの他のシグナル伝達分子のレベルを測定することをさらに含む。

【0089】

シグナル伝達分子(複数可)のレベルの決定

免疫シグナル伝達分子は、免疫シグナル伝達分子に特異的な抗体などのリガンドを使用して、または免疫シグナル伝達分子をコードしている遺伝子の発現レベルを測定することによって検出し得る。

【0090】

したがって、一実施形態では、この方法は、前記免疫シグナル伝達分子のレベルが、mRNAおよび/またはタンパク質のレベルを測定することによって決定されるステップをさらに含む。

【0091】

さらに別の実施形態では、免疫シグナル伝達分子の位置は、免疫蛍光および顕微鏡観察などの方法によって*in situ*で決定される。

【0092】

したがって、本発明の一態様は、

a) 哺乳動物由来の、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を提供するステップと、

b) 前記試料を、高温状態で、少なくとも1つの試験抗原と共にインキュベーションするステップと、

c) 前記試料における試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を決定するステップとを含み、前記高温状態でのインキュベーションが、37°Cの通常の熟条件下でのインキュベーションによって得られる参照レベルと比較した場合に、試験抗原に特異的な免疫応答の増大を生じさせ、前記免疫シグナル伝達分子のレベルが、mRNAおよび/またはタンパク質のレベルを測定することによって決定される、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法に関する。

【0093】

免疫シグナル伝達分子は、好ましくは、それだけには限定されないがIP-10および/またはIFN- γ などのサイトカインまたはケモカインである。免疫シグナル伝達分子の存在またはレベルは、分子自身のレベルで、または遺伝子が発現される程度によって決定し得る。IP-10および/またはIFN- γ などの免疫シグナル伝達分子のレベルは、当技術分野で知られている免疫学的方法などの慣用の分析方法によって測定する。

【0094】

免疫シグナル伝達分子の測定は、本明細書中の教示に従って、遺伝子、RNA、またはタンパク質のレベルでの他の免疫シグナル伝達分子の測定と組み合わせることができる。

【0095】

本発明中に記載の方法はどれもプラットフォーム非依存性であることを理解されたい。したがって、それだけには限定されないが、ELISA、ELISPOT、Luminex、Multiplex、免疫プロッティング、免疫クロマトグラフィー側方流動アッセイ、酵素増幅免疫アッセイ技法、RAST試験、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光および様々な免疫学的ドライスティックアッセイ(*immunological dry stick assays*) (たとえば側方流動またはクロマトグラフィースティック試験)などの任意の免疫学的方法を本発明に適用し得る。

【0096】

上述のように、免疫シグナル伝達分子の検出は、タンパク質または核酸のレベルで行い得る。その結果、前記免疫シグナル伝達分子の存在またはレベルへの言及には、直接的および間接的なデータが含まれる。たとえば、高レベルのIP-10 mRNAは、IP-10のレベルの増加を示す間接的なデータである。

【0097】

10

20

30

40

50

さらに、DNA、RNAおよび/またはmRNAのレベルを測定するための任意の方法、たとえばPCR技法を、シグナル伝達分子のレベルの測定に使用し得ることを理解されたい。シグナル伝達分子のレベルをDNAまたはRNAのレベルで測定する方法は、それだけには限定されないが、定量的PCR(q-PCR)、リアルタイムPCR(qRT-PCR)および逆転写PCR(RT-PCR)などである。

【0098】

したがって、本発明の一態様は、前記免疫シグナル伝達分子のレベルの前記決定を、qPCR、RT-PCR、qRT-PCR、ELISA、ELISPOT、Luminex、Multiplex、免疫プロテイング、免疫クロマトグラフィー側方流動アッセイ、酵素増幅免疫アッセイ技法、RAST試験、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光および様々な免疫学的ドライスティックアッセイからなる群から選択される方法を使用して行う方法に関する。

10

【0099】

免疫シグナル伝達分子に対するリガンドは、これらの分子の検出および/または定量において特に有用である。

【0100】

免疫シグナル伝達分子に対する抗体が特に有用である。本明細書中で企図される方法のための技法は当技術分野で知られており、たとえば、サンドイッチアッセイ、xMAP Multiplex、Luminex、ELISAおよびELISPOTが含まれる。抗体への言及には、抗体の部分、哺乳動物化(たとえばヒト化)抗体、組換えまたは合成抗体ならびにハイブリッドおよび単鎖抗体が含まれる。

20

【0101】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体はどちらも、免疫シグナル伝達分子またはその抗原性断片を用いた免疫化によって入手可能であり、どちらの種類も免疫アッセイに利用可能である。どちらの種類も血清を入手する方法も当技術分野で周知である。

【0102】

ポリクローナル血清はより好ましくないが、適切な実験動物に有効量の免疫シグナル伝達分子またはその抗原性部分を注射し、動物から血清または血漿を採取し、既知の免疫吸着技法のうちの任意のものによって特異的な血清を単離することによって比較的容易に調製される。この方法によって産生される抗体は事実上任意の種類免疫アッセイにおいて利用可能であるが、産物の潜在的な不均一性が理由で、一般により好まれない。

30

【0103】

大量に産生する能力および産物の均一性が理由で、免疫アッセイにおけるモノクローナル抗体の使用が特に好ましい。不死化細胞系と免疫原性調製物に対して感作させたリンパ球とを融合することによって誘導した、モノクローナル抗体を産生するためのハイブリドーマ細胞系の調製は、当業者に周知の技法によって行うことができる。

【0104】

また、検出は、シグナル伝達分子、たとえばIP-10に特異的な抗体を競合的蛍光偏光イムノアッセイ(CFIPA)において直接測定すること、またはインターフェロン-ガンマのホモ二量体化を二量体化誘導蛍光偏光(DIFP)によって検出することのどちらかによっても、得ることができる。どちらの場合でも、検出および定量は6 pg/ml以下まで下がる。

40

【0105】

IP-10などの生物学的マーカーを決定するためのいくつかの技法が、当業者に知られている。免疫エフェクターの存在またはレベルは、ELISA、Luminex、ELISPOT、RT-PCRなどのmRNAに基づく技法、または細胞内フローサイトメトリーによって決定し得る。

【0106】

Luminex

インターフェロンガンマ(IFN-)は、感染性疾患の免疫学、特にTBの免疫学に

50

においてTh1応答を測定するための判断基準である。Luminexによって決定されるIFN- γ は、QuantIFERON試験のために開発された市販のELISAなどのより感度の高い方法と比較して感度が低いため、不良のマーカである。

【0107】

xMAPまたはLuminexは、フローサイトメトリーを用いた溶液中の分析物の多重化(multiplexing)を可能にする。特許(propriety)技法を使用して、Luminexは、2つの蛍光色素の様々な比を組み合わせることによってxMAPマイクロスフェアを内部で色分けする。それぞれのビーズ組は異なる捕捉抗体とコンジュゲートしている。R-フィコエリスリンで標識した検出抗体の使用により、相対蛍光強度を測定することによってマイクロスフェア表面上で起こっている抗原-抗体反応の定量が可能となる。

10

【0108】

ELISA

酵素結合免疫吸着アッセイとは、ELISA、酵素免疫アッセイまたはEIAとも呼ばれ、試料中の抗体または抗原の存在を検出するために、主に免疫学において使用される生化学的技法である。簡単に言えば、ELISAでは、未知の量の抗原を表面に固定し、その後、特異的抗体を、抗原と結合できるように表面上に洗い流す。この抗体を酵素と連結させ、最終ステップで、酵素が何らかの検出可能なシグナルへと変換することができる物質を加える。蛍光ELISAの場合、適切な波長の光を試料に照らした際、任意の抗原/抗体複合体が蛍光発光して、試料中の抗原の量を蛍光の規模によって推測できるようになる。少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のレベルを決定するためにELISAを使用することは、実施例中にさらに記載されている。

20

【0109】

免疫クロマトグラフィー試験(ICT)

ICT(たとえば側方流動スティック(lateral flow stick))の原理は、すべてIP-10などの免疫シグナル伝達分子に特異的な一次抗体(Ab)および1~4つの二次Abを利用するin vitro免疫診断試験である。一次Abはコロイド金に付着しており、二次Abを固定した線で含有するレーンを有する試料パッド内に含浸されている。

【0110】

第1のステップでは、インキュベーションした試料を試料パッドの左側部分に加える。血清または血漿はレーン内で前方に流れ、存在するすべてのIP-10がコロイド金で標識した一次Abと結合することが可能となる。二次Abは、レーンの膜を横切る線に固定する。その後、試料および標識した一次Abは、膜レーンに沿って、固定された二次Abの線を横切って遊走する。試験の解釈：金で標識した一次Abと複合体形成したすべてのIP-10は膜上の二次Abによって捕捉され、線の色変化が起こる。その後、試験を、a.色強度に基づいて、またはb.応答試料(たとえば全血などの抗原刺激した試験材料の血漿)で行ったものとnil試料で行ったものとの2つの試験を比較し、nil試験の色変化の強度をAg試験の色変化の強度から減算し、これを参照と比較することによって、解釈する。

30

40

【0111】

また、試験の読み取りは、コンピュータインタフェースを使用した自動または半自動であってもよい。この設定は、自動インタフェースにより線の色変化の強度が決定されるように構築することができる。

【0112】

好ましい実施形態では、読み取りは、スキャナ、たとえば平面スキャナ、リーダまたは携帯用リーダを使用して行う。線の強度は、たとえば関連するソフトウェアを使用して参照と比較することによって、定量することができる。

【0113】

別の好ましい実施形態では、読み取りは、カメラ、たとえば携帯電話のデジタルカメラ

50

を使用して行う。線の強度は、たとえば裸眼または関連するソフトウェアを使用して参照と比較することによって、定量することができる。携帯電話のカメラを使用する場合、分析のために写真をたとえばマルチメディアメッセージサービス（すなわち MMS）で電話からセントラルサーバーに送信することができる。

【0114】

別の好ましい実施形態では、分析の読み取りは、携帯電話のデジタルカメラを使用して、搭載されたソフトウェアを使用して行う。

【0115】

免疫変調剤

本発明は、試料と少なくとも1つの試験抗原との *in vitro* インキュベーション温度を上昇することによって炎症誘発性の免疫応答を増加させる方法に関する。したがって、本発明は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を、バイオマーカーの応答を増強させる高温状態でインキュベーションする試験を提供する。

10

【0116】

高温は細胞ストレスを潜在的にもたすため、本発明のさらなる態様は、これらの機構に対抗するために免疫変調剤を加えることである。したがって、本発明の特に好ましい実施形態は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を改善させるために、少なくとも1つの免疫変調剤を加えるステップさらに含む方法である。

【0117】

また、本発明は、少なくとも1つの免疫変調剤を加えることによって免疫診断試験を改善させることにも関する。

20

【0118】

用語、免疫変調剤とは、免疫応答を改変させる物質として理解されたい。免疫変調剤とは、免疫増強、免疫抑制、もしくは免疫寛容の誘導などのように、免疫応答の調整を所望のレベルまで誘導することができる物質、および/または、細胞は高温が原因でストレスを受けるため、潜在的な有害効果に対抗することができる物質である。また、免疫変調剤とは、免疫系の特定領域、たとえばTリンパ球細胞またはTリンパ球部分集団をブーストまたは阻害することができる物質としても理解される。

【0119】

本発明による好ましい免疫変調剤は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を改善させるサイトカインおよび中和抗体である。特定の好ましい免疫変調剤は、IL-7、IL-15およびIL-21などのサイトカインである。他の特定の好ましい免疫変調剤は、IL-10、IL-4、および/またはIL-5と結合する中和抗体である。

30

【0120】

本発明の一態様は、サイトカインIL-7、IL-15、IL-21；IL-10、IL-4、IL-5と結合する中和抗体、抗CD25抗体でコーティングしたビーズ、抗CD39抗体でコーティングしたビーズ、IL-10、JAK1またはTYK2をコードしている遺伝物質に対するセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、CpG含有オリゴヌクレオチド、TLR変調剤として作用するオリゴヌクレオチド、およびTLR変調剤からなる群から選択される少なくとも1つの免疫変調剤をステップbで加える、少なくとも1つの免疫変調剤の添加をさらに含む方法である。免疫変調剤を加える効果は、実施例中に、IL-10に対する抗体、およびIL-7の添加によって例示されている。

40

【0121】

好ましい実施形態では、少なくとも1つの免疫変調剤は、IL-7、IL-15およびIL-21からなる群から選択されるサイトカインである。

【0122】

別の好ましい実施形態では、少なくとも1つの免疫変調剤は、IL-10と結合する中和抗体、IL-4と結合する中和抗体、IL-5と結合する中和抗体およびCD25と結合する中和抗体からなる群から選択される中和抗体である。

【0123】

50

さらに別の好ましい実施形態では、少なくとも1つの免疫変調剤は、抗CD25抗体でコーティングしたビーズ、IL-10、JAK1またはTYK2をコードしている遺伝物質に対するセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、CpG含有オリゴヌクレオチド、TLR変調剤として作用するオリゴヌクレオチド、およびTLR変調剤からなる群から選択される。

【0124】

サイトカインであるインターロイキン-7(IL-7)がナイーブおよびメモリーのCD4+およびCD8+T細胞部分組の生存および恒常性に必須であることは、十分に確立されている。高温は細胞のストレスおよび損傷を引き起こす可能性があり、インキュベーション中に生存サイトカインIL-7を加えることでこれらの潜在的に有害な効果から保護し得る。

10

【0125】

本発明の特に好ましい実施形態は、細胞を高温状態でのインキュベーションの潜在的に有害な効果から保護するためにIL-7を加える方法に関する。

【0126】

本発明の別の態様は、炎症誘発反応をブーストするために、抗炎症性サイトカインIL-10に対する抗体を加えることである。

【0127】

高温状態でのインキュベーション、または抗IL-10を用いてもしくは用いずにIL-7を加えることで、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答が増加することが、本発明によって示されている。

20

【0128】

本発明の好ましい実施形態は、炎症誘発反応をさらにブーストするために抗炎症性サイトカインIL-10に対する抗体の添加を用いてまたは用いずに、細胞を高温インキュベーションのこれらの潜在的に有害な効果から保護するためにIL-7を加える方法に関する。

【0129】

したがって、本発明は、IL-10と結合する中和抗体を用いてまたは用いずにIL-7を加えることによって、免疫診断試験を改善させる方法にも関する。

【0130】

また、本発明は、IL7の存在下での、抗IL10を用いたまたは用いない、高温状態でのインキュベーションにも関する。IL-7および抗IL-10の両方の存在が、抗原依存性かつマイトジェン誘導性の両方の免疫シグナル伝達分子を産生するために最適なインキュベーション条件を提供すると考えられる。

30

【0131】

また、本発明は、免疫シグナル伝達分子、たとえばケモカインIP-10および/またはサイトカインIFN- γ を、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を抗原性タンパク質/ペプチドで刺激した後に、高温状態で、ならびに/またはIL-7および/もしくは抗IL-10の存在下で測定することに基づく、たとえば結核菌の感染症を検出することができる試験システムにも関する。

40

【0132】

記載した試験システムは、通常のインキュベーション温度、すなわち37°Cで行われた試験よりも感度が高く、偽陰性および不確定試験結果の数を低下させる。これは試験および診断を改善させる。本発明によれば、通常のインキュベーション条件下で低い免疫応答を有する患者/ドナーは、インキュベーション温度を上昇することによって、特にIL-7および抗IL-10の存在下で、応答するようにさせることができる。これにより、本発明は、そうでなければ抗原に対して不十分な免疫応答を有する患者の診断を可能にする。さらに、本発明は、重要なことには免疫不全の個体においても、免疫診断試験の感度および対費用効果を改善させる。さらに、これは感染性因子および癌のワクチン開発において役割を果たし得る。

50

【 0 1 3 3 】

I L - 7

インターロイキン7 (I L - 7) とは、ヒトでは I L 7 遺伝子によってコードされているタンパク質である。I L - 7 は生存サイトカインである。I L - 7 はリンパ系前駆細胞の増殖を刺激することが知られており、B および T 細胞の発生に重要である。サイトカインであるインターロイキン - 7 は、ナイーブおよびメモリーの C D 4 + および C D 8 + T 細胞の生存および恒常性に必須であることが示されており、I L - 7 シグナル伝達の欠損はヒトにおいて重篤な免疫不全をもたらす。

【 0 1 3 4 】

I L - 1 0

インターロイキン - 1 0 (I L - 1 0) とは、ヒトサイトカイン合成阻害因子 (C S I F) としても知られ、抗炎症性サイトカインである。ヒトでは、I L - 1 0 は I L 1 0 遺伝子によってコードされている。I L - 1 0 は重要な免疫調節分子であることが知られている。これは、マクロファージおよび T h 1 細胞などの細胞からの I F N - 、 I L - 2 、 I L - 3 、 T N F および G M - C S F などの炎症誘発性サイトカインの合成を阻害することができる。また、I L - 1 0 は、抗原提示細胞の抗原提示能力の強力な抑制因子でもある。しかし、これは特定の T 細胞および肥満細胞に対して刺激性でもあり、B 細胞の成熟および抗体産生を刺激する。I L - 1 0 を顕著に阻害する中和抗体が開発されており、これにより I L - 1 0 の生物学的効果が阻害または中和される。また、D N A および / または R N A と結合するサイレンシングオリゴヌクレオチドも、I L - 1 0 に媒介されるシグナルの阻害に有効である。

【 0 1 3 5 】

細胞集団の免疫変調

別の実施形態では、抗炎症を阻害することによってアッセイをさらに増強させることができる。これは、調節性 T 細胞または T h 2 細胞などの試験抗原の細胞媒介性免疫応答を阻害する細胞集団の阻害、枯渇または排除によって行うことができる。

【 0 1 3 6 】

好ましい免疫変調剤は、T 調節性細胞の機能または活性を阻害する。これらの免疫変調剤は、C D 2 5 リガンド、ヤヌスキナーゼ 1 (J A K 1) またはチロシンキナーゼ 2 (T Y K 2) をコードしている遺伝物質に対するセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、C p G 含有オリゴヌクレオチド、T L R 変調剤として作用するオリゴヌクレオチド、および T L R 変調剤からなる群から選択される。より詳細には、T 調節性細胞阻害性質を有する免疫変調剤は、抗 C D 2 5 抗体および / またはホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドである。より詳細には、免疫細胞媒介性アッセイの感度を増大または増強させるために、オリゴヌクレオチドは、J A K 1 または T Y K 2 分子をコードしている遺伝物質 (R N A または D N A) に相補的または相同的であることができる。本明細書中で企図されるオリゴヌクレオチドは、修飾された主鎖を有し得る、またはホスホロチオエートで修飾されたオリゴヌクレオチドなどの化学修飾されたヌクレオチドもしくはヌクレオシドを有し得る。

【 0 1 3 7 】

本発明の一態様は、ビーズの表面上にコーティングした抗 C D 2 5 抗体である、少なくとも 1 つの免疫変調剤を加えることをさらに含む方法である。

【 0 1 3 8 】

試験抗原

本発明は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を増大させる方法に関する。本発明に適した抗原の選択肢は、試験抗原とも呼ばれ、所望する場合に細胞媒介性免疫応答に対する前記抗原の効果を決定する、任意の抗原である。

【 0 1 3 9 】

試験抗原とは、診断することを望む疾患または状態に特異的な抗原として理解されたい。

10

20

30

40

50

【0140】

試験抗原は、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質、炭水化物、糖タンパク質、リン脂質、リンタンパク質もしくはホスホリボタンパク質または非タンパク質化学薬品の形態であり得る。

【0141】

試験抗原の一例は、結核菌中でほぼ排他的に発現され、結核菌に特異的であるとみなすことができる抗原である、ESAT-6である。ESAT-6ペプチドは抗原提示細胞上に提示され、ESAT-6抗原に特異的なT細胞受容体を保有するT細胞によって認識される。

【0142】

非特異的抗原の一例は、カルメットゲラン桿菌(BCG)の精製タンパク質誘導体(PPD)または結核菌、ウシ結核菌(M. bovis)もしくはトリ結核菌(M. avium)のツベルクリンPPDである。PPDはいくつかの非特異的な抗原を含むタンパク質沈殿物である。PPDがほとんどのマイコバクテリア種(らい病の疾患を引き起こすらい菌(M. Leprae)が含まれる)と交差反応することは十分に確立されており、さらに、PPDはマイトジェン様効果を含めた非特異的な効果を有する。それ故、PPDは試験抗原としてみなすことができない、すなわちPPDは非特異的抗原である。

【0143】

非特異的抗原の他の例は、強力な自然免疫応答を誘発する抗原、たとえばT細胞および生得的受容体のどちらによっても認識されるリポ多糖(LPS)である。LPSは試験抗原として分類することができる特異的抗原を含むが、多くの場合は生得的応答の方が強力であり、これは試験抗原誘導性シグナルを不明瞭にする。生得的応答は免疫学的メモリーに非依存的であるため、これらは、哺乳動物が、以前にその特異的試験抗原に遭遇し、それにより特異的試験抗原(複数可)に対する免疫学的反応性を生じたかどうか、または以前に他の抗原に遭遇して特異的試験抗原(複数可)に対する免疫学的交差反応性を生じたかどうかを識別することができる特異的シグナルを生じることができない。

【0144】

言い換えれば、細胞媒介性免疫応答の特異性は試験抗原の特異性に由来する。

【0145】

疾患または状態を評価するために必要な特異性の度合に応じて、精通した技術者は様々な特異性の試験抗原を選択することができる。

【0146】

本発明の一態様では、本発明に適した試験抗原の選択肢は、精通した技術者が評価したい感染症の種類に依存する。したがって、選択された抗原は疾患に関連する。たとえば、結核菌の感染症を監視する場合、任意の利用可能な結核菌抗原が必要な応答を生じることができ、逆もそうである。いくつかの試験抗原が既存の市販アッセイにおいて既に使用されている。

【0147】

感染症が結核に関連していると考えられている場合、抗原または少なくとも1つの抗原はRD-1および/またはRD-11抗原である。

【0148】

好ましい実施形態では、抗原は、RD-1抗原、ESAT-6、CFP-10、TB7.7、融合タンパク質ESAT-6/CFP-10、TB10.4、および異なるが特異的ないくつかの抗原を組み合わせた融合タンパク質からなる群から選択される。

【0149】

試験抗原に特異的なバイオマーカーの応答の一例は、たとえば実施例6に例示されている、結核菌特異的抗原ESAT-6、CFP10およびTB7.7を用いた刺激である)

【0150】

別の好ましい実施形態では、抗原または少なくとも1つの抗原は、以下のin vivo発現された遺伝子からの潜伏抗原からなる群から選択される：Rv0079、Rv05

10

20

30

40

50

70、Rv0717、Rv1170、Rv1284、Rv1363、Rv1956、Rv2034、Rv2225、Rv2324、Rv2380、Rv2435、Rv2465、Rv2737c、Rv2838c、Rv2982c、Rv3353c、Rv3420cおよびRv3515。

【0151】

さらに別の好ましい実施形態では、抗原または少なくとも1つの抗原は、以下の耐久性低酸素応答 (Enduring Hypoxic Response) 遺伝子からの抗原からなる群から選択される：Rv0140、Rv0244c、Rv0251、Rv0384c、Rv0753c、Rv0767、Rv0846、Rv0847、Rv0967、Rv0990、Rv0991、Rv1284、Rv1403、Rv1471、Rv1733、Rv1806、Rv1874、Rv1875、Rv1909、Rv1955、Rv1956、Rv1957、Rv2034、Rv2035、Rv2324、Rv2389、Rv2465、Rv2466、Rv2558、Rv2626、Rv2627、Rv2628、Rv2642、Rv2643、Rv2658、Rv2660、Rv2662、Rv2745、Rv2913、Rv3223、Rv3406、Rv3515、Rv3536およびRv3862。

10

【0152】

本発明に関連する試験抗原は、特異性を損なわずに免疫原性を改善させるために、たとえばMHCからの不変鎖とカップリングさせることによって変更することができる。

【0153】

また、トリ結核菌、エム・ゴルドナエ (M. gordonae) およびエム・ゼノピ (M. xenopi) からなるリストから選択されるNTMセンシチン (sensitin) も、好ましい抗原である。

20

【0154】

現在好ましい実施形態では、試験抗原または少なくとも1つの試験抗原は、ESAT-6、CFP-10、TB7.7、ならびに他のRD-1およびRD-11抗原からなる群から選択される。

【0155】

本発明のさらなる一実施形態では、試験抗原はESAT-6である。

【0156】

本発明の別の実施形態では、試験抗原はCFP-10である。

30

【0157】

本発明のさらなる実施形態では、試験抗原はTB7.7である。

【0158】

本発明の現在好ましい実施形態では、試験抗原はRD抗原である。

【0159】

本発明の現在好ましい実施形態では、試験抗原はRD-1抗原である。

【0160】

本発明のさらなる現在好ましい実施形態では、抗原はRD-11抗原である。

【0161】

いくつかの研究所が、個々の感染性因子、いわゆる微生物または疾患に特異的な抗原によって厳密に発現される試験抗原の同定に取り組んでいる。結核菌の場合、特異的試験抗原は、それだけには限定されないが、休眠、潜伏、活動、近時 (recent)、肺、肺外、局在または治癒段階などの、感染の様々な段階で発現される。

40

【0162】

本発明は、そのような試験抗原を使用して実装することができ、したがってその具体的な段階 (たとえば結核菌の潜伏感染) を同定するためのツールを提供する。

【0163】

好ましい実施形態では、応答試料を作製する際に同じ微生物からのいくつかの抗原を加えることができる。様々な組織型の好みを有するいくつかの抗原を加えることによって、

50

方法の強度が増す。結核の場合、ESAT-6、CFP-10およびTB7.7タンパク質の抗原ペプチドを組み合わせることで、この試験が幅広い範囲の組織型をカバーし、したがって様々な患者集団においてより強力かつ信頼性のある試験結果を与えることが確実となる。

【0164】

感染症がクラミジア属 (*Chlamydia*) に関連していると考えられている場合、抗原は、血清型D抽出物、主要外膜タンパク質 (MOMP)、システインに富んだ外膜タンパク質 (OMP)、OMP2、OMP3、多形OMP (POMP)、肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*) のアデノシンリリン酸/アデノシン三リン酸転位酵素、ポリンBタンパク質 (PorB)、およびCT521からなる群から選択される。

10

【0165】

本発明から明らかなように、感染源は変動し得る。本発明の一実施形態では、抗原は、固定上鞭毛型、固定錐鞭毛型、破壊上鞭毛型、破壊錐鞭毛型、上鞭毛型からの精製した抗原性画分、上鞭毛型からの半精製した抗原性画分、錐鞭毛型排出-分泌抗原 (TESA)、優性可変抗原型 (VAT)、可変表面糖タンパク質 (VSG)、トランスシアリダーゼ (TS)、たとえばTS13、無鞭毛型表面タンパク質-2 (ASP2)、KMP-11m、CRA、Ag30、JL8、TCR27、Ag1、JL7、H49、TCR39、PEP-2、Ag36、JL9、MAP、SAPA、TCNA、Ag13、TcD、B12、TcE、JL5、A13、1F8、Tc-24、Tc-28、Tc-40、Cy-hsp70、MR-HSP70、Grp-hsp78、CEA、CRP、SA85-1.1、FCaBP (鞭毛Ca²⁺結合タンパク質)、FL-160 (160kDaの鞭毛表面タンパク質) およびFRA (鞭毛反復抗原) からなる群から選択され、前記抗原はトリパノソーマ属 (*Trypanosoma*) に関連する。

20

【0166】

本発明の好ましい実施形態では、抗原は、固定上鞭毛型、固定錐鞭毛型、破壊上鞭毛型、破壊錐鞭毛型、上鞭毛型からの精製した抗原性画分、上鞭毛型からの半精製した抗原性画分、錐鞭毛型排出-分泌抗原 (TESA)、優性可変抗原型 (VAT)、可変表面糖タンパク質 (VSG)、トランスシアリダーゼ (TS)、たとえばTS13、無鞭毛型表面タンパク質-2 (ASP2)、FCaBP (鞭毛Ca²⁺結合タンパク質)、FL-160 (160kDaの鞭毛表面タンパク質) およびFRA (鞭毛反復抗原) からなる群から選択される。

30

【0167】

感染症が住血吸虫属 (*Schistosoma*) に関連している場合、抗原は、破壊住血吸虫卵、排出/分泌性糖タンパク質 (ES)、外皮 (TG) 糖タンパク質、可溶性卵抗原 (SEA)、マンソン住血吸虫 (*S. mansoni*) の可溶性抽出物 (SWAP)、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、RP26、Sj31、Sj32、パラミオシン、Sm62-IrV5、Sm37-SG3PDH、Sm28-GST、Sm14-FABP、PR52-フィラミンPL45-ホスホグリセリン酸キナーゼ、PN18-シクロフィリン、MAP3、Sm23、MAP4、Sm28-TPI、Sm97、CAA、CCA、およびマンソン住血吸虫熱ショックタンパク質70からなる群から選択される。

40

【0168】

本発明の好ましい実施形態では、抗原は、排出/分泌性糖タンパク質 (ES)、外皮 (TG) 糖タンパク質、可溶性卵抗原 (SEA)、マンソン住血吸虫の可溶性抽出物 (SWAP)、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、およびRP26からなる群から選択される。

【0169】

リーシュマニア属 (*Leishmania*) に関して、抗原または少なくとも1つの抗原は、破壊前鞭毛型、リーシュマニン、rGBP、rORFF、rgp63、rK9、rK26、rK39、PN18-シクロフィリン、MAP3、Sm23、MAP4、Sm2

50

8 - T P I、S m 9 7、C A A、およびC C Aからなる群から選択される。

【0170】

実際、分析する種に特異的な任意の試験抗原が、本発明において有用な場合がある。

【0171】

本発明の一態様は、前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を使用して、癌または新生物または悪性腫瘍を検出する方法に関する。

【0172】

癌に関しては、試験抗原は、W T 1、M U C 1、L M P 2、H P V E 6、H P V E 7、E G F R v I I I、H e r 2、n e u、M A G E A 3、p 5 3 突然変異体および非突然変異体、N Y - E O S - 1、P S M A、G D 2、C E A、M e l a n A、M A R T 1、R a s - 突然変異体、g p 1 0 0、P R 1、B c r - a b 1、チロシナーゼ、生存、P S A、h T E R T、肉腫転位切断点 (s a r c o m a t r a n s l o c a t i o n b r e a k p o i n t)、E p h A 2、P A P、M L - I A P、A F P、E p C A M、E R G、N A 1 7、P A X 3、A L K、アンドロゲン受容体、サイクリンB 1、ポリシアル酸、N Y C N、T R P - 2、R h o C、G D 3、フコシルGM 1、メソテリン、P S C A、M A G E A 1、s L e (a)、C Y P 1 8 1、P L A C 1、G M 3、B O R I S、T n、G l o b o H、E T V 6 - A M L、N Y - B R - 1、R G S 5、S A R T 3、S T n、炭酸脱水酵素IX、P A X 5、O Y - T E S 1、精子タンパク質17、L C K、H M W M A A、精子線維鞘タンパク質、A K A P - 4、S S X 2、X A G E 1、B 7 H 3、レグマイン、T i e 2、P a g e 4、V E G F R 2、M A D - C T - 2ならびにF A Pからなる群から選択される。

10

20

【0173】

実際、癌、前癌または突然変異に特異的な任意の試験抗原が、本発明において癌を診断および監視するために有用な場合がある。

【0174】

別の好ましい実施形態では、様々な疾患からの様々な抗原を組み合わせ、個々の疾患について低い特異性であるが、「感染症」について高い感度であるスクリーニングツールを可能にすることができる。たとえば、兵士が任務中に曝露される微生物（たとえば、マラリア、結核、リーシュマニア、住血吸虫および/またはトリパノソーマ症）からの抗原のパレットを組み合わせるキットは、医者が様々な試験の代わりに1つの素早いスクリーニング試験を行うことを可能にする。

30

【0175】

別の好ましい実施形態では、様々な性行為感染症からの様々な抗原を組み合わせ、個々の疾患について低い特異性であるが、性行為感染症 (S T D) について高い感度であるスクリーニングツールを可能にすることができる。たとえば、親密な粘膜接触で感染症を伝播する微生物（たとえば、軟性下疳菌 (H a e m o p h i l u s d u c r e y i)、トラコーマ病原体 (C h l a m y d i a t r a c h o m a t i s)、クレブシエラ・グラヌロマトイス (K l e b s i e l l a g r a n u l o m a t i s)、淋菌 (N e i s s e r i a g o n o r r h o e a e)、梅毒トレポネマ (T r e p o n e m a p a l l i d u m)、紅色白癬菌 (T r i c h o p h y t o n r u b r u m)、カンジダ症、ヘルペス、B型肝炎ウイルス、H S V、H I V、H P V、M C V、恥毛ジラミ (P h t h i r i u s p u b i s)、ヒゼンダニ (S a r c o p t e s s c a b i e i)) からの抗原のパレットを組み合わせるキットは、医者が様々な試験の代わりに1つのスクリーニング試験を行うことを可能にする。そのような試験は、それだけには限定されないが性労働者などの、危険性を負う個体における、S T Dの素早いスクリーニングツールとして役割を果たすであろう。

40

【0176】

別の好ましい実施形態では、組み合わせたキットは、臓器に感染する様々な微生物（たとえば、骨盤炎症性疾患を引き起こすネセリア属 (N e s s e r i a) およびクラミジア属の種）からの抗原を含み得る、または一般的な症状を引き起こす感染性因子（たとえば

50

、カンピロバクター (campylobacter) および赤痢菌 (shigella) の感染症によって引き起こされる処置可能な下痢は、ウイルス、たとえばロタウイルスによって引き起こされる処置不能な下痢から区別することができる) からの抗原を含み得る。

【 0 1 7 7 】

試料

本発明の一実施形態は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を生じさせる方法を企図し、前記方法は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む試料を哺乳動物から提供するステップと、前記試料を、高温状態で、少なくとも1つの試験抗原と共にインキュベーションするステップと、前記試料における試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を決定するステップとを含む。

10

【 0 1 7 8 】

本発明の別の実施形態は、対象において試験抗原に特異的な媒介性免疫応答を生じさせる方法を企図し、前記方法は、前記対象から、少なくとも1つの試験抗原による刺激の後に免疫シグナル伝達分子を産生することができる免疫系の細胞を含む試料を採取するステップと、前記試料を高温温度で前記少なくとも1つの試験抗原と共にインキュベーションし、その後、少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のレベルの存在または上昇を測定するステップであって、前記免疫シグナル伝達分子の存在またはレベルが、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を開始させる前記対象の能力の指標であるステップとを含む。

20

【 0 1 7 9 】

一実施形態では、試料は、全血、または血液、胸膜液、気管支液、組織生検、腹水、および/もしくは脳脊髄液に由来する細胞に由来する。

【 0 1 8 0 】

好ましい実施形態では、試料は血液に由来する。

【 0 1 8 1 】

特に好ましい実施形態では、試料は、末梢血単核球 (P B M C)、T細胞、C D 4 T細胞、C D 8 T細胞、ガンマ・デルタT細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞およびNK細胞からなる群から選択される細胞を含む。

【 0 1 8 2 】

好都合には、試料が全血である場合、採血チューブを、抗凝固剤 (たとえばヘパリン) および任意選択で免疫変調剤および任意選択で栄養素を用いて処理する。全血が好ましく、最も好都合な試料であるにもかかわらず、本発明は、それだけには限定されないが、胸膜液、腹水、リンパ液、脊髄または大脳液、組織液、ならびに鼻汁および肺液を含めた呼吸器の液などの、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含有する他の試料にまで及ぶ。

30

【 0 1 8 3 】

「全血」への言及には、組織培養物、培地、試薬、賦形剤などによって希釈されていない全血が含まれる。一実施形態では、用語「全血」には、少なくとも10体積%の全血を含むアッセイ試料 (すなわち反応混合物) が含まれる。用語「少なくとも10体積%」には、反応混合物の全アッセイ体積の10、11、12、13、14、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、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99および100体積%の血液量が含まれる。「全血」を含む試料から逸脱せずに、培養培地、酵素、免疫変調剤、賦形剤、抗原などの追加の薬剤を加え得る。

40

【 0 1 8 4 】

したがって、一実施形態では、本発明は、試料が、全血、または血液、胸膜液、気管支

50

液、組織生検、腹水、および/もしくは脳脊髄液に由来する細胞である方法に関する。

【0185】

したがって、別の実施形態では、本発明は、試料が、末梢単核細胞、T細胞、CD4 T細胞、CD8 T細胞、ガンマ・デルタT細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞およびNK細胞からなる群から選択される細胞を含む方法に関する。

【0186】

一実施形態では、試料は、抗原、マイトジェンまたは「nil」がそれ中に存在する3つの適切な容器中に採取し得る全血である。別の実施形態では、抗原、マイトジェンまたは「nil」は、試料、たとえば全血を含有するアリコートに後で加えることができる。

【0187】

別の実施形態では、試料は、抗原、マイトジェンもしくは「nil」を含有する採取チューブ中で採取し得る全血であるか、または、抗原、マイトジェンもしくはnilを加える全血のアリコートであり得る。

【0188】

好ましい実施形態では、試料は、乾燥させた試験抗原および任意選択で細胞に栄養素を提供する物質（たとえば炭水化物の形態）および任意選択で免疫変調剤を用いてコーティングした、空にしたチューブ内に採取した全血である。

【0189】

別の好ましい実施形態では、試料は、直径約3~4mmの毛細管内に採取する。

【0190】

一般に、血液は、抗凝固剤（好ましくはヘパリン、またはたとえばクエン酸塩もしくはEDTA）の存在下で維持する。抗凝固剤は、血液を加える際に採血チューブ内に存在する。採血チューブの使用が好ましいが、標準の自動実験室システムに適合性がある必要はなく、これらは大スケールおよびランダムアクセスサンプリングにおける分析を受け入れ易い。また、採血チューブは、取扱いの費用を最小限にし、実験室での全血および血漿への曝露を低下させ、それにより、実験室の人員が、それだけには限定されないがヒト免疫不全ウイルスなどの病原性因子にかかる危険性を低下させる。

【0191】

全血のアリコートは、10 μ L~4000 μ Lの範囲の体積、たとえば、それだけには限定されないが、10 μ L、20 μ L、30 μ L、40 μ L、50 μ L、60 μ L、70 μ L、80 μ L、90 μ L、100 μ L、200 μ L、300 μ L、400 μ L、500 μ L、501 μ L、525 μ L、550 μ L、600 μ L、700 μ L、800 μ L、900 μ L、1000 μ L、1100 μ L、1200 μ L、1300 μ L、1400 μ L、1500 μ L、1600 μ L、1700 μ L、1800 μ L、1900 μ L、2000 μ L、2100 μ L、2200 μ L、2300 μ L、2400 μ L、2500 μ L、2600 μ L、2700 μ L、2800 μ L、2900 μ Lまたは3000 μ Lであり得る。

【0192】

試料は、チューブ、組織培養ウェルまたは他の容器中でインキュベーションすることができ、抗原、マイトジェンおよび「nil」は関連する濃度で加えることができる。

【0193】

採血チューブにはvacutainerチューブまたは別の同様の容器が含まれるが、血液は開口チューブまたは毛細管内に直接採血することもできる。

【0194】

高温状態でのインキュベーション

細胞媒介性免疫系の細胞は、対象から採血してから長時間の後、全血中の細胞媒介性免疫応答を開始させる能力を失う。応答は、血液試料が、それだけには限定されないが摂氏10~39の温度での保存などの細胞の生命を延長する様式で処理されていない場合、採血の24時間後にしばしば激しく低下しているか存在しない。

【0195】

一実施形態では、作業の軽減が、抗原を用いた試料の刺激を、医院、クリニック、外来

10

20

30

40

50

患者施設、獣医クリニックまたは農場などの看護現場で行うことを可能にする。抗原刺激が完了した後は、新鮮かつ活性のある細胞の必要性は存在しなくなる。IP-10およびサイトカインまたは免疫シグナル伝達分子などの他のバイオマーカーは血漿中で安定しており、したがって、試料を特別な条件または迅速な時間要件なしに、他の感染性疾患または他の疾患の診断に使用される標準の血漿試料と同様の様式で、保管、凍結または輸送することができる。

【0196】

インキュベーションステップは、5～144時間、より好ましくは5～120時間、さらにより好ましくは12～24時間またはその間の期間であり得る。したがって、本発明の一実施形態では、インキュベーション時間は、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、26時間、30時間、36時間、42時間、48時間、72時間、96時間、120時間、または144時間である。

10

【0197】

本発明では、インキュベーションステップは高温状態で行う。高温状態には、摂氏38～42の範囲の温度でのインキュベーションが含まれる。

【0198】

インキュベーションステップは、摂氏38～42の範囲の温度で行うことができる。したがって、本発明の一実施形態では、インキュベーション温度は、摂氏38、摂氏38.1、摂氏38.2、摂氏38.3、摂氏38.4、摂氏38.5、摂氏38.6、摂氏38.7、摂氏38.8、摂氏38.9、摂氏39.0、摂氏39.1、摂氏39.2、摂氏39.3、摂氏39.4、摂氏39.5、摂氏39.6、摂氏39.7、摂氏39.8、摂氏39.9、摂氏40.0、摂氏40.1、摂氏40.2、摂氏40.3、摂氏40.4、摂氏40.5、摂氏40.6、摂氏40.7、摂氏40.8、摂氏40.9、摂氏41.0、摂氏41.2、摂氏41.3、摂氏41.4、摂氏41.5、摂氏41.6、摂氏41.7、摂氏41.8、摂氏41.9または摂氏42.0であり得る。

20

【0199】

より好ましい実施形態では、インキュベーション温度は摂氏38.5、摂氏39.0、摂氏39.5、摂氏40.0、または摂氏40.5である。

30

【0200】

インキュベーションステップは、固定されていない温度、それだけには限定されないが、摂氏38～42.0、より好ましくは38.0～41、より好ましくは38.2～40.7、より好ましくは摂氏38.5～40.5、さらにより好ましくは摂氏39.0～摂氏40.0で行うことができる。

【0201】

したがって、本発明の好ましい実施形態は、前記高温状態が摂氏38.5～41.0の温度でのインキュベーションであるものである。

【0202】

より好ましい実施形態は、前記高温状態が摂氏39～40の温度でのインキュベーションであるものである。

40

【0203】

試料を高温状態でインキュベーションするためのいくつかの方法が、精通した技術者に知られている。たとえば、インキュベーター、水浴および加熱ブロックを使用することが可能である。

【0204】

本発明の一実施形態は、細胞培養物に培養培地を加えた、希釈した試料の刺激を行うことを可能にする。

【0205】

50

本発明の別の実施形態は、不活性希釈液（たとえば生理食塩水）を細胞培養物に加えて試料を刺激することを可能にする。

【0206】

本発明では、試料を少なくとも1つの試験抗原とインキュベーションする際に、少なくとも1つの炭水化物が存在することが好ましいことを理解されたい。炭水化物の存在は、細胞培養物の成長を改善させる。

【0207】

したがって、本発明は、小さな炭水化物、たとえば単糖および二糖などの少なくとも1つの炭水化物が前記インキュベーションステップ中に存在することが好ましい方法にも関する。

【0208】

特に好ましい実施形態は、炭化水素および/またはグリカンの形態の糖をインキュベーションステップ中で加える方法である。

【0209】

最も好ましい実施形態では、加えた糖はデキストロースである。

【0210】

この炭水化物、たとえばデキストロースは、前記インキュベーションステップ中で加え得る。

【0211】

増大

本発明の一態様は、高温温度でのインキュベーションによる試験抗原の細胞媒介性免疫応答の増大に関する。

【0212】

増大は、高温状態でのインキュベーション後の少なくとも1つのシグナル伝達分子のレベルから参照レベルを減算することによって決定することができる。精通した技術者によって理解されるように、参照レベルは、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を含む前記試料を、少なくとも1つの試験抗原と共に37でインキュベーションすることによって決定することができる。

【0213】

好ましい実施形態では、試験抗原の細胞媒介性免疫応答の増大とは、少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のレベルを測定することによって決定することができる、試験抗原の細胞媒介性免疫応答の改善として理解されたい。

【0214】

好ましい実施形態では、この改善または増大とは、高温温度での前記試料のインキュベーション後の少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のレベルが、37でのインキュベーション後よりも高いこととして理解されたい。

【0215】

好ましい実施形態では、この改善または増大とは、高温温度での前記試料のインキュベーション後の少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子の規模が、37でのインキュベーション後よりも高いこととして理解されたい。

【0216】

好ましい実施形態では、この改善または増大とは、高温温度での前記試料のインキュベーション後の少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子の分子数（たとえば $\mu\text{g}/\text{ml}$ または mol/ml を使用して測定可能）が、37でのインキュベーション後よりも高いこととして理解されたい。

【0217】

好ましい実施形態では、この改善または増大とは、高温温度での前記試料のインキュベーション後の少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子の分子濃度が、37でのインキュベーション後よりも高いこととして理解されたい。

【0218】

10

20

30

40

50

特に好ましい実施形態では、改善とは、高温温度での前記試料のインキュベーション後の少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子の絶対的レベルが、37℃でのインキュベーション後よりも高いこととして理解されたい。絶対的レベルとは、試料中で決定される少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のレベル、すなわち少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のバックグラウンドレベルを減算していないものとして理解されたい。

【0219】

別の好ましい実施形態では、改善とは、高温温度での前記試料のインキュベーション後の少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子の、少なくとも1つの免疫シグナル伝達分子のバックグラウンドレベルを減算した後のレベルが、37℃でのインキュベーション後よりも高いこととして理解されたい。

10

【0220】

特に好ましい実施形態では、改善とは、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の改善されたシグナル対ノイズ比(S/N比)として理解されたい。

【0221】

したがって、特に好ましい実施形態では、本発明は、前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の改善されたシグナル対ノイズ比を生じる方法に関する。これは実施例7中に例示されている。

【0222】

一般に、用語シグナル対ノイズ比とは、所望のシグナルのレベル(この場合は免疫シグナル伝達分子のレベルによって測定した試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答/試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答から生じる免疫シグナル伝達分子のレベル)をバックグラウンドノイズのレベル(無刺激の試料中に存在する前記免疫シグナル伝達分子のレベル)と比較する。比が高ければ高いほど、バックグラウンド「ノイズ」は突出しない。試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答の改善されたシグナル対ノイズ比は、免疫シグナル伝達分子のバックグラウンドレベルを下げることによって、および/または試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答のレベルを増加させることによって、達成することができる。

20

【0223】

バックグラウンドレベルは、無刺激の試料(試験抗原と共にインキュベーションする試料と同一)中の免疫シグナル伝達分子のレベルを測定することによって決定される。

【0224】

シグナル対ノイズ比は、刺激した試料中の免疫シグナル伝達分子のレベルを無刺激の試料中の前記免疫シグナル伝達分子のレベルで除算することによって決定することができる。

30

【0225】

高温温度のインキュベーションによる改善されたシグナル対ノイズ比は、試料および特異的試験抗原または少なくとも1つの特異的試験抗原のシグナル対ノイズ比を、摂氏37℃および高温温度、たとえば摂氏39℃の両方で決定することによって、決定することができる。

【0226】

改善されたシグナル対ノイズレベルとは、前記試験抗原について摂氏37℃でおよび前記試験抗原について摂氏39℃などの高温温度で決定されたシグナル対ノイズ比を比較した際に、シグナル対ノイズ比が増加している場合として理解されたい。したがって、高温温度で達成されるシグナル対ノイズ比は、摂氏37℃のものよりも良好である。

40

【0227】

相乗効果

相乗作用とは、最終結果のための、異なる実体の有利な企業として定義される。すなわち、2つ以上の実体及び/または修飾間の相互作用)が、それぞれの実体単独での合計よりも全体的により良好な結果を生じる。本発明に従って、かつ実施例中に実証されているように、高温インキュベーションは、加えた免疫変調剤と、対でおよびすべて一緒のどちらにおいても、相乗作用で作用する。

50

【0228】

参照およびカットオフレベル

当業者に一般に理解されるように、細胞媒介性免疫反応性のスクリーニング方法は、比較による意思決定方法である。どのような意思決定方法においても、目的の疾患もしくは状態に罹患している対象および/または目的の疾患、感染症、もしくは状態に罹患していない対象に基づく参照値が必要であり、本発明にはさらに、本明細書中に記載の高温領域の様々な温度レベルに対するそのような比較も必要である。

【0229】

カットオフレベルは、それだけには限定されないが、試験した特定の個体群などのいくつかの基準に基づいて調整することができる。たとえば、免疫不全を有する個体および活動性疾患へと進行する危険性が高い患者ではカットオフレベルを低く設定することができ、活動性疾患を発生する危険性が低い、それ以外は健康な個体群では、カットオフは高くてもよい。

10

【0230】

判別値とは、摂氏37の対照群または試料および高温状態での群または試料の両方におけるパラメータまたは複数のパラメータを測定して、判別値(複数可)を決定することによって決定された値である。判別値は受信者動作特性曲線(ROC曲線)を使用して決定することができる。この様式で決定された判別値は、将来の個々の実験における同じ実験設定に有効である。

【0231】

たとえばバイオマーカー濃度の測定は国際単位(IU)へと翻訳することができる。IUはバイオマーカーの生物活性に関連し、様々な測定方法間のベンチマークへの参照である。

20

【0232】

本発明の他の実施形態では、決定されたカットオフ値は、たとえば抗原で刺激されたIP-10濃度を非刺激の血漿濃度によって除算したものとして定義される刺激指数と組み合わせることができる。

【0233】

これらの分析物のレベルを測定するための既知の分析方法のうちの任意のものが本発明において機能するが、当業者には明らかなように、それぞれのマーカーで使用する分析方法は、その特定のマーカーの参照データを生成するために使用した方法と同じでなければならない。特定のマーカーまたはマーカーの組合せに新しい分析方法を使用した場合は、その方法を用いて開発したデータに基づく新しい参照データの組を生成しなければならない。

30

【0234】

多変量の判別分析および他の危険性評価は、市販のコンピュータプログラム統計的パッケージ、Statistical Analysis System(SAS Institute Inc.により製造および販売)上で、あるいは当業者に知られている他の多変量統計分析方法または他の統計的ソフトウェアパッケージもしくはスクリーニングソフトウェアによって行うことができる。

40

【0235】

当業者には明らかなように、上述の実施形態のうちの任意のものにおいて、陽性試験の危険性カットオフレベルを変化させること、または集団中の様々な部分群に適用され得る様々な演繹的危険性を使用することは、それぞれの患者の判別分析の結果を変化させる場合がある。

【0236】

本発明の文脈においては、用語「参照」とは、たとえば検量線などの、他の値または特徴をそれに対して比較することができる、量、品質または種類に関連する標準に関する。

【0237】

診断

50

一実施形態では、かつ上述のように、この方法は、感染症などの様々な免疫学的状態が疑われる対象の診断に使用し得る。診断に使用する場合、本発明による方法は、通常は臨床症状およびさらなる臨床検査を評価することによって達成される、感染症などの免疫学的状態の存在の決定を援助し得る。試験は、感染症の様々な段階、すなわち、どのような症状もない個体における最近遭遇した感染症、その感染症の症状を有さない個体における何年も前に遭遇した感染症、または感染症が原因の症状を患者が有する活動性の感染症を診断し得る。

【0238】

したがって、本発明は、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を開始させる対象の潜在性または能力を決定する方法に関する。本発明は、細胞媒介性免疫応答を生じさせることができる免疫系の細胞を、抗原性タンパク質/ペプチドを用いて、高温状態でならびに/またはIL-7および/もしくは抗IL-10の存在下で刺激した後に、免疫シグナル伝達分子、たとえばケモカインIP-10および/またはサイトカインIFN- γ を測定することに基づく、たとえば結核の感染症の検出を可能にする方法を提供する。

10

【0239】

したがって、本発明の特に好ましい実施形態は、前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を使用して、前記試験抗原を発現することができる微生物によって引き起こされた感染症を診断する方法に関する。

【0240】

記載した試験システムは、偽陰性試験結果および不確定試験結果の数を低下させ、摂氏37度でのインキュベーションステップを含む試験よりも感度が高い。したがって、本発明による方法は、試験および診断を改善させる。

20

【0241】

別の実施形態では、この方法は、結核が疑われる対象（たとえば、活動性、潜伏性または最近のTB感染症）、特に潜伏性から活動性の結核への進行の危険性が増加した患者、すなわち、免疫抑制医薬品（すなわちモノクローナル抗体処置（抗CD20抗体（たとえばリツキシマブ（著作権））もしくはTNF- α 遮断処置（たとえば、Remicade（著作権）、Enbrel（著作権）、Humira（著作権）））またはステロイドもしくは癌-化学療法を受けている患者、あるいは、免疫抑制状態（たとえば、HIV感染症、癌、IDDMもしくは非インスリン依存性真性糖尿病（NIDDM）、自己免疫状態、栄養失調、高齢、静脈内薬物使用（IVDU）または遺伝性免疫障害）を患っている患者、および最近感染した個体の診断に使用し得る。実際、標準の指針に従って、医療を開始する前に、これらの患者を活動性、潜伏性または最近のTBについてスクリーニングするべきである。

30

【0242】

現在では、TNF- α 遮断剤処置の候補である、またはHIV陽性である患者を、TSTまたは結核菌抗原に特異的なIFN- γ 試験のどちらかでスクリーニングすることが強く勧められている。しかし、研究により、これらの試験は上述した患者分類では信頼できないことが示されており、したがって、本方法は、偽陰性試験結果および不確定試験結果の数を低下させるため、より良好な選択肢である。

40

【0243】

別の実施形態では、本方法は、クラミジア属感染症（たとえば、泌尿生殖器の感染症、骨盤の感染症および/または眼の感染症）が疑われる個体をスクリーニングするために使用し得る。

【0244】

したがって、本発明の方法は、感染性疾患の危険性が高い人、たとえば疾患の流行地域に滞在または旅行していた人のスクリーニングに適用可能であり得る。

【0245】

したがって、本発明の一実施形態では、感染性疾患は、マラリア、結核、髄膜炎、日本脳炎、コレラ、リーシュマニナ（Leishmania）、デングおよびポリオからな

50

る群から選択される。

【0246】

本発明の別の実施形態では、感染性疾患は、軟性下疳、クラミジア属感染症、淋病、鼠径リンパ肉芽腫、ウレアプラズマ・ウレアリチカム (*Ureaplasma urealyticum*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、梅毒トレポネーマ、B型肝炎、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス、軟属腫、恥毛ジラミ、ヒゼンダニおよび膾トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*) からなる性行為感染症から選択される。

【0247】

本発明のさらなる一実施形態では、感染性疾患は、処置可能な胃腸管系感染性因子、たとえば、赤痢菌、大腸菌 (*E. Coli*)、カンピロバクター、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) 細菌、クリプトスポリジウム・バルバム (*Cryptosporidium parvum*)、サルモネラ (*Salmonella*) 細菌およびマウスチフス菌 (*Salmonella typhi*) 細菌からなる群から選択される。

10

【0248】

本発明のさらなる一実施形態では、感染性疾患は、抗生物質で処置可能でない胃腸管系感染性因子、たとえば、ロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルス、サボウイルス、およびアストロウイルスからなる群から選択される。

【0249】

本発明のさらなる実施形態では、感染性疾患は、たとえば血液バンクにおいてスクリーニングの対象となる血液関連疾患、すなわち、A型肝炎、E型肝炎、マラリア、シャガス病、パベシア症、リーシュマニア症、サル泡沫状ウイルス、クロイツフェルト-ヤコブ (*Creutzfeldt-Jacob*) 病 (*vCJD*)、クロイツフェルト-ヤコブ (*Creutzfeldt-Jakob*) 病 (*CJD*)、サイトメガロウイルス (*CMV*) およびエプスタイン-バーウイルスからなる群から選択される。

20

【0250】

本発明の一実施形態では、感染性疾患は、細菌性髄膜炎を引き起こすことができる細菌、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitides*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*) およびインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenza*) からなる群から選択される。

30

【0251】

したがって、特異的抗原の選択は、精通した技術者がたとえばマイコバクテリアの様々な種間を識別することを可能にするため、本発明の目的は、種に特異的な診断を作製することである。

【0252】

予後診断

一実施形態では、この方法は、感染症などの様々な免疫学的状態が診断された個体の予後診断を予測するために使用し得る。患者の予後診断で使用する場合、本発明による方法は、感染症などの免疫学的状態の過程および可能性の高い結果の予測を援助し、したがって、当業者が適切な処置方法を選択し、状態のための特定の処置の可能性の高い効果を評価することを支援し得る。

40

【0253】

監視

一実施形態では、この方法は、感染症を診断された個体を監視するために使用し得る。患者の監視で使用する場合、本発明による方法は、処置中およびその終了後に処置の有効性を評価すること、たとえば感染症の再発の可能性を監視および予測することを援助し得る。

50

【 0 2 5 4 】

本発明によって治療の有効性を監視する可能性は、以下の理由で特に関連性がある（結核菌の感染症を例として使用）：

a) 痰の顕微鏡観察、マイコバクテリア培養、X線または他の方法などの現在利用可能な方法の代わりに、単純な採血によって容易に行われる、

b) 痰の顕微鏡観察、マイコバクテリア培養、X線または他の方法と比較して、より再現性がある、

c) 痰の顕微鏡観察、マイコバクテリア培養、X線または他の方法、たとえば肺外の結核が疑われる場合の生検に関連する侵襲性の手術手順、もしくは患者が痰陰性の場合には気管支鏡検査と比較して安価である、

d) R D 1 重複ペプチドに基づく古典的な 3 7 のアッセイと比較して、偽陰性試験結果および不確定試験結果の数を低下させ、より感度が高い、

e) 他の免疫アッセイは感染症の有無のみを判別するが、これは活動性および潜伏性の結核を判別し得る。

【 0 2 5 5 】

スクリーニング

一実施形態では、本発明による方法はスクリーニング目的に使用する。すなわち、これは、I P - 1 0 のレベルを本発明に従って測定し、測定されたレベルを事前に指定されたレベルと関連させることによって、以前に関連する感染症（複数可）を診断されていない対象を評価するために使用し、それにより様々な感染症（たとえば結核菌の感染症）の存在または非存在が示される。別の実施形態では、本発明による方法はスクリーニング目的に使用する。すなわち、これは、I P - 1 0 のレベルを、本発明を示す事前に指定されたレベルに従って測定し、測定されたレベルを様々な感染症（たとえば結核菌の感染症）の存在または非存在と関連させることによって、以前に関連する感染症（複数可）を診断されていないが、潜伏性疾患の再活性化の危険性にある対象を評価するために使用する。

【 0 2 5 6 】

以前に述べたように、本発明は、少なくとも 2 つの感染性疾患を同時にスクリーニングする方法を開示する。

【 0 2 5 7 】

本発明の別の実施形態では、この方法は、血液ドナーからの血液を、それだけには限定されないがたとえば寄生生物またはウイルスによって引き起こされる感染症（複数可）などの様々な疾患についてスクリーニングするために使用することができる。

【 0 2 5 8 】

接触者追跡

好ましい実施形態では、本発明による方法は、結核菌などの様々な感染症に曝露された対象の診断に使用し得る。接触者追跡で使用する場合、本発明による方法は、結核菌の感染症などの感染症の存在の決定を援助し得る。

【 0 2 5 9 】

他の実施形態では、本発明による方法は、それだけには限定されないが、結核、コロナウイルス（たとえば重症獲得呼吸器症候群）、インフルエンザ、エボラまたはマールブルグウイルスなどの伝染性の高い感染症の大流行において、伝染性の症例に曝露された対象の診断に使用し得る。結核の場合：接触者追跡で使用する場合、本発明による方法は、通常は T S T または現在利用可能な I F N - 放出アッセイを評価することによって達成される、感染症の存在の決定を援助し得る。

【 0 2 6 0 】

強化症例発見 (Enhanced case finding)

好ましい実施形態では、本発明による方法は、感染症などの様々な疾患の診断に使用し得る。強化症例発見で使用する場合、本発明による方法は、それだけには限定されないが、そうでなければ感染症の微生物学的証拠の欠如（通常は臨床症状を評価することによって達成される）、処置に対する応答の欠如、および代替診断の欠如または痰培養などの時

10

20

30

40

50

間のかかるアッセイ（数週間）が原因で診断が困難である、顕微鏡観察陰性TBなどの感染症の存在の決定を援助し得る。

【0261】

有病率の研究

好ましい実施形態では、本発明による方法は、それだけには限定されないが、子供、HIV陽性移民、難民、医療従事者、学童、囚人、検査技師などの目的の集団における感染症などの、様々な免疫学的状態の有病率の研究に使用し得る。有病率の研究で使用する場合、本発明による方法は、通常はTSTによって達成する、集団における潜伏性および活動性のTBなどの感染症の存在の決定を援助し得る。

【0262】

研究目的

一実施形態では、本発明による方法は、マイコバクテリア属、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、リステリア属 (*Listeria*)、腸球菌、ナイセリア属 (*Neisseria*)、ビブリオ属 (*Vibrio*)、トレポネマ属 (*Treponema*) (梅毒)、ボレリア属 (*Borrelia*)、レプトスピラ属 (*Leptospirae*)、クラミジア属 (*Chlamydia*)、レトロウイルス (SIV、HIV-1およびHIV-2)、重症急性呼吸器症候群 (SARS) およびNL-63などのコロナウイルス、サイトメガロウイルス、ロタウイルス、メタニューモウイルス、呼吸器多核体ウイルス (RSV)、ポックスウイルス、エプスタイン (Epstein) バーウイルス、エンテロウイルス、モルビリウイルス、ラプトウイルス (狂犬病)、ルビウイルス (風疹)、フラビウイルス (デング、黄熱)、ヘルペスウイルス、水痘带状疱疹ウイルス (*Varicella-zoster*) ウイルス、CおよびB型肝炎、リーシュマニア属、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*)、トリパノソーマ、マラリア原虫 (*Plasmodium*) (熱帯熱マラリア原虫 (*falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*vivax*)、卵形マラリア原虫 (*ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*malaria*)、ニューモシスチス・カリニ (*pneumocystis carinii*) (PCP) および様々な線虫、吸虫からなる群から選択される微生物に由来する潜在的な新しい抗原をスクリーニングする場合に、研究所によって使用され得る。これらの抗原は、たとえば、脂質、多糖分子、タンパク質およびペプチドであることができる。実験室の研究目的で使用する場合、本発明による方法は、ワクチンおよび診断試験の開発に応用可能な、調査した抗原、タンパク質またはペプチドに対する免疫反応性の決定を援助し得る。

【0263】

たとえばペプチドなどのいくつかの抗原分子が、種に特異的または疾患に特異的として同定されているが、*in vivo*でT細胞反応性を誘導するその性能の決定は、感度の高いマーカーが欠如していることが原因で困難である。そのような候補抗原を用いた高温温度での刺激後に決定された免疫シグナル伝達分子 (複数可) のレベルを使用して、潜在的に興味深い新しい抗原または分子についてスクリーニングし、それを同定することができる。より詳細には、結核菌、トラコーマ病原体 (*Chlamydia trachomatis*)、HIV-1またはHCVに由来する抗原の場合、この方法は、これらの抗原の免疫原性を試験する場合に、すなわちたとえばワクチンを開発するためのT細胞の反応性の測度として、研究所によって使用され得る。

【0264】

本発明による決定に関連して本明細書中に記述した任意の特長および/または態様が、本発明による「診断」、「予後診断」、「監視すること」、「スクリーニング」、「研究目的」、「接触者追跡」、「強化症例発見」および「有病率の研究」にも同様に適用され、逆もそうであることを理解されたい。

【0265】

本発明は、試験および診断を改善させる方法を提供する。実施例中に見られるように、増加したインキュベーション温度は、最も低い応答者において増加した応答性をもたらす。これらの驚くべき発見は、高温インキュベーション方法は、そうでなければ「偽陰性」

10

20

30

40

50

である低応答者からの応答をブーストさせ、より少ない偽陰性試験結果をもたらし、したがって伝統的な摂氏37の方法と比較して感度を増加させることができることを示している。さらに、39 + IL7および抗IL-10では、非常に少ないドナーがマイトジェンに対して低い応答性を示す。これは、本発明者らが患者からの細胞を免疫抑制(HIV、癌、様々な種類の医療)応答性にすることができ、これが不確定試験結果の量を減少させ、したがって対費用効果を増加させることを示すため、重要な発見である。

【0266】

ワクチン接種

本発明の一態様は、参照レベルを超える試験抗原依存性の免疫シグナル伝達分子の応答が、哺乳動物が、以前に抗原と遭遇している、または本明細書中で言及した任意の微生物に対するワクチン接種が原因で抗原と交差反応性を生じる他の抗原と以前に遭遇していることを示す方法に関する。

10

【0267】

生きていない物質に基づくワクチンに対する応答は、低いレベルの抗原に特異的な免疫シグナル伝達分子をもたらす場合があり、本方法は改善された免疫応答(免疫シグナル伝達分子のより高い放出またはより低いバックグラウンドレベルなど)をもたらすため、これを使用して、前臨床、臨床治験、および続いてルーチンの設定におけるワクチン応答を検出し得る。

【0268】

本発明の別の好ましい実施形態では、この方法は、ワクチンの効果の監視に有用である。本発明の教示に従って、ワクチン中に含まれる抗原を使用して、IP-10の応答を監視することによって、ワクチン接種の効果を決定することが可能である。そのような手段は、再ワクチン接種の必要性またはワクチンの潜在的な利点の可能性を評価する場合に重要である。

20

【0269】

したがって、本発明は、前記試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を使用してワクチン接種の応答を検出する方法にも関する。

【0270】

微生物

本発明によれば、感染症は、それだけには限定されないが、細菌、寄生生物、真菌、ウイルス、プリオン、および/またはウイロイドなどの微生物によって引き起こされ得る。

30

【0271】

現在好ましい実施形態では、微生物は、マイコバクテリア属(Mycobacteria)、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、リステリア属、腸球菌、ナイセリア属、ピブリオ属、トレポネマ属(梅毒)、ボレリア属、レプトスピラ属、クラミジア属、レトロウイルス(SIV、HIV-1、HIV-2)、サイトメガロウイルス、ポックスウイルス、エプスタイン(EBstein)パーウイルス、エンテロウイルス、モルビリウイルス、ラドウィルス(狂犬病)、ルビウイルス(風疹)、フラビウイルス(デング、黄熱)、ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、CおよびB型肝炎、リーシュマニア属、トキソプラズマ原虫、トリパノソーマ、マラリア原虫(熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫)、ニューモシスチス・カリニ(PCP)、コロナウイルス(たとえば重症獲得呼吸器症候群(SARS))、エボラまたはマーブルグおよび様々な線虫、吸虫からなる群から選択される。

40

【0272】

さらにより好ましい実施形態では、微生物は、マイコバクテリア属、リーシュマニア属、クラミジア属およびサイトメガロウイルスからなる群から選択される。

【0273】

感染症がマイコバクテリア属によって引き起こされているまたは引き起こされていた場合、前記マイコバクテリア属は、結核菌(M. tuberculosis)複合生物(結核菌(M. tuberculosis)、ウシ結核菌およびエム・アフリカヌム(M. a

50

f r i c a n u m))、および相違領域 (R D 1) が欠失していないマイコバクテリア属 (カンサシ菌、エム・ツルガイ、エム・マリヌム、エム・フラベセンス (M . f l a v e s c e n s)、エム・ガストリイ (M g a s t r i i)) またはヒトに病原性のあるマイコバクテリア属 (トリ結核菌、らい菌 (M . l e p r a) もしくは他の非結核性マイコバクテリア) に属する。

【 0 2 7 4 】

したがって、現在好ましい一実施形態では、マイコバクテリア属は結核菌 (M . t u b e r c u l o s i s) である。

【 0 2 7 5 】

結核

結核 (一般的に T B と略記される) とは、最も一般的には肺 (肺 T B) を冒すが、身体中のすべての他の器官、たとえば、中枢神経系 (髄膜炎)、リンパ系、循環系 (粟粒結核)、泌尿生殖器系、骨および関節も冒すことができる、細菌である結核菌 (M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s、M . t u b e r c u l o s i s) によって引き起こされる感染性疾患である。また、結核菌の感染症は無症候性のまま保たれる場合もあり、これは一般的に潜伏性、休眠中または無症候性の T B 感染症として知られる。この段階から、感染症は活動性疾患へと進行することができ、これは、多くの場合は免疫不全、たとえば H I V の同時感染症または免疫抑制性の処置によって引き起こされるものが原因である。

【 0 2 7 6 】

現在好ましい実施形態では、本発明は、結核の様々な、たとえば明確な提示、すなわち、活動性結核性疾患、活動性の顕微鏡観察陽性または顕微鏡観察陰性の T B 感染症、潜伏性結核感染症、および最近の結核感染症を診断および監視する方法に関する。

【 0 2 7 7 】

この方法は、結核菌の分泌タンパク質の選択されたペプチド配列に応答する抗原提示細胞 (たとえば単球 / マクロファージ) と相互作用する抗原に特異的な T リンパ球による、I P - 1 0 などの免疫シグナル伝達分子の産生の評価に基づく。これらのペプチド配列は、その免疫原性およびその特異性について選択されており、潜在的には他のペプチドも同様に使用することができる。

【 0 2 7 8 】

この方法は、活動性結核性疾患を診断するため、痰陽性の肺結核を有する患者と接触した健常者における最近の感染症を診断するため、潜伏感染を有する健常者を診断するため、肺のおよび肺外の結核の場合は処置に対する応答を監視するため、および潜伏感染と活動性結核病状とを判別するために使用することができる。

【 0 2 7 9 】

哺乳動物

「哺乳動物」または「対象」への言及には、ヒト、または霊長類、それだけには限定されないが、ヒツジ、ウシ、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ、臨床検査動物およびコンパニオン動物などの家畜動物を含めた非ヒト種が含まれる。したがって、本発明は、ヒトの医学において応用を有しており、また、家畜および獣医学ならびに野生生物の応用も有する。

【実施例】

【 0 2 8 0 】

以下の実施例では、試験抗原に特異的な細胞媒介性免疫応答を増大させるための、高温状態の使用ならびに / または I L 7 および抗 I L - 1 0 の存在を、結核菌からの抗原を用いた刺激を例として使用して実証する。

【 0 2 8 1 】

全般的な方法

ドナー

予備研究 (実施例 1) には、血液試料を、研究現場で採用した健康なドナー、およびピドゥビエ病院、感染性疾患科 (D e p a r t m e n t o f I n f e c t i o u s

10

20

30

40

50

Diseases, Hvidovre Hospital) の外来患者クリニックに通う、TB が疑われるまたはその処置を開始する患者から採取した。

【0282】

BCG ワクチン研究 (実施例 2 ~ 5 および 7) には、血液試料を、研究現場であるデンマークのビドゥビエ病院、感染性疾患科または臨床研究センター (Clinical Research Centre) の外来患者クリニックで採用した 35 人の健康なドナーから採取した。35 人のドナーを BCG ワクチン接種または BCG ワクチン非接種に分類し、デンマーク人の子供の BCG ワクチン接種は 1975 年に廃止されたため、ドナーが自身の BCG ワクチン接種状態を知っていない限りは、分類は出生年に従って行った。

【0283】

TB 診断研究 (実施例 6 ~ 7) には、血液を、デンマークのビドゥビエ病院、感染性疾患科の外来患者クリニックに通う、TB が疑われるまたはその処置を開始する患者から採取した。

【0284】

試薬および器材

BCG ワクチン研究には、TB10.4 ペプチドを抗原として使用し (JPT Peptide Technologies GmbH、ドイツ Berlin)、インゲンマメ (Phaseolus vulgaris) からのレクチンをマイトジェンとして使用した (PHA、Sigma-Aldrich Corp、米国ミズーリ州)。追加の刺激剤 (免疫変調剤) として、本発明者らは組換えヒト IL-7 (R&D Systems Inc.、米国 Minneapolis) およびヒトインターロイキン 10 に対するモノクローナル抗体 (抗 IL-10、MBL Intl.、米国マサチューセッツ州) を使用した。温度インキュベーションには、本発明者らはインキュベーター、水浴および加熱ブロックを使用した。

【0285】

TB 診断研究には、Quantiferon TB Gold In tube 採血チューブを使用した。これらは、TB 特異的抗原 (ESAT-6、CFP-10、TB7.7) を含有する抗原チューブ、PHA を含有するマイトジェンチューブ、および nil チューブからなる。BCG ワクチン研究および TB 診断研究には、37 でのインキュベーションにはインキュベーターを使用した一方で、39 でのインキュベーションにはインキュベーター内に入れた水浴を使用した。温度はそれぞれのインキュベーションのラウンド中に少なくとも 2 時間間隔で少なくとも 4 回確認し、0.2 を超える変動はなかった。

【0286】

バイオマーカー測定のための採血およびインキュベーション

TB 診断研究のために、血液をヘパリン処理したチューブ (BD Vacutainer Systems、英国 Plymouth) または Quantiferon 採血チューブ中に採取した。

【0287】

予備研究には、1 ml の血液を nunc cryotube (Thermo Fisher Scientific、デンマーク Roskilde) に移し、ここで本発明者らはインキュベーションを最適化するための一連のステップに従った。ステップ 1: PHA および TB10.4 の、それぞれ 0.16 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 0.04 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の滴定。ステップ 2: 3 回の連続的な試行における、様々な温度での試料のインキュベーション: i) 20、30、37、39、41 および 43、ii) 37、38、39、40、41 および 42 ならびに iii) 37.0、37.3、37.9、38.5、39.0、39.5 および 39.9 で、それぞれ 18 時間のインキュベーション。ステップ 3: 0、6、9、12、15、18、24 および 48 時間、それぞれ 37 および 39 での試料のインキュベーション。ステップ 4: IL-7 (2.0 ng/ml)、抗 IL-10 (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および IL-7 と抗 IL-10 の両方と共に、18 時間、

10

20

30

40

50

それぞれ37および39 で、かつそれぞれのチューブに2 mg/mlのデキストロースを加えた、試料のインキュベーション。IL-7および抗IL-10の濃度は文献から採用した[Feske、Clin Vacc Immunol、2008、Denis、Clin Vacc Immunol、2007]。

【0288】

BCGワクチン研究には、1 mlの血液をnunc cryotube (Thermo Fisher Scientific、デンマークRoskilde)に移し、関連する刺激剤を加えた。それぞれの試行について、3つの試料を異なる刺激剤と共に、すなわち、抗原チューブをTB10.4ペプチド懸濁液と共に、マイトジェンチューブをPHA懸濁液と共に、およびバックグラウンド測定用にnilチューブをPBSと共に、追加のサイトカインなしで、IL-7 (2.0 ng/ml)と共に、抗IL-10 (1.0 μg/ml)と共に、またはIL-7および抗IL-10の両方と共に、18時間、それぞれ37および39 でインキュベーションして、ドナーあたり合計24本チューブが得られた。デキストロースをすべてのチューブに2 mg/mlの濃度まで加えた。

10

【0289】

Quantiferon研究には、1 mlの血液をそれぞれの採血チューブ (nil、抗原およびマイトジェン)に移した。その後、これらを、追加の刺激剤なしで、またはIL-7 (2.0 ng/ml)および抗IL-10 (1.0 μg/ml)と共に、摂氏37または39 で18時間インキュベーションした。

20

【0290】

測定

予備およびBCGワクチンの研究には、IP-10の測定を血漿収集の直後に行い、ここで試料を摂氏-80 で凍結した。6カ月後、BCGワクチン研究試料を解凍し、IFN- の測定を行った。TB診断研究には、血漿をインキュベーションの直後に収集し、摂氏-80 で凍結した。IP-10およびIFN- の測定は6~8カ月後に同時に行った。IP-10の測定には、試料をアッセイ希釈剤で1:9に希釈し、サンドイッチELISAを使用して二つ組で2000 pg/mlから31.8 pg/mlまでの直線性を有する検量線を用いて実行した。手短に述べると、NUNC MaxiSorbプレートを、ヒトIP-10に特異的なマウスモノクローナルmAbで終夜コーティングした。プレートを洗浄し、10%のウシ血清アルブミンを含む緩衝液を使用して遮断した。その後、血漿試料を二つ組で加え、1時間、摂氏37 でインキュベーションした。その後、プレートを洗浄し、西洋ワサビ過酸化酵素とカップリングさせたマウス検出mAbを加え、摂氏37 で45分間インキュベーションさせた。その後、プレートをx7洗浄し、TMB基質を加えた。プレートを15分間展開させ、その後、1MのH2SO4を加えることによって反応を停止させた。市販のQuantiferon-TB Gold (QFT-IT) ELISAを使用してIFN- レベルを測定した。IFN- のレベルをより良好に定量するために、QFT-IT ELISAの検量線を延ばして、800~12.5 pg/mlの直線性を与えた。すべての他の側面は製造者の指示に従った。1 IUは50 pgのIFN- に等しい。

30

【0291】

提示したデータでは、別段に指定しない限りはバイオマーカーのバックグラウンドレベル (nil) を減算した (生の値)。バイオマーカーの抗原依存性レベルを「a」と示す一方で (すなわち a IFN- および a IP-10)、マイトジェン誘導性のバイオマーカーレベルを「m」と示す (すなわち m IFN- および m IP-10)。

40

【0292】

白血球のレベルおよび分画はビッドゥピエ病院の臨床検査室 (Clinical Laboratory) で測定した。

【0293】

統計分析。

データはSAS 9.2 (SAS Institute、米国ノースカロライナ州Car

50

y) を使用して分析した。どのパラメータも正規分布されていなかったため、すべての試験はノンパラメトリック試験を使用して行った(ウィルコクソン符号順位検定およびスピアマン相関試験)。相乗効果は、それぞれの刺激単独を加算した値よりも大きい、2つの刺激(抗IL-10、IL-7および温度)を合わせた効果として定義された。すべての試験は両側で行い、p値 0.05を有する結果が有意とみなされた。

【0294】

倫理的配慮。

研究を実施する許可は、コペンハーゲン自治体の倫理委員会から得た。すべての研究参加者は参加のインフォームドコンセントを書面で預け、いつでも研究から脱退することが自由であった。

【0295】

[実施例1]

(予備研究)

高温温度はIP-10およびIFN- の応答を増大させる。

【0296】

本発明者らは、インキュベーション温度を上昇することによってIP-10およびIFN- の応答を増大させることができるかどうかを調査した。

【0297】

結果

図1は、予備研究からの2人の代表的な個体を示すスパゲッティ図であり、これらの実験の発見を11人の追加の個体でも再現することができた。本発明者らは、シグナルは摂氏39.5までの温度で一貫してかつ有意に増加したことを見い出したが、より高い温度では応答の急減を観察した。

【0298】

結論として、高温状態でのインキュベーションは、摂氏37でのインキュベーションと比較して、BCGワクチン接種した個体からの全血をBCG特異的抗原で刺激した場合に、増加したIP-10およびIFN- の応答をもたらす。

【0299】

高温でのインキュベーションは、偽陰性および不確定試験結果の数を低下させ、したがって、抗原に特異的な刺激の後に誘導されたIP-10および/またはIFN- などのバイオマーカーの存在/レベルの決定に依存する試験の感度および対費用効果を改善させるための容易な方法として、大きな潜在性を有している。

【0300】

[実施例2]

(BCGワクチン研究)

全血を結核菌特異的抗原(TB10.4)で刺激することによって誘導した血漿IP-10のレベルを測定することによる、ドナーの非応答者および応答者への区分。

【0301】

合計35人のドナー、すなわち、16人のBCGワクチン接種し、したがってTB10.4抗原に応答する可能性の高いドナー、および19人のワクチン接種していない、TB10.4抗原に応答する可能性の低いドナーを試験した。全血を採血し、18時間、それぞれ摂氏37および摂氏39で、抗原TB10.4からのペプチドのカクテルと共にインキュベーションした。

【0302】

予備調整に基づいて、本発明者らは、標準の摂氏37のインキュベーションを新しい摂氏39のインキュベーションと比較することを選択した。本発明者らは、安定なシステムに関する概念証明のデータを望んでいたため、明らかに劣性の摂氏39~摂氏39.5を選択した。

【0303】

結果

10

20

30

40

50

本発明者らは、全血を34人の健康なドナーから採取した（静脈穿刺に失敗したため、1人のBCGワクチン接種したドナーを排除した）。TB10.4と共にインキュベーションした全血試料の血漿中のIP-10のレベルをインハウスELISAによって測定した（上述のように）。

【0304】

IP-10を測定した後、本発明者らは参加者を2つの群、すなわち、誰が*in vitro*免疫応答を生じさせることができるかおよびできないかによって定義した、応答者および非応答者に分割した（標準のインキュベーション温度37℃でインキュベーションした場合に、タンパク質TB10.4からのペプチドに対するIP-10産生 $>500\text{ pg/ml}$ を用いて、自由裁量で定義）（図2および表1を参照）

10

【0305】

【表1】

表1

	非応答者 (n=11)	応答者 (n=23)	P
年齢、中央値 (範囲)	30 (26~48)	39 (26~54)	0.09
WBC、中央値 (範囲)			
合計	6.83 (3.94~10.94)	6.06 (4.03~8.63)	0.24
好中球	3.56 (1.38~5.95)	3.13 (1.71~6.11)	0.39
リンパ球	2.07 (1.84~3.91)	1.92 (1.37~3.30)	0.05
単球	0.44 (0.30~0.85)	0.47 (0.23~0.82)	0.81
好酸球	0.13 (0.07~0.44)	0.09 (0.03~0.49)	0.17
好塩基球	0.02 (0.01~0.06)	0.03 (0.01~0.06)	0.57

20

30

【0306】

非応答者および応答者の間に、年齢にも白血球数にも有意な差異は存在しなかった。

【0307】

[実施例3]

IL-7および/または抗IL-10を用いたまたは用いない高温インキュベーションはIP-10の応答を改善させる。

40

【0308】

本発明者らは、上述の34人の応答者および非応答からの試料を試験することによって、IP-10の応答に対する高温インキュベーションの効果を妥当性確認した。

【0309】

次に、本発明者らは、インキュベーション中のサイトカインIL-7の存在が応答を改善させるかどうかを試験した。また、本発明者らは、系中の既知の主要な(cardinal)阻害剤を阻害すること(すなわち阻害剤を阻害すること)によって、阻害性サイトカインIL-10の遮断がIP-10の応答に影響を与えるかどうかを試験した。

【0310】

結果

50

図3 A ~ Dは、IP - 10の応答を8列で示す。最初の4列は摂氏37 でのインキュベーションを表し、最後の4列は摂氏39 でのインキュベーションを表す。研究参加者からの血液をアリコートへと分割し、すべての様々な培養条件に供した、すなわち、列を直接比較することができる。バックグラウンドレベル (n i l) を抗原およびマイトジェン応答から減算している。

【0311】

図3 Aは、非応答者 (n o n - r e s p .) における、バイオマーカーレベルに対する様々なインキュベーション条件の影響を示す。様々な培養条件間で応答性のわずかな有意な差異が見られたが、興味深いことに、非応答者のうちの2人が摂氏39 で応答するようになった。非応答者群の中でBCGワクチン接種した人は、現在使用されている方法では非応答者となるこの2人だけであり、また、この2人は、図2中の非応答者のうちで「最も高い」IP - 10シグナルを有する者でもあった。これらの驚くべき発見は、高温インキュベーション方法は、そうでなければ「偽陰性」である低応答者からの応答をブーストさせ、したがって、伝統的な摂氏37 の方法と比較して感度を増加させることができることを示している。

10

【0312】

図3 Bは応答者の結果を示す。摂氏37 と比較して摂氏39 でIP - 10の応答性の特筆すべき改善が見られる。IL - 7の添加、IL - 10の遮断、および特に両方の組合せが、IP - 10シグナルをさらに改善させる。したがって、非常に少数が摂氏39 で「低応答者」のままである。

20

【0313】

図3 Cでは、本発明者らは、インキュベーションの様々な改変に伴う増加したバックグラウンドIP - 10レベルの潜在的な問題を調査する。特に高温が実際に、系中でより高い度合のノイズをもたらすことは明らかであるが、このレベルは、応答者からの応答で見られる特筆すべき改善と比較して無視できる (軸スケールの差に注目されたい) 。

【0314】

図3 Dでは、本発明者らは、非特異的PHAマイトジェン刺激に対するIP - 10の応答を比較する。本発明者らは3 Bからの発見を再現しており、したがって、この発見が、特異的ペプチドで刺激した場合のみだけでなく、非特異的刺激でも存在することを実証している。

30

【0315】

したがって、34人の応答者および非応答者を試験する際、本発明者らは、実施例1でも観察されたように、摂氏39 での高温インキュベーションがIP - 10の応答を改善させることを見出した。

【0316】

グラフから、マイトジェンに対するIP - 10の応答性の増加は抗原刺激に対する応答性よりも低かったように見えるが、アッセイの上限濃度がIP - 10およびIFN - 7でそれぞれ20000 pg / mlおよび800 pg / mlであるため、これは人為結果 (a r t e f a c t) であり、したがってこれらの限界を超える濃度は不正確である。

【0317】

結論として、この発見は、高温インキュベーション方法が、放出されたIP - 10の規模を増加させ、偽陰性および不確定試験結果の数を低下させ、これにより伝統的な摂氏37 の方法と比較して感度を増加させることができることを示している。さらに、IL - 7の添加、IL - 10の遮断、および特に両方の組合せが、BCGワクチン接種した個体からの全血をBCG特異的抗原で刺激した場合に、IP - 10の応答を増加させる。

40

【0318】

[実施例4]

高温インキュベーションならびにIL - 7および/または抗IL - 10の存在がIFN - 7の応答を改善させる。

【0319】

50

本発明者らは、34人の応答者および非応答者からの試料を試験し、IL-7の添加またはIL-10の遮断がIFN- γ の応答を改善させるかどうかを分析することによって、IFN- γ の応答に対する高温インキュベーションの効果を実証確認した。

【0320】

結果

図4Aでは、IP-10非応答者はIFN- γ 非応答者でもあったことが見られる。本発明者らは、図3Aからの発見を、同じ2人のBCGワクチン接種した非応答者が39のインキュベーションによって急にTB-10.4抗原に反応したことで再現できたことに満足であった。

【0321】

図4Bは、TB10.4反応者のIFN- γ レベルに対するインキュベーション条件の効果を示しており、本発明者らは、IP-10で見られた特筆すべき改善がこのワクチンリコール試験システムにおいてIFN- γ についてそれほど明白でなかったという発見に驚いた。ノンパラメトリック分析によって分析した場合に、上昇した温度単独での顕著な改善は存在しなかったが、本発明者らは、増加したインキュベーション温度が、最も低い反応を有する反応者において増加した反応性をもたらしたことを見出した。

【0322】

図4Cは、摂氏39のインキュベーション温度が、顕著により低いIFN- γ のバックグラウンドレベルをもたらすことを例示している。興味深いことに、これは、抗原に特異的なIFN- γ の反応性の改善はIP-10ほど明白でないが、より低いバックグラウンドレベルが系中でより良好なシグナル対ノイズ比をもたらす可能性があることを示す、IP-10で見られるものとは逆の効果である(図5中に詳しく示す)。

【0323】

図4Dでは、本発明者らは非特異的PHAマイトジェン刺激に対するINF- γ の反応を比較し、この発見は図3Dでの発見に類似している。しかし、摂氏39でのインキュベーションが単独で反応を有意に増加させることは、注目すべきである。さらに、摂氏39+IL7および抗IL-10では、マイトジェンに対する反応性が低いドナーが非常に少数であることが見られる。

【0324】

したがって、34人の反応者および非反応者を試験した際、本発明者らは、摂氏39でのインキュベーションの、INF- γ の反応に対する同様の有益効果を見出した。

【0325】

グラフから、マイトジェンに対するINF- γ の反応性の増加は抗原刺激に対する反応性よりも低かったように見えるが、アッセイの上限濃度がIP-10およびIFN- γ でそれぞれ20000pg/mlおよび800pg/mlであるため、これは人為結果(artifact)であり、したがってこれらの限界を超える濃度は不正確である。

【0326】

結論として、高温状態でのインキュベーションは、全血をBCG特異的抗原で刺激した場合に、最も低い反応者において増加した反応性および減少したバックグラウンドレベルをもたらす。さらに、IL-7の添加およびIL-10の遮断はINF- γ シグナルを増大させた。したがって、非常に少数が摂氏39で「低反応者」のままである。

【0327】

したがって、本発明の一実施形態は、免疫抑制(HIV、癌、様々な種類の医療)を有する患者からの細胞を、摂氏39でのインキュベーションによって反応性にさせる方法に関する。これにより、これらの困難な患者群において、免疫診断試験のより良好な性能(すなわちより少ない不確定試験結果)がもたらされる。

【0328】

[実施例5]

IP-10およびINF- γ の産生に対する、高温インキュベーションならびにIL-7および/または抗IL-10の存在の相乗効果。

10

20

30

40

50

【0329】

すべての刺激を組み合わせることで、抗原およびマイトジェンの両方の刺激後のすべての他の組合せと比較して、IP-10およびIFN- γ の両方のより優れたレベルが与えられた。本発明者らは、高温インキュベーション（温度）と抗IL-10を添加する組合せを除いて、抗原およびマイトジェンの両方の刺激後に高温インキュベーションをIL-7および/または抗IL-10の添加と共に使用することの、IP-10産生に対する相乗効果を見出した（すべて $p < 0.05$ 、表2）。バックグラウンドIP-10レベルで観察される相乗効果は、刺激を適用した際の増加したバックグラウンドIP-10レベルが原因であった。IFN- γ では、相乗効果は、抗原刺激後に高温インキュベーションをIL-7および抗IL-10と一緒に使用した際に観察された。また、抗IL-10の添加を用いてまたは用いずに、IL-7を加え、高温インキュベーションを使用することは、バックグラウンドIFN- γ レベルを相乗的に下げた。

10

【0330】

本発明者らは、単球またはリンパ球数と、IP-10またはIFN- γ の抗原依存性またはマイトジェン誘導性の産生レベルとの間に、相関を見い出さなかった（データ示さず）。

【0331】

【表2】

表2：高体温インキュベーション（温度）と抗IL-10、IL-7ならびに抗IL-10およびIL-7の両方との間の相乗作用

20

	IP-10			IFN- γ		
	抗原 (応答者)	マイトジェン (すべて)	Nil (すべて)	抗原 (応答者)	マイトジェン (すべて)	Nil (すべて)
温度+抗IL-10	有 ($p=0.01$)	無 ($p=0.07$)	有 ($p=0.001$)	無 ($p=0.16$)	無 ($p=0.20$)	無 ($p=0.07$)
温度+IL-7	有 ($p=0.0016$)	有 ($p=0.0001$)	有 ($p=0.001$)	無 ($p=0.48$)	無 ($p=0.61$)	有 ($p < 0.0001$)
温度+抗IL-10+IL-7	有 ($p=0.0001$)	有 ($p=0.0001$)	有 ($p=0.001$)	有 ($p=0.082$)	無 ($p=0.48$)	有 ($p < 0.0001$)

30

【0332】

[実施例6]

高温インキュベーションは、TBを診断するためのTB特異的試験抗原に対するIFN- γ およびIP-10の両方の応答性を増加させる。

【0333】

その後、本発明者らは、IL-7の添加およびIL-10の遮断を用いたまたは用いない、摂氏39でのQuantiferon TB Gold In tube試験管のインキュベーション後のIFN- γ およびIP-10レベルを、それぞれ摂氏37での通常のインキュベーションと比較した。血液を、TBが疑われるまたはその処置を開始する、結核が疑われる9人の患者から採取した。血漿中のIP-10のレベルはインハウスELISAによって測定し（上述のように）、IFN- γ のレベルはQuantiferon

40

50

ON TB Gold ELISAを使用して測定した(上述のように)。

【0334】

結果

図5A～Cおよび6A～Cは、IP-10およびIFN- γ についてそれぞれIP-10の応答を4列で示す。最初の2列は摂氏37度でのインキュベーションを表し、後者はIL-7および抗IL-10を用いたまたは用いない、摂氏39度でのものをそれぞれ表す。バックグラウンドレベル(nil)を抗原およびマイトジェンの応答から減算している。

【0335】

図5Aおよび6Aでは、本発明者らは、インキュベーションの様々な変化に伴う増加したバックグラウンドレベルの潜在的な問題を調査する。様々なインキュベーション条件間でバックグラウンドIP-10レベルの有意な増加は見い出されなかった。興味深いことに、ワクチン特異的応答の発見と類似しているが、IFN- γ のバックグラウンドレベルは、摂氏39度でインキュベーションした場合により低かった。

【0336】

図5Bおよび6Bは、抗原チューブ中のIP-10およびIFN- γ のレベルをそれぞれ示す。特にIL-7を加え、IL-10を遮断した場合に、摂氏37度と比較して、摂氏39度でIP-10およびIFN- γ の両方におけるTB特異的抗原の応答性の特筆すべき改善が見られる。効果は、ワクチン特異的応答で見られる効果よりもさらに明白である(図3および4中)。したがって、非常に少数が摂氏39度で低または非応答者のままである。

【0337】

図5Cおよび6Cでは、本発明者らは、PHAマイトジェンチューブ中のIP-10およびIFN- γ の応答をそれぞれ比較する。本発明者らは5Bおよび6Bからの発見を再現しており、したがって、この発見が、特異的ペプチドで刺激した場合のみだけでなく、非特異的刺激でも存在することを実証している。

【0338】

したがって、本発明者らは、疑わしいTB患者をQuantiferon TB Gold In tube試験システムで試験した際、上記のワクチンリコールの実施例でも観察されたように、摂氏39度の高温インキュベーションがIP-10およびIFN- γ の応答をどちらも改善させたことを見出した。

【0339】

試験結果へと解釈した際、摂氏37度でインキュベーションした場合に、IL-7および抗IL-10を加えた場合でも、1人の患者が陰性(17.5pg/ml未満の抗原応答および25pg/mlを超えるマイトジェン応答)、2人が不確定なQuantiferon結果(17.5pg/ml未満の抗原応答および25pg/ml未満のマイトジェン応答)を有していた。quantiferon陰性結果を有する患者は、インキュベーション条件に関係なく陰性のままであった。最初はQuantiferon不確定結果を有する1人の患者が、摂氏39度でインキュベーションした際に、どちらのIFN- γ も非常に高レベルの陽性へと変換された。不確定のquantiferon結果を有する他方の患者は、抗原性刺激後に一貫して低いIFN- γ の応答を有するが摂氏39度のインキュベーション後にのみマイトジェン刺激に強く応答しており、摂氏39度のインキュベーション後にquantiferon陰性であるとして明らかとなった。これらの患者において同じパターンがIP-10でも見い出された。

【0340】

結論として、高温状態でのインキュベーションは、最も低い応答者においてでも、結核菌特異的抗原に対する増加したIP-10およびIFN- γ の応答性をもたらす。さらに、これは、全血を結核菌に特異的な抗原で刺激した場合にもバックグラウンドIFN- γ レベルを減少させた。IL-7の添加およびIL-10の遮断は、IP-10およびIFN- γ の両方のレベルを増大させた。したがって、非常に少数が摂氏39度で「低応答者

10

20

30

40

50

」のままである。

【0341】

これらの発見は、高温インキュベーション方法が偽陰性および不確定試験結果の数を低下させ、それにより伝統的な摂氏37の方法と比較して感度を増加させることができることを示している。この方法はワクチン応答および抗原に特異的な刺激に基づく診断試験について例示されており、抗原の特異性を変化させることによって、それだけには限定されないが癌の診断学および癌の監視などの他の指標にも拡張することができる。

【0342】

[実施例7]

この方法は、nilと抗原との間の分離を改善させ、これにより抗原特異的応答のシグナル対ノイズ比を改善させる。

10

【0343】

なぜ本方法がIFN- γ の診断的情報を改善させるかをより良好に例示するために、すべての様々な培養条件について、ワクチン特異的抗原刺激後に、抗原およびマイトジェンの生の値をnilと比較してプロットした(図7)。nilと抗原との間のより良好な分離は、より良好なシグナル対ノイズを意味する。摂氏39 + IL-7 + 抗IL-10のカクテルが、より高い抗原応答およびより低いnil応答、したがってnilと抗原との間の完璧な分離をもたらすことは、明らかである。

【0344】

改善された分離を完全に理解するために、マイトジェンおよび結核菌に特異的な(ESAT6、CFP10、TB7.7)抗原を用いた刺激の両方について、応答比を計算した(すなわち刺激したレベルをnilレベルで除算した)。図8AにIFN- γ nil値を提示し、抗原およびマイトジェンを用いた応答比をそれぞれ8Bおよび8C中に提示する。図9AにIP-10 nil値を提示し、抗原およびマイトジェンを用いた応答比をそれぞれ9Bおよび9C中に提示する。ここでも、摂氏39 (任意選択でIL-7および抗IL-10カクテルを用いる)がより高い抗原応答およびより低いnil応答、したがってnilと抗原との間の完璧な分離をもたらすことは明らかである。

20

【0345】

参考文献

Waters WR、Nonnecke BJ、Olsen SC、Palmer M V。ウシ結核菌に感染した畜牛からの全血培養物におけるインターフェロン-ガンマの応答に対する、前培養の保持時間および温度の効果(Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon-gamma responses in whole blood cultures from Mycobacterium bovis-infected cattle)。Veterinary Microbiology、2007、119(2~4):277~282。

30

Robbe-Austerman S、Krull AC、Stabel JR。パラ結核を検出するためのガンマインターフェロンELISAの、全血に対する時間遅延、温度効果および陽性対照の評価(Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis)。Journal of Veterinary Medicine。2006、53(5):213~7。

40

Basu S、Srivastava PK。発熱様温度がhsp90の誘導を介して樹状細胞の成熟を誘導する(Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90)。International Immunology、2003、15(9):1053~61。

50

Huang YH、Haegerstrand A、Frostegard J。増殖性応答およびリンパ球活性に対する *in vitro* 高温の効果 (Effects of *in vitro* hyperthermia on proliferative responses and lymphocyte activity)。Clinical Experimental Immunology、1996、103:61~66。

Kappel M、Diamant M、Hansen MB、Klokke M、Pedersen BK。血液単核細胞部分組の増殖性応答、ならびにインターロイキン1および6、腫瘍壊死因子-アルファおよびインターフェロン-ガンマの検出に対する、*in vitro* 高温の効果 (Effects of *in vitro* hyperthermia on the proliferative response of blood mononuclear cell subsets, and detection of interleukins 1 and 6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma)。Immunology、1991年7月、73(3):304~8。

Schiller I、Waters WR、Vordermeier HM、Nonnecke B、Welsh M、Keck N、Whelan A、Sigafos T、Stamm C、Palmer M、Thacker T、Hardegger R、Marg-Haufe B、Raebler A、Oesch B。ウシ結核菌に感染した畜牛を検出するための全血ガンマインターフェロンアッセイの最適化 (Optimization of a whole-blood gamma interferon assay for detection of Mycobacterium bovis-infected cattle)。Clinical and Vaccine Immunology、2009、16(8):1196~1202。

Feske M、Nudelman RJ、Medina M、Lew J、Singh M、Couturier J、Graviss EA、Lewis DE。インターロイキン-7によるヒト抗原に特異的なメモリーT細胞応答の増強は結核の診断において正確さを改善させ得る (Enhancement of human antigen-specific memory T-cell responses by interleukin-7 may improve accuracy in diagnosing tuberculosis)。Clinical and Vaccine Immunology、2008、19:1616~22。

Denis M、Wedlock DN、McCarthy AR、Parle N A、Cockle PJ、Vordermeier HM、Hewinson RG、Buddle BM。畜牛におけるウシ結核菌の感染症を診断するための全血ガンマインターフェロンアッセイの感度の増強 (Enhancement of the sensitivity of the whole-blood gamma interferon assay for diagnosis of Mycobacterium bovis infections in cattle)。Clinical and Vaccine Immunology、2007、11:1483~9。

10

20

30

40

【 図 2 】

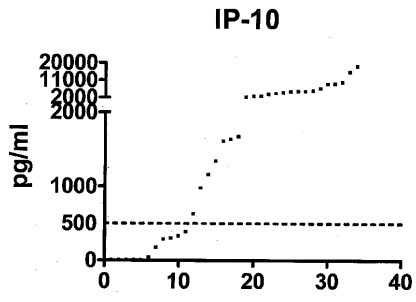
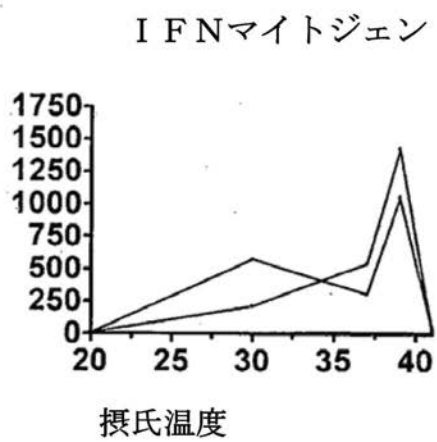
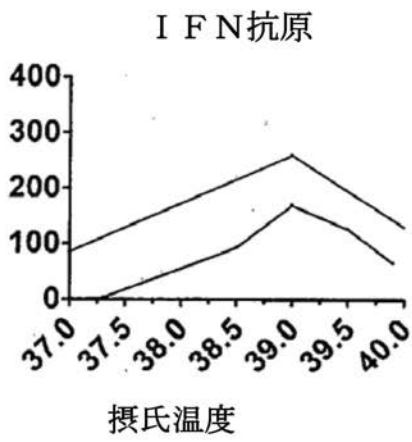
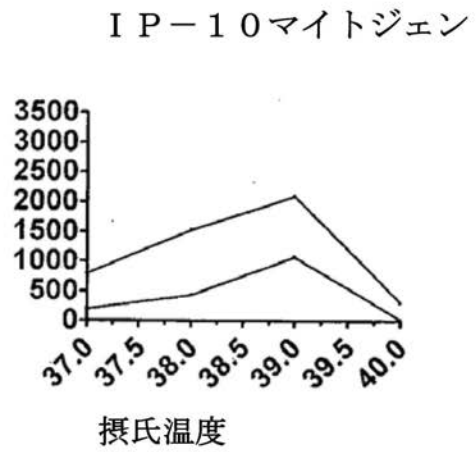
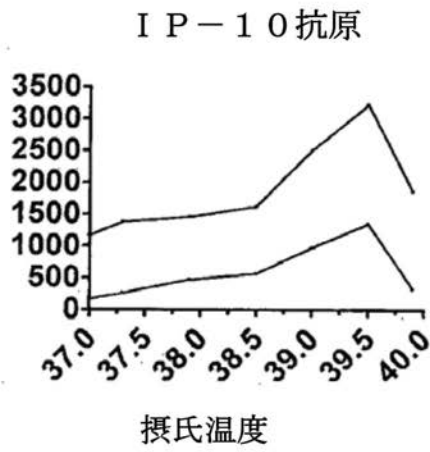


Fig. 2

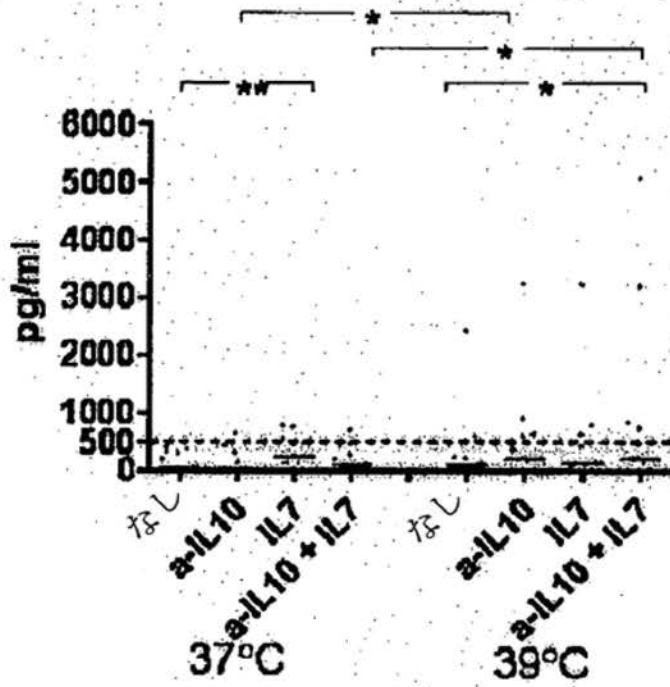
【図1】



【図3A - B】

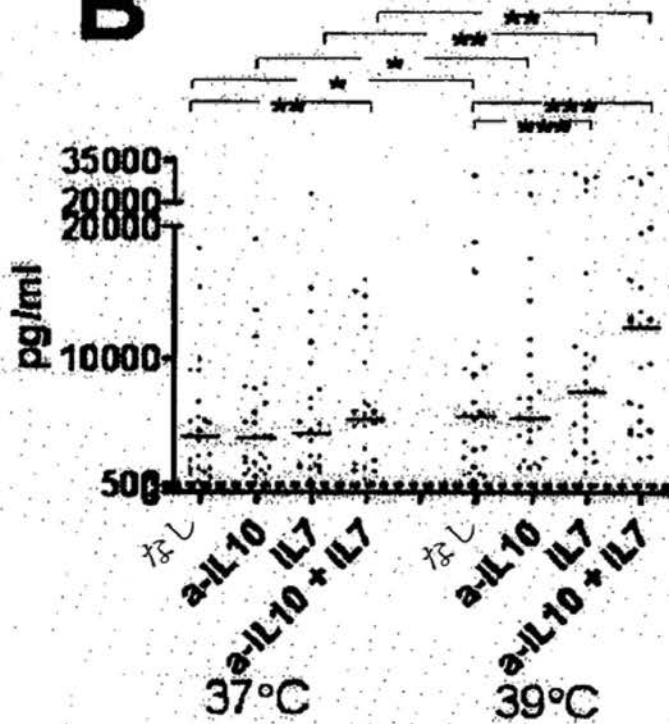
A

I P 1 0 抗原非応答者



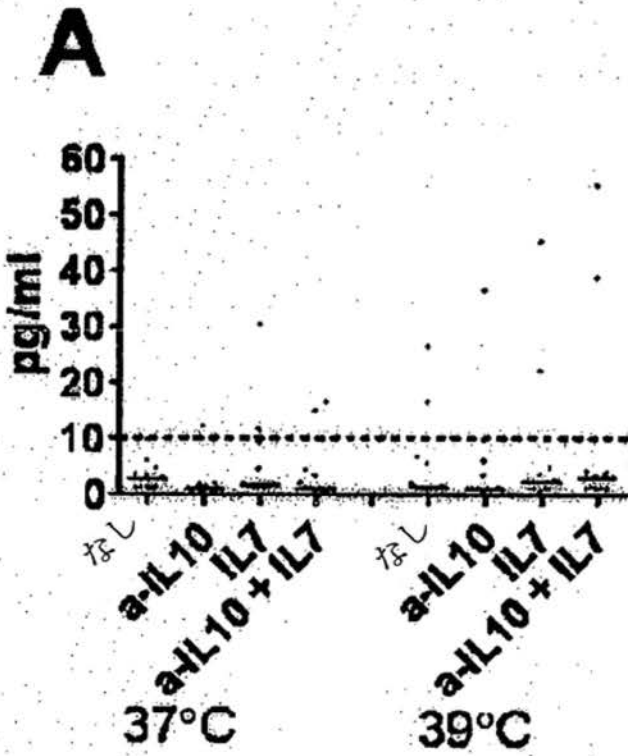
I P 1 0 抗原応答者

B

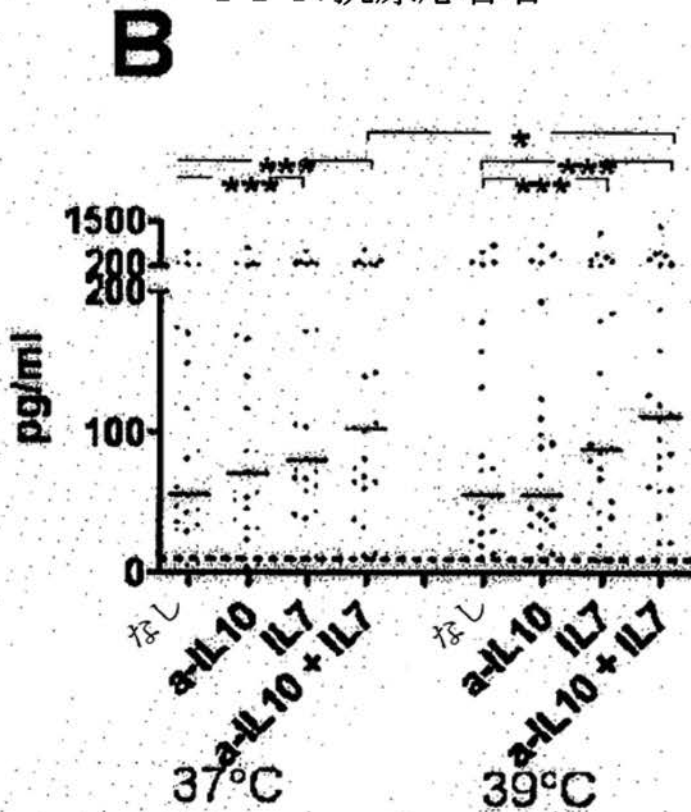


【図 4 A - B】

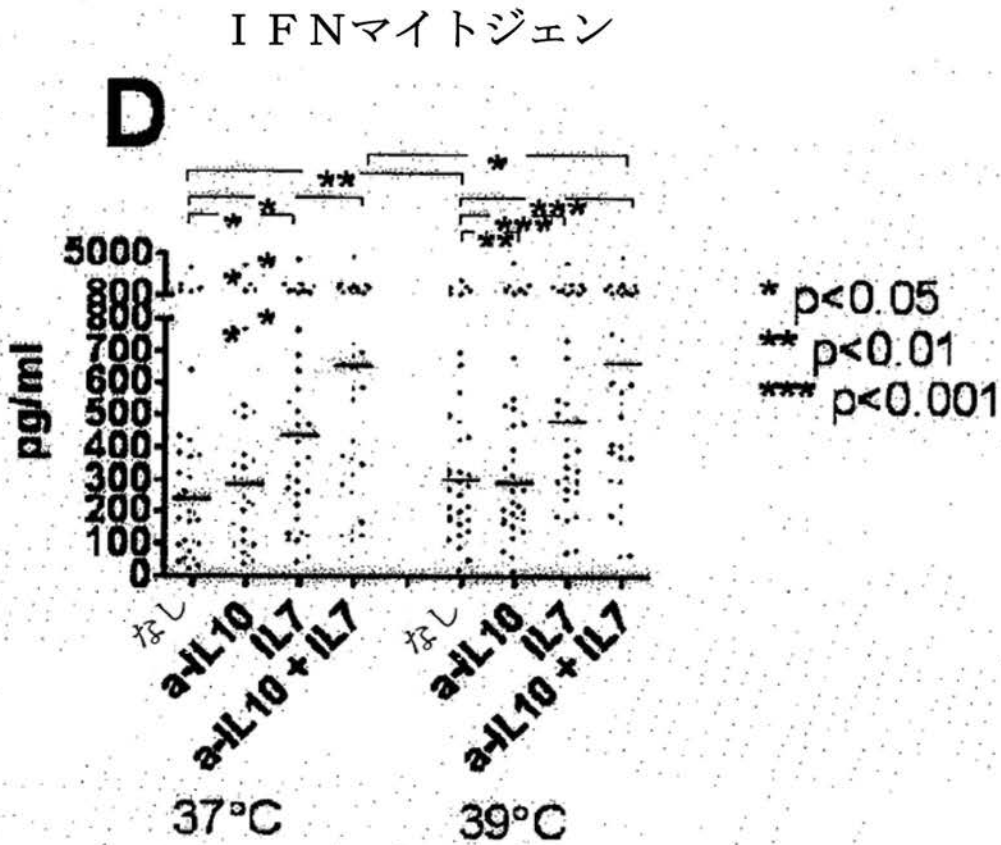
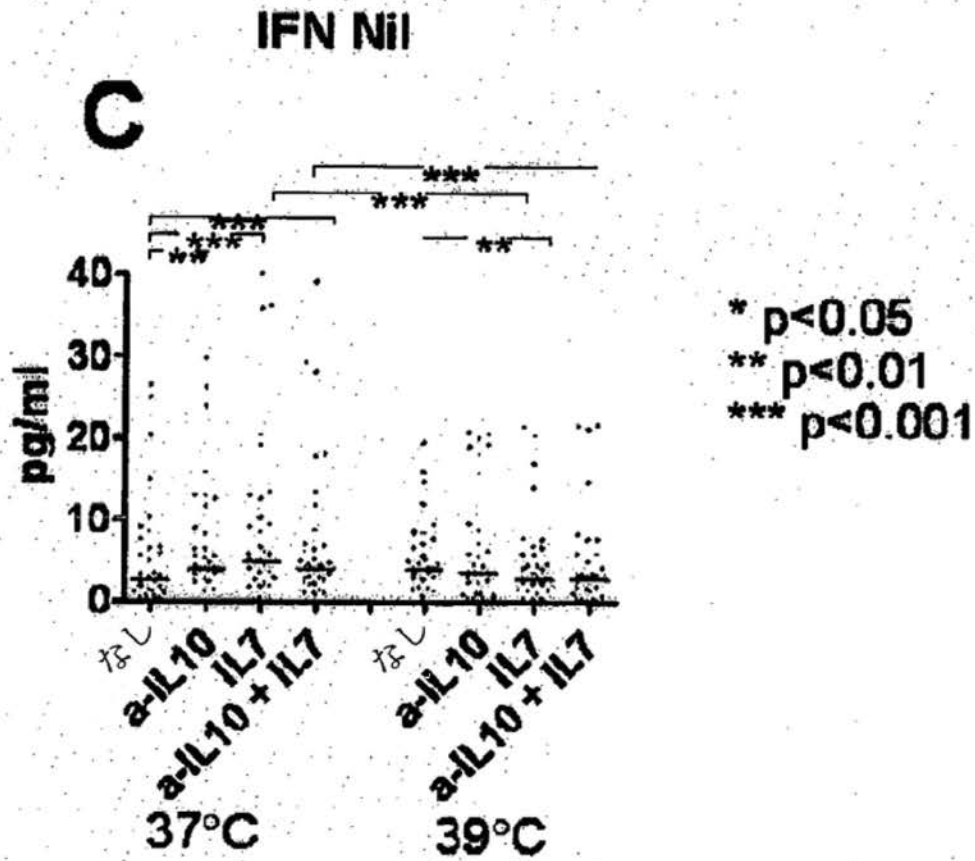
I F N 抗原非応答者



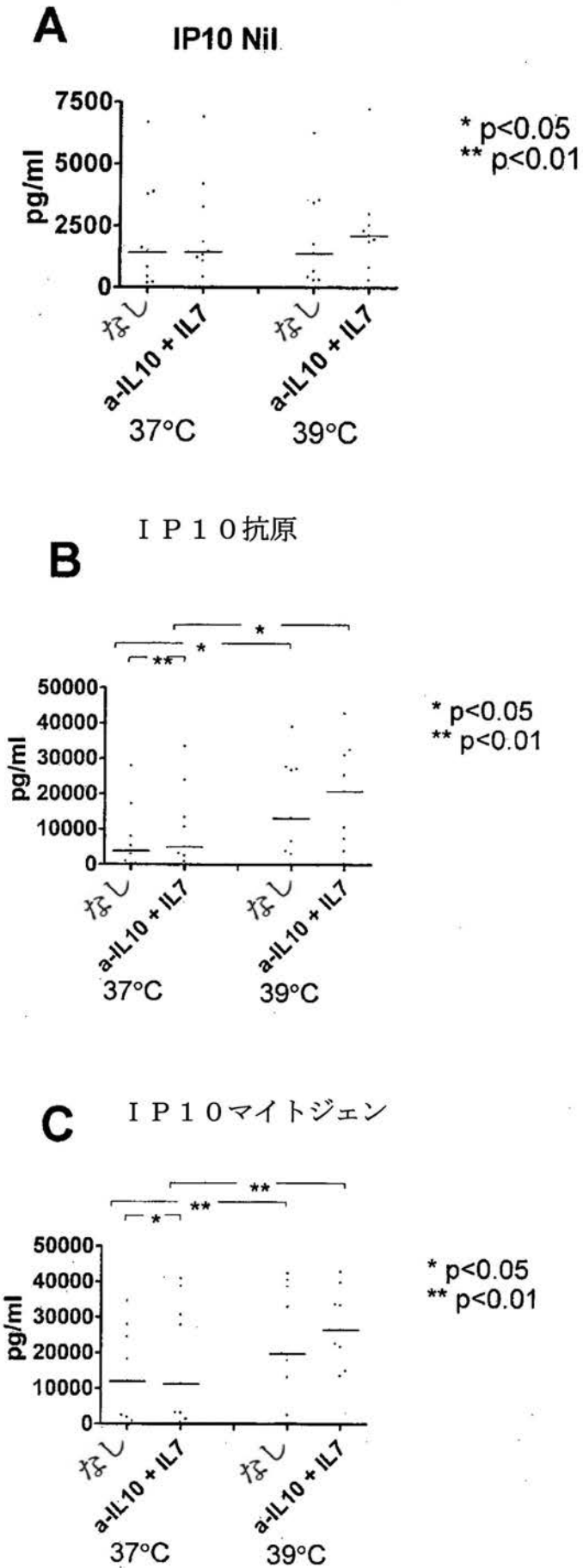
I F N 抗原応答者



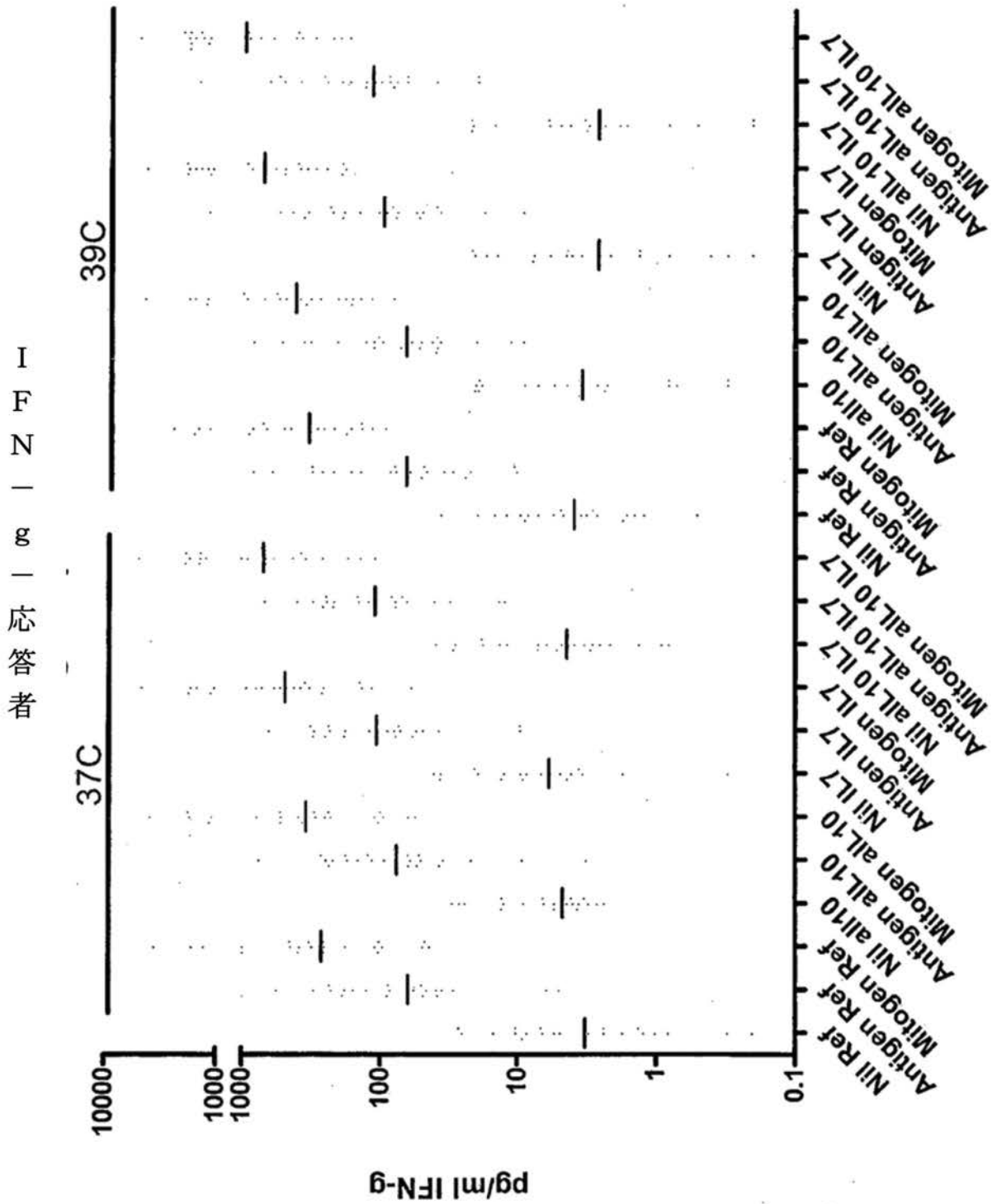
【 図 4 C - D 】



【 図 5 】

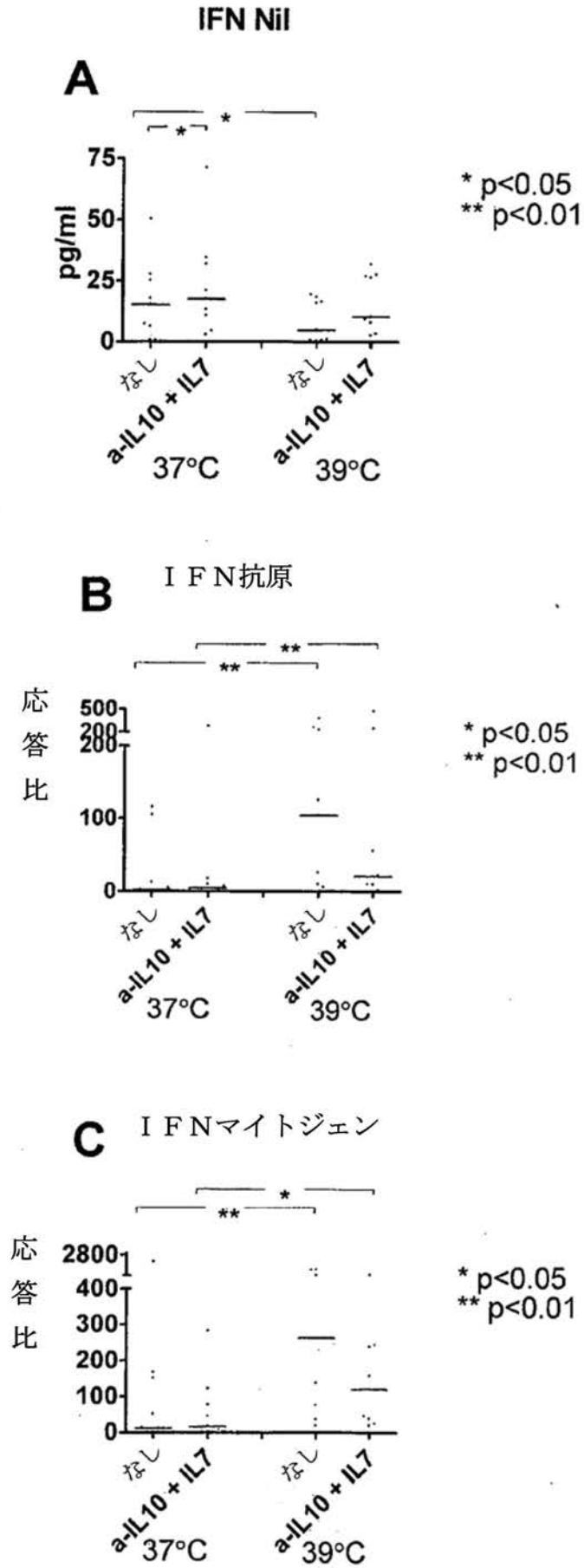


【 図 7 】

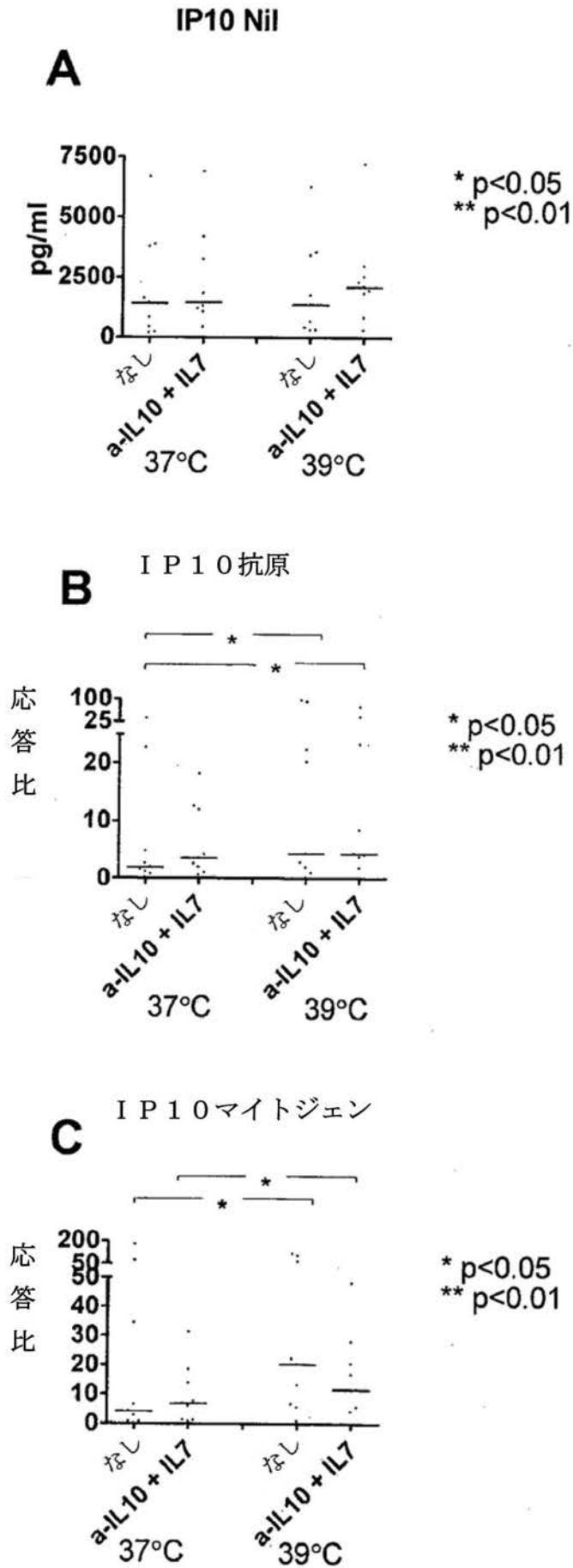


Antigen: 抗原
Mitogen: マイトジェン
Ref: 参照

【 図 8 】



【図9】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DK2011/000041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 G01N33/569 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHILLER IRENE ET AL: "Optimization of a Whole-Blood Gamma Interferon Assay for Detection of Mycobacterium bovis-Infected Cattle", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 16, no. 8, August 2009 (2009-08), pages 1196-1202, XP002625668, figure 3	1-22
X	WO 2008/052566 A1 (HVIDOVRE HOSPITAL [DK]; RUHWALD MORTEN [DK]; RAVN PERNILLE [DK]; EUGEN) 8 May 2008 (2008-05-08) line 8 - page 34, line 17; example 7 page 34, line 8 - line 17; example 7 ----- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 15 June 2011		Date of mailing of the international search report 28/06/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griesinger, Irina

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/DK2011/000041

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/028489 A2 (HVIDOVRE HOSPITAL [DK]; RUHWALD MORTEN [DK]; RAVN PEMILLE [DK]; EUGEN-) 13 March 2008 (2008-03-13) page 60, line 1; claim 1 -----	1-13, 15-22
X	BROCK I ET AL: "SPECIFIC T-CELL EPITOPES FOR IMMUNOASSAY-BASED DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS INFECTION", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 42, no. 6, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 2379-2387, XP009036517, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US ISSN: 0095-1137, DOI: 10.1128/JCM.42.6.2379-2387.2004 abstract right-hand column, paragraph 9 - page 2380 -----	1-13, 15-22
X	ANONYMOUS: "QuantiFERON-TB Gold Package Insert", [Online] January 2009 (2009-01), pages FP, 1-46, XP002625669, Cellestis home page Retrieved from the Internet: URL: http://www.cellestis.com/IRM/Company/howPage.aspx?CPID=1370 [retrieved on 2011-03-01] page 11 -----	1-13, 15-22
A	PAI M ET AL: "Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review", LANCET INFECTIOUS DISEASES, vol. 4, no. 12, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 761-776, XP004812171, ELSEVIER LTD, US ISSN: 1473-3099, DOI: 10.1016/S1473-3099(04)01206-X abstract -----	1-22
A	ZHANG H G ET AL: "Hyperthermia on immune regulation: A temperature's story", CANCER LETTERS, vol. 271, no. 2, 28 November 2008 (2008-11-28), pages 191-204, XP025507865, NEW YORK, NY, US ISSN: 0304-3835, DOI: 10.1016/J.CANLET.2008.05.026 [retrieved on 2008-07-01] figure 1 -----	1-22

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2011/000041

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008052566 A1	08-05-2008	NONE	
WO 2008028489 A2	13-03-2008	AT 504000 T	15-04-2011
		AU 2007294293 A1	13-03-2008
		CA 2662429 A1	13-03-2008
		CN 101523217 A	02-09-2009
		EA 200970246 A1	30-10-2009
		EP 2059816 A2	20-05-2009
		EP 2128612 A2	02-12-2009
		EP 2228651 A1	15-09-2010
		EP 2261658 A2	15-12-2010
		JP 2010502200 T	28-01-2010
		KR 20090074026 A	03-07-2009
		US 2010086950 A1	08-04-2010

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12

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

(72) 発明者 ルーワルト モルテン
 デンマーク国 ディーケー - 1 6 2 0 コペンハーゲン ヴェ ヴェステルプロゲード 5 0 第
 3

(72) 発明者 ユーゲン - オルセン イェスパー
 デンマーク国 ディーケー - 2 9 0 0 ヘラルプ ヴェトベントヴェージ 1 4

(72) 発明者 ラヴン ベルニレ
 デンマーク国 ディーケー - 2 0 0 0 フレデリクスベルク エスティー アザレアヴェージ 3
 8

(72) 発明者 アービー グロソス マルティーンヌ
 デンマーク国 ディーケー - 1 7 2 1 コペンハーゲン ヴェ ディボースゲード 4 8 1 . 3
 1

Fターム(参考) 4C085 AA03 BA04 BA15 BA78 EE01 HH20 LL18

专利名称(译)	在高温下增加invitro免疫识别		
公开(公告)号	JP2013532274A	公开(公告)日	2013-08-15
申请号	JP2013508372	申请日	2011-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	哈维德夫医院		
申请(专利权)人(译)	维ドーヴェ·医院		
[标]发明人	ルーワルトモルテン ユーゲンオルセンイエスパー ラヴンベルニレ アービーグロソスマルティーン		
发明人	ルーワルト モルテン ユーゲン-オルセン イェスパー ラヴン ペルニレ アービー グロソス マルティーン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/04 A61K39/02 A61K39/245 A61P31/04 A61P31/12		
CPC分类号	A61P31/04 A61P31/12 G01N33/5047 G01N33/574 G01N33/6863 G01N2333/35 G01N33/5306		
FI分类号	G01N33/53.P A61K39/04 A61K39/02 A61K39/245 A61P31/04 A61P31/12		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BA04 4C085/BA15 4C085/BA78 4C085/EE01 4C085/HH20 4C085/LL18		
代理人(译)	松崎隆		
优先权	2010161843 2010-05-04 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过在高温条件下孵育产生测试抗原特异性细胞介导的免疫应答的方法，更具体地，涉及通过在高温条件下孵育产生测试抗原特异性细胞介导的免疫应答的方法。并任选地加入IL-7和/或阻断IL-10。甚至更具体地，本发明提供了使用全血或其他合适的生物样品产生细胞介导的抗原反应的方法。该方法可用于许多传染病的免疫诊断，作为免疫活性的标志，以及用于检测T细胞对非自身抗原（即感染和疫苗）的反应。

