

(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2019-511722
(P2019-511722A)

(43) 公表日 平成31年4月25日(2019.4.25)

(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 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 H O 4 5
C O 7 K 14/05 (2006.01)	C O 7 K 14/05	
C O 7 K 14/11 (2006.01)	C O 7 K 14/11	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-551422 (P2018-551422)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月27日 (2017. 3. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年10月4日 (2018. 10. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2017/050855
 (87) 国際公開番号 W02017/168135
 (87) 国際公開日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)
 (31) 優先権主張番号 1605210.2
 (32) 優先日 平成28年3月29日 (2016. 3. 29)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

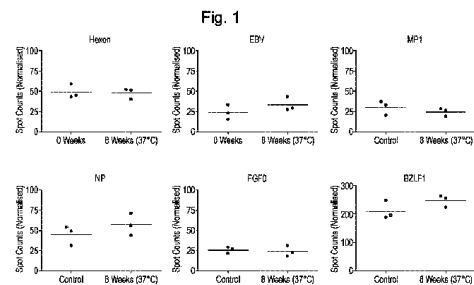
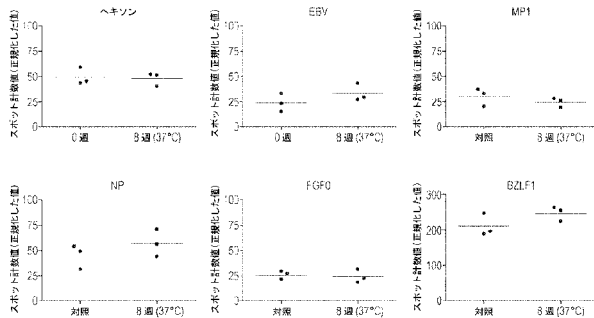
(71) 出願人 517049460
 オックスフォード イミュノテック リミ
 テッド
 英国 オーエックス14 4アールゼット
 オックスフォードジャー アビンドン
 ミルトン パーク イノベーション ドラ
 イブ 94シー
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対象の細胞媒介性免疫能を測定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、対象の細胞媒介性免疫能を測定するための方法に関する。この方法は、対象からの免疫細胞を含む試料に対して細胞媒介性免疫アッセイ法(CMI)を実施することを含む。この方法は、少なくとも3種のウイルス抗原に由来するペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することをさらに含む。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象からの免疫細胞を含む試料に対して細胞媒介性イムノアッセイ法(CMI)を実施することを含み、少なくとも3種のウイルス抗原に由来するペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含む、対象の細胞媒介性免疫能を測定するための方法。

【請求項 2】

免疫細胞が末梢血単核細胞(PBMC)である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

免疫細胞がT細胞である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

プールまたはペプチドが、少なくとも4種、5種、または6種のウイルス抗原に由来する、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 5】

ペプチドのプールが、3種、4種、または5種のウイルス抗原に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

ウイルス抗原が、ヒトアデノウイルス3のヘキソンタンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1(H3N2)、エプスタイン・バーウイルスのBZLF-1タンパク質、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0より選択される、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

ウイルス抗原が、ヒトアデノウイルス3のヘキソンタンパク質、呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0、およびインフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質からなる、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ウイルス抗原が、ヒトアデノウイルス3のヘキソンタンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ウイルス抗原が、ヒトアデノウイルス3のヘキソンタンパク質、エプスタイン・バーウイルスのトランスアクチベータータンパク質BZLF1、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

ウイルス抗原が、ヒトアデノウイルス3のヘキソンタンパク質、エプスタイン・バーウイルスのBALF-4、BMLF-1、BRLF-1、BZLF-1 EBNA-1、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-4、LMP-1、およびLMP-2タンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、ならびに呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ペプチドのプールが、1種または複数種のウイルス抗原の1つまたは複数の断片を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

ペプチドのプールが、1種または複数種のウイルス抗原のそれぞれの1つまたは複数の断片を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記断片が、前記断片の由来元であるウイルス抗原の配列の少なくとも80%を包含するタンパク質断片ライブラリーを形成する、請求項11~12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記断片が、前記断片の由来元であるウイルス抗原の配列全体を包含するタンパク質断

50

片ライブラリーを形成する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記断片が、重複している配列を有している、請求項11～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記配列において、11個のアミノ酸が重複している、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記断片が15アミノ酸長である、請求項11～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

付随する説明および/または図面のいずれか1つを参照して実質的に本明細書において説明した方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、対象の細胞媒介性免疫能を測定するための方法に関する。特に、この方法は、免疫細胞、例えば対象から得られた末梢血単核細胞(PBMC)を含む試料に対して細胞媒介性免疫アッセイ法を実施すること、および少なくとも3種のウイルス抗原に対する免疫応答を検出することを含む。

【背景技術】

20

【0002】

背景

免疫能は、適応(T細胞およびB細胞)免疫応答および先天(補体およびToll様受容体)免疫応答を含む正常に機能している免疫応答が個体に存在することに関する。免疫能、特に細胞媒介性免疫能を測るよう設計されたアッセイ法を用いて、抗原に対するドナーのT細胞応答をモニターすることができる。個体の免疫能、特に、細胞媒介性免疫応答を開始する一般能力を測るまたはモニターすることが望ましい。例えば、免疫能の評価は、移植、癌、自己免疫疾患、HIVを含むいくつかの疾患状態およびワクチン試験に関して、臨床医にとって有用である。

【0003】

30

免疫機能性の指標を提供するアッセイ法には、市販品のCylex ImmunknowおよびQFT Monitor(登録商標)が含まれる。また、混合リンパ球反応(MLR)を用いて、個体における免疫応答を評価することもできる。

【0004】

Cylex Immunknowは、PHAによる刺激後の全血からのATP産生を測る。これは、血液試料中に含まれる細胞の非特異的刺激に依拠している。免疫機能性を測るためのこのアッセイ法の有効性については、様々な結果が得られている(Lipschultz et al. (2014))。

【0005】

Quantiferon Monitor(登録商標)は、免疫機能の定性的指標および定量的指標の両方を与える(Quantiferon Monitor(登録商標)Pack Insert 2014)。特に、QFMは、先天性(TLR媒介性)抗原+適応性(TCR媒介性)抗原の組合せを用いて全血を刺激することを含む。抗原に反応して細胞から分泌されるIFN γ は、ELISAによって検出される。QFM読み取り値に基づいて、ドナーは次の3つのカテゴリーに分けられる:低(<15IU/mL IFN γ)、中(15~1000IU/mL IFN γ)、および高(1000IU/mL IFN γ)。

40

【0006】

混合リンパ球反応(MLR)アッセイ法は、T細胞機能性の予測因子として研究団体において使用されている(Manji et al. (1975))。特に、MLRアッセイ法は、PBMC試料を(増殖を防ぐように処置された)対照に由来するPBMCと混合すること、放射性色素を添加すること、および放射性色素の崩壊に基づいて試料PBMCの増殖を測ることを含む。

【発明の概要】

50

【0007】

本発明者らは、ウイルス抗原の選択物を用いることによって個体の細胞媒介性免疫能を測定できることを確認した。ウイルス抗原の適切なプールを選択することによって、幅広い個体の免疫能を測定して、幅広い個体の免疫能を試験するための単一のアッセイ法システムを開発可能にすることができる。

【0008】

本発明によれば、対象の細胞媒介性免疫能を測定するための方法が提供され、この方法は、免疫細胞、例えば対象からの末梢血単核細胞(PBMC)を含む試料に対して細胞媒介性イムノアッセイ法(CMI)を実施することを含み、この方法は、少なくとも3種のウイルス抗原に由来するペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含む。

10

【0009】

プールまたはペプチドが、少なくとも4種、5種、または6種のウイルス抗原に由来する、請求項1に記載の方法。

【0010】

好ましい態様において、ペプチドのプールは、3種、4種、または5種のウイルス抗原に由来する。

【0011】

1つの局面において、ウイルス抗原は、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1(H3N2)、エプスタイン・バーウイルスのBZLF-1タンパク質、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0より選択される。

20

【0012】

本発明の1つの局面において、ウイルス抗原は、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0、およびインフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質からなる。

【0013】

本発明の別の局面において、ウイルス抗原は、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる。

【0014】

本発明のさらなる局面において、ウイルス抗原は、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、エプスタイン・バーウイルスのトランスアクチベータータンパク質BZLF1、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる。

30

【0015】

本発明のさらなる局面において、ウイルス抗原は、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、エプスタイン・バーウイルスのBALF-4、BMLF-1、BRLF-1、BZLF-1 EBNA-1、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-4、LMP-1、およびLMP-2タンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、ならびに呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる。

【図面の簡単な説明】

40

【0016】

【図1】ELISPOTアッセイ法におけるヘキソン、EBV、MP1、NP、FGF0、およびBZLF1の加速安定性試験のグラフ例。

【図2】ELISPOTアッセイ法における混合ペプチドプール(ICAミックス)および個々のペプチドプールの合計(加算)のグラフ例。

【図3】ELISPOTアッセイ法における、様々な民族性のドナーの試験。

【図4】ELISPOTアッセイ法においてICAミックスを用いた、免疫適格性ドナーの応答の変動の試験を示すグラフ例。

【発明を実施するための形態】

【0017】

50

発明の詳細な説明

開示される方法の様々な用途は、当技術分野における個々の必要に合わせられることを理解すべきである。また、本明細書において使用される専門用語は、本発明の特定の態様を説明することだけを目的とし、限定することを意図しないことも理解すべきである。

【0018】

さらに、本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈において特に規定がない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「断片(a fragment)」への言及は、「断片(fragments)」を含み、「細胞(a cell)」への言及は、2つまたはそれより多いそのような細胞を含み、「対象(a subject)」への言及は、2人またはそれより多いそのような対象を含むなどである。

10

【0019】

本明細書に引用したすべての刊行物、特許、および特許出願は、前述であるか後述であるかを問わず、全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0020】

本発明の方法

本発明者らは、細胞媒介性イムノアッセイ法(CMIアッセイ法)を用いて対象の免疫能を測定する方法を特定した。免疫能、特に細胞媒介性免疫能を測定するように設計されたCMIアッセイ法を用いて、抗原に対するドナーのT細胞応答をモニターすることができる。本発明者らは、多種多様な個体における細胞媒介性免疫応答を検出するために、ウイルス抗原の適切なプールを選択できることを確認した。ウイルス抗原のプールは、免疫適格性の個体において、個体の背景に関わらず、応答をもたらす。したがって、このアッセイ法を用いて、イムノコンピテントな個体、およびまた、効果的な免疫応答を開始できない個体を特定することができる。

20

【0021】

したがって、本発明は、対象の免疫能を測定するための方法を提供し、この方法は、免疫細胞、例えば対象からの末梢血単核細胞(PBMC)を含む試料に対して細胞媒介性イムノアッセイ法(CMI)を実施することを含み、この方法は、少なくとも3種のウイルス抗原に由来するペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含む。

【0022】

この方法は、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、または少なくとも6種のウイルス抗原、最大7種または8種のウイルス抗原に由来するペプチドのプールを含んでよい。

30

【0023】

特に好ましい態様において、ペプチドは、3種、4種、5種、または6種のウイルス抗原に由来する。特に好ましい態様において、ペプチドは、3種、4種、または5種(ただし、これより多くない)ウイルス抗原に由来する。本発明の別の局面において、ペプチドは、2種、3種、または4種のウイルス抗原に由来し、EBVに由来する抗原のプールをさらに含むが、他のいかなるウイルス抗原も含まない。

【0024】

ペプチドのプールは、単一種のウイルスの、複数種のウイルスの、またはすべて異なるウイルスのウイルス抗原に由来するペプチドを含んでよい。ペプチドのプールは、同じウイルスおよび異なるウイルスのウイルス抗原に由来するペプチドを含んでよい。本発明の好ましい局面において、少なくとも3種のウイルス抗原は、少なくとも2種のウイルス、好ましくは3種、4種、5種、または6種のウイルスに由来する。好ましい態様において、少なくとも3種のウイルス抗原は、ヒトアデノウイルス3、インフルエンザウイルス、エプスタイン・バーウイルス、および呼吸器合胞体ウイルスのうちの1つまたは複数に由来する。

40

【0025】

より好ましい態様において、ウイルス抗原は、ヒトアデノウイルス3に由来するヘキソタンパク質、インフルエンザウイルスに由来する基質タンパク質1、インフルエンザウ

50

イルスに由来するヌクレオカプシドタンパク質、エプスタイン・バーウイルスに由来するBZLF-1タンパク質、および呼吸器合胞体ウイルスに由来する融合糖タンパク質G0より選択される。インフルエンザウイルスは、任意のインフルエンザ株であってよい。特に好ましい態様において、インフルエンザウイルスは、インフルエンザ株H3N2である。

【0026】

本発明の1つの態様において、ウイルス抗原のプールは、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0、およびインフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質からなる。

【0027】

本発明の別の態様において、ウイルス抗原のプールは、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる。

10

【0028】

本発明のさらなる態様において、ウイルス抗原のプールは、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、エプスタイン・バーウイルスのトランスアクチベータータンパク質BZLF1、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる。

【0029】

別の好ましい態様において、ウイルス抗原のうちの1つまたは複数は、エプスタイン・バーウイルスに由来し、これらのウイルス抗原は、BALF-4、BMLF-1、BRLF-1、BZLF-1 EBNA-1、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-4、LMP-1、およびLMP-2タンパク質のうちの1つまたは複数を含む。特に好ましい態様において、EBVに由来するペプチドのプールが提供され、このペプチドのプールは、BALF-4、BMLF-1、BRLF-1、BZLF-1 EBNA-1、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-4、LMP-1、およびLMP-2タンパク質のそれぞれに由来するペプチドを含む。このようなEBVペプチドのプールは、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0と組み合わせて提供されてよい。

20

【0030】

CMI応答についてのアッセイ法

細胞媒介性免疫(CMI)応答は、個体の免疫状態を明らかにするために使用される。典型的には、臨床免疫学の分野において、CMI応答という用語は、皮膚試験、リンパ球増殖アッセイ法、および特異的抗原の存在下で免疫細胞、例えば末梢血単核細胞(PBMC)によって産生されるサイトカインの検出を包含する。本発明の方法は、インビトロでの細胞媒介性免疫応答を検出することを含んでよい。具体的には、インビトロでの、ペプチドに対するサイトカインに基づくCMI応答が、本発明の方法において検出され得る。

30

【0031】

免疫系の細胞は、抗原による刺激の後に、サイトカインのような免疫エフェクター分子を産生することができる。CMIアッセイ法は、細胞試料を抗原と共にインキュベートすること、および選択された抗原に対して個体が細胞媒介性免疫応答を生じることができることを示すために、サイトカインのような免疫エフェクター分子の存在(もしくは非存在)または量を測定することを含む。CMIアッセイ法で使用するための細胞には、全血試料、免疫細胞、例えば末梢血単核細胞(PBMC)を含む試料、ならびにリンパ球(特にT細胞)および抗原提示細胞(APC)の単離された集団が含まれ得る。APCは、各T細胞の表面のT細胞受容体が抗原を認識できるように抗原をプロセッシングするのに関与している。抗原認識は、サイトカイン産生を誘発し得る。

40

【0032】

サイトカインを産生する細胞は、フローサイトメトリーによって特定することができる。フローサイトメトリーは、サイトカイン産生細胞の頻度および/または細胞によるサイトカイン産生の量を定量するのに使用され得る。抗原誘発性サイトカインは、アッセイ媒

50

体中に放出され、例えばELISA法によって直接的に検出され得るか、または酵素結合イムノスポットアッセイ法(ELISPOT)を用いて、サイトカイン分泌T細胞の頻度の観点から定量され得る。本発明の方法は、好ましくは、ELISPOTを含む。

【0033】

酵素結合イムノスポットアッセイ法(ELISPOT)は、別名フィルターイムノブランクアッセイ法としても公知であり、元々は、個々の抗体分泌B細胞を検出および定量するために開発された。開発された当時、この技術は、従来のブランク形成細胞アッセイ法に代わる迅速かつ用途の広い方法を提供した。最近の改良により、ELISPOTの感度が向上し、その結果、1秒当たりわずか100分子の特定タンパク質を産生する細胞を検出することができる。このため、ELISPOTアッセイ法は、従来のELISAアッセイ法よりはるかに感度が高くなっている。ELISPOTアッセイ法は、タンパク質分泌細胞のすぐ近くを取り囲む環境で、比較的高濃度の所与のタンパク質性細胞産物(例えばサイトカイン)を利用する。これらの細胞産物を、高親和性抗体を用いて捕捉および検出する。ELISPOTアッセイ法は、Current Protocols in Immunology, Unit 6.19 pages 6.19. 1-8で概説されている。

10

【0034】

典型的には、ELISPOTアッセイ法は、6つの段階を含む:(1)メンブレンで裏打ちしたマイクロタイタープレートに、精製したサイトカイン特異的抗体をコーティングする段階;(2)プレートをブロッキングして、他の任意のタンパク質の非特異的吸収を防止する段階;(3)適切な試薬と共にサイトカイン分泌細胞をインキュベーションする段階;(4)細胞および試薬の除去;(5)標識した第2の抗サイトカイン抗体を添加する段階;ならびに(6)メンブレン上の抗体-サイトカイン複合体を検出する段階。

20

【0035】

免疫応答

インビトロで検出される免疫応答は、本発明の少なくとも3種のウイルス抗原によって誘発される任意の応答であってよい。免疫応答は、任意のタイプの免疫細胞によって媒介されてよい。特に好ましい態様において、免疫応答は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、および単球より選択される1種または複数種の免疫細胞を含み得る末梢血単核細胞(PBMC)によって媒介される。典型的には、免疫応答は、サイトカイン分泌を評価することによって、好ましくはインターフェロン(IFN-)分泌を評価することによって、測定される。サイトカイン分泌を測定する方法は、当技術分野において周知である。免疫応答は、好ましくはT細胞応答である。

30

【0036】

免疫応答は、インビトロで起こってよい。好ましくは、免疫応答は、インビトロのCMI応答である。CMI応答は、抗体を要さない免疫応答である。その代わりに、CMI応答は、細胞障害性T細胞活性化、様々なサイトカインの産生の増加、および/または抗原に反応しての様々なサイトカインの放出を伴い得る。インビトロのCMI応答を検出するための方法は、当技術分野において公知であり、上記に詳細に説明している。

【0037】

本発明の方法は、免疫応答の存在または非存在を検知し得る。本発明の方法に基づく少なくとも3種のウイルス抗原に対する免疫応答の存在は、対象が免疫適格性であることを示し得る。本発明の方法に基づく少なくとも3種のウイルス抗原に対する免疫応答の非存在は、対象の免疫適格性が低いことを示し得る。

40

【0038】

断片

本発明の方法によるウイルス抗原の断片は、親配列のN末端および/またはC末端の切断によって誘導される、5個もしくはそれより多いアミノ酸を含む配列であってよい。例えば、断片は、約5個もしくはそれより多い、約6個もしくはそれより多い、約7個もしくはそれより多い、約8個もしくはそれより多い、約9個もしくはそれより多い、約10個もしくはそれより多い、約11個もしくはそれより多い、約12個もしくはそれより多い、約13個もしくはそれより多い、約14個もしくはそれより多い、約15個もしくはそれより多い、約16

50

個もしくはそれより多い、約17個もしくはそれより多い、約18個もしくはそれより多い、約19個もしくはそれより多い、約20個もしくはそれより多い、約21個もしくはそれより多い、約22個もしくはそれより多い、約23個もしくはそれより多い、約24個もしくはそれより多い、約25個もしくはそれより多い、約26個もしくはそれより多い、または約27個もしくはそれより多いアミノ酸を含んでよい。断片は、約5～約27、約6～約26、約7～約25、約8～約24、約9～約23、約10～約22、約11～約21、約12～約20、約13～約19、約14～約18、約12～約18、約12～約15、約15～約18、約13～約17、約14～約16、約5～約10、約10～約15、約15～約20、約20～約25、または約10～約20アミノ酸長であってよい。

【0039】

これらの断片は、例えばタンパク質分解切断によって親タンパク質から化学的に誘導してもよく、または例えば親タンパク質のアミノ酸配列を利用し、その配列に基づいて断片を合成することによって、知的な意味で親タンパク質から誘導することができる。断片は、当技術分野において周知の方法を用いて合成されてよい。

10

【0040】

「断片」という用語は、アミノ酸残基がペプチド(-CO-NH-)結合によって連結されている分子だけでなく、ペプチド結合が逆向きになっている分子も含む。このようなレトロインバーソペプチドミメティックは、当技術分野において公知の方法、例えばMeziere et al (1997) J. Immunol.159, 3230-3237で説明されているものなどを用いて作製することができる。このアプローチは、主鎖に関わるが側鎖の向きには関わらない変化を含む擬似ペプチドを作製することを含む。Meziere et al (1997)は、少なくともMHCクラスIIおよびTヘルパー細胞の応答のために、これらの擬似ペプチドが有用であることを示している。CO-NHペプチド結合の代わりにNH-CO結合を含むレトロインバーソペプチドの方が、タンパク質分解に対する耐性がずっと高い。

20

【0041】

同様に、アミノ酸残基の炭素原子間の間隔を保持する適切なリンカー部分を使用されることを条件として、ペプチド結合が完全に省かれてもよい；これは、リンカー部分がペプチド結合と実質的に同じ電荷分布および実質的に同じ平面性を有している場合、特に好ましい。細胞外タンパク質分解消化に対する感受性を低くするのを助けるために、断片のN末端またはC末端を便宜的にブロックしてよいこともまた、理解されるであろう。例えば、カルボン酸と反応させることによってペプチドのN末端アミノ基を保護してもよく、アミンと反応させることによってペプチドのC末端カルボキシル基を保護してもよい。例えば、断片の安定性を高めるために、断片のN末端および/またはC末端に1つまたは複数の付加的なアミノ酸残基を付加してもよい。修飾の他の例には、グリコシル化およびリン酸化が含まれる。別の実施可能な修飾は、RまたはKの側鎖アミンの水素をメチレン基で置換してよいというものである(-NH₂ -NH(Me)または-N(Me)₂)。

30

【0042】

本発明の方法に基づく少なくとも3種のウイルス抗原の断片には、インビボでの断片の半減期を延長または短縮する断片の変種も含まれてよい。本発明による断片の半減期を延長することができる変種の例には、断片のペプトイド類似体、断片のD-アミノ酸誘導體、およびペプチド-ペプトイドハイブリッドが含まれる。断片は、D-アミノ酸型の断片も含んでよい。L-アミノ酸ではなくD-アミノ酸を用いてポリペプチドを調製すると、通常代謝過程によるそのような作用物質の任意の望まれない分解が大きく減少して、投与される必要がある作用物質の量が、投与頻度と共に減少する。D-アミノ酸型の親タンパク質も使用されてよい。

40

【0043】

本発明の方法による断片は、親タンパク質鎖をコードする一次転写産物の選択的スプライシングによって生じるmRNAにコードされる、親タンパク質のスプライス変種に由来してもよい。断片は、親タンパク質の少なくともMHC結合特性または抗体結合特性を保持している、親タンパク質のアミノ酸変異体、グリコシル化変種、および他の共有結合誘導體に由来してもよい。例示的な誘導體には、本発明の断片が、置換、化学的、酵素的、または

50

他の適切な手段によって、天然に存在するアミノ酸以外の部分で共有結合的に修飾されている分子が含まれる。

【0044】

断片プール

本発明の方法は、1つまたは複数の断片を含むペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含んでよい。ペプチドのプールは、単一種のウイルスの、複数種のウイルスの、またはすべて異なるウイルスのウイルス抗原に由来する断片を含んでよい。ペプチドのプールは、同じウイルスおよび異なるウイルスのウイルス抗原に由来する断片を含んでよい。本発明の好ましい局面において、1つまたは複数の断片は、少なくとも3種のウイルス抗原、すなわち、2種のウイルス、好ましくは3種、4種、5種、または6種のウイルスに由来する少なくとも3種のウイルス抗原に由来する。好ましい態様において、1つまたは複数の断片は、少なくとも3種のウイルス抗原、すなわち、ヒトアデノウイルス3、インフルエンザウイルス、エプスタイン・バーウイルス、および呼吸器合胞体ウイルスのうちの1つまたは複数に由来する少なくとも3種のウイルス抗原に由来する。

10

【0045】

より好ましい態様において、ペプチドのプールは、ヒトアデノウイルス3に由来するヘキソタンパク質、インフルエンザウイルスに由来する基質タンパク質1、インフルエンザウイルスに由来するヌクレオカプシドタンパク質、エプスタイン・バーウイルスに由来するBZLFタンパク質、および呼吸器合胞体ウイルスに由来する融合糖タンパク質G0より選択される1種または複数種のウイルス抗原の1つまたは複数の断片を含む。インフルエンザウイルスは、任意のインフルエンザ株であってよい。特に好ましい態様において、インフルエンザウイルスは、インフルエンザ株H3N2である。

20

【0046】

本発明の1つの態様において、ペプチドのプールは、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0、およびインフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質からなる1種または複数種のウイルス抗原の1つまたは複数の断片を含む。

【0047】

本発明の別の態様において、ペプチドのプールは、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる1種または複数種のウイルス抗原の1つまたは複数の断片を含む。

30

【0048】

本発明のさらなる態様において、ペプチドのプールは、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、エプスタイン・バーウイルスのトランスアクチベータータンパク質BZLF1、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0からなる1種または複数種のウイルス抗原の1つまたは複数の断片を含む。

【0049】

本発明の1つの態様において、ペプチドのプールは、エプスタイン・バーウイルスに由来する1種または複数種のウイルス抗原の1つまたは複数の断片を含み、これらのウイルス抗原は、BALF-4、BMLF-1、BRLF-1、BZLF-1 EBNA-1、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-4、LMP-1、および/またはLMP-2タンパク質を含む。特に好ましい態様において、EBVに由来する1つまたは複数の断片を含むペプチドのプールが提供され、このペプチドのプールは、BALF-4、BMLF-1、BRLF-1、BZLF-1 EBNA-1、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-4、LMP-1、および/またはLMP-2タンパク質のそれぞれに由来する断片を含む。このようなEBVペプチド断片のプールは、ヒトアデノウイルス3のヘキソタンパク質、インフルエンザウイルスの基質タンパク質1、インフルエンザウイルスのヌクレオカプシドタンパク質、および呼吸器合胞体ウイルスの融合糖タンパク質G0と組み合わせて提供されてよい。

40

【0050】

プールは、少なくとも3種のウイルス抗原に由来する、1個もしくはそれより多い、2個

50

もしくはそれより多い、3個もしくはそれより多い、4個もしくはそれより多い、5個もしくはそれより多い、6個もしくはそれより多い、7個もしくはそれより多い、8個もしくはそれより多い、9個もしくはそれより多い、10個もしくはそれより多い、15個もしくはそれより多い、20個もしくはそれより多い、25個もしくはそれより多い、50個もしくはそれより多い、75個もしくはそれより多い、100個もしくはそれより多い、200個もしくはそれより多い、または250個もしくはそれより多い断片を含んでよい。

【0051】

1つの態様において、本発明の方法は、断片を含むペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含む。好ましくは、この方法は、1種または複数種のウイルス抗原の1つまたは複数の断片を含むペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含む。さらに好ましくは、この方法は、1種または複数種のウイルス抗原のそれぞれの1つまたは複数の断片を含むペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含む。

10

【0052】

下記に説明するように、方法は、1つまたは複数のタンパク質断片ライブラリーに対する免疫応答をインビトロで検出することも含んでよい。

【0053】

タンパク質断片ライブラリー

1つの態様において、プール中の断片は、タンパク質断片ライブラリーを形成する。タンパク質断片ライブラリーは、親タンパク質、すなわち本発明の場合、ヒトアデノウイルス3に由来するヘキソンタンパク質、インフルエンザウイルスに由来する基質タンパク質1、インフルエンザウイルスに由来するヌクレオカプシドタンパク質、エプスタイン・バーウイルスに由来するBALF-4、BMLF-1、BRLF-1、BZLF-1 EBNA-1、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-4、LMP-1、およびLMP-2タンパク質、ならびに呼吸器合胞体ウイルスに由来する融合糖タンパク質G0、に由来する複数の断片であって、親タンパク質の配列の少なくとも10%、例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%を全体として包含する、複数の断片を含む。本発明において、プール中の断片は、好ましくは、それらの断片の由来元であるタンパク質の配列の少なくとも80%を包含するタンパク質断片ライブラリーを形成する。より好ましくは、プール中の断片は、それらの断片の由来元であるタンパク質の配列全体を包含するタンパク質断片ライブラリーを形成する。

20

30

【0054】

タンパク質断片ライブラリーは、CD4+T細胞および/またはCD8+T細胞を刺激することができる断片を含んでよい。好ましくは、タンパク質断片ライブラリーは、CD4+T細胞とCD8+T細胞の両方を刺激することができる断片を含む。刺激のために最適な断片サイズがCD4+T細胞とCD8+T細胞とでは異なることは、当技術分野において公知である。約9個のアミノ酸からなる断片(9mer)は、典型的にはCD8+T細胞のみを刺激し、約20個のアミノ酸からなる断片(20mer)は、典型的にはCD4+T細胞のみを刺激する。大まかに言えば、CD8+T細胞は、配列に基づいて抗原を認識する傾向があるのに対し、CD4+T細胞は、より高次の構造に基づいて抗原を認識する傾向があることが、この理由である。しかし、約15個のアミノ酸からなる断片(15mer)は、CD4+T細胞とCD8+T細胞の両方を刺激することができる。したがって、タンパク質断片ライブラリーは、約15アミノ酸長、例えば、約12アミノ酸長、約13アミノ酸長、約14アミノ酸長、約15アミノ酸長、約16アミノ酸長、約17アミノ酸長、または約18アミノ酸長である断片を好ましくは含む。

40

【0055】

プール中の断片すべてが同じ長さであってもよい。あるいは、プールは、様々な長さの断片を含んでもよい。断片の長さは上記に考察した。

【0056】

タンパク質断片ライブラリーは、配列が重複している断片を含んでよい。したがって、

50

各プールは、配列が重複している断片を含んでよい。これらの配列は、1つまたは複数のアミノ酸が、例えば、2個もしくはそれより多い、3個もしくはそれより多い、4個もしくはそれより多い、5個もしくはそれより多い、6個もしくはそれより多い、7個もしくはそれより多い、8個もしくはそれより多い、9個もしくはそれより多い、10個もしくはそれより多い、11個もしくはそれより多い、12個もしくはそれより多い、13個もしくはそれより多い、14個もしくはそれより多い、15個もしくはそれより多い、16個もしくはそれより多い、17個もしくはそれより多い、18個もしくはそれより多い、19個もしくはそれより多い、または20個もしくはそれより多いアミノ酸が重複してよい。これらの配列は、9個またはそれより多いアミノ酸、例えば、10個もしくはそれより多い、11個もしくはそれより多い、または12個もしくはそれより多いアミノ酸が重複していることが好ましく、これによりCD8+T細胞を刺激することができる9merを含む断片の数が最大になることがその理由である。より好ましくは、配列は、11個のアミノ酸が重複している。プール中の重複断片のすべてにおいて、同じ数のアミノ酸が重複していてもよい。あるいは、プールは、配列において様々な数のアミノ酸が重複している断片を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0057】

タンパク質断片ライブラリーは、9~12(例えば、9~11または10~12)個のアミノ酸が重複している12~18(例えば、12~15、15~18、13~17、または14~16)アミノ酸長の断片を含んでよい。例えば、タンパク質断片ライブラリーは、(i)9個、10個、もしくは11個のアミノ酸が重複している14アミノ酸長の、(ii)9個、10個、もしくは11個のアミノ酸が重複している15アミノ酸長の、または(iii)9個、10個、もしくは11個のアミノ酸が重複している16アミノ酸長の、断片を含んでよい。タンパク質断片ライブラリーは、好ましくは、11個のアミノ酸が重複している15アミノ酸長の断片を含む。

【0058】

断片の一般的特性は、上述した。

【0059】

エプスタイン・バーウイルスのプールは、重複している断片が必要とされない、エプスタイン・バーウイルスペプチドに由来する1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、または26個の断片を含んでよい。例えば、ペプチドのプールは、表6に示すペプチドを含んでよい。

【0060】

試料

本発明の少なくとも3種のウイルス抗原に対する免疫応答のインビトロ検出は、対象から得られた試料を用いて実施する。好ましい態様において、試料は、血液試料である。

【0061】

対象

本発明の方法は、任意の適切な対象の免疫能を測定するのに使用され得る。通常、対象はヒト対象である。

【0062】

細胞

1つの態様において、本発明の方法は、免疫細胞、例えば末梢血単核細胞を含む試料に対して細胞媒介性イムノアッセイ法を実施することを含み、この方法は、少なくとも3種のウイルス抗原に由来するペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含む。ペプチドのプールは、ウイルス抗原のうちの1種もしくは複数種の1つもしくは複数の断片または1種もしくは複数種のウイルス抗原のそれぞれの1つもしくは複数の断片を含んでよい。これらのウイルス抗原は、1つまたは複数のタンパク質断片ライブラリーを構成してよい。

【0063】

典型的には、試料を十分な量の少なくとも3種のウイルス抗原と接触させて、ウイルス抗原に対する免疫応答を生じさせる。試料は、ペプチドまたは断片が試料への接触前に混

合されているペプチドのプールと接触させてもよく;あるいは試料は、各ウイルス抗原もしくは断片と逐次的に、またはウイルス抗原もしくは断片の任意の組合せを用いて同時に、接触させてもよい。好ましい態様において、試料は、すべてのウイルス抗原と同時に接触させられ、その際、これらのウイルス抗原は、試料への接触前に混合されている。

【0064】

試料は、任意の量の少なくとも3種のウイルス抗原、例えば、約1ng/ml、約5ng/ml、約10ng/ml、約50ng/ml、約100ng/ml、約500ng/ml、約1 μ g/ml、約5 μ g/ml、約10 μ g/ml、約50 μ g/ml、約100 μ g/ml、約500 μ g/ml、1mg/ml、約5mg/ml、約10mg/ml、約50mg/ml、約100mg/ml、または約500mg/mlの少なくとも3種のウイルス抗原と接触させてよい。試料は、同時または逐次的に、少なくとも3種のウイルス抗原と接触させてよい。

10

【0065】

免疫細胞は、T細胞、B細胞、樹状細胞、好中球、好塩基球、肥満細胞、好酸球、自然リンパ球系細胞(ILC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、マクロファージ、および胸腺細胞より選択される1つまたは複数のタイプの免疫細胞を含んでよい。免疫細胞を含む試料は、免疫細胞の集団を含んでよい。集団は、これらのタイプの免疫細胞のすべてを含んでもよい。集団は、末梢血単核細胞(PBMC)を含んでよい。PBMCの試料は、T細胞、B細胞、NK細胞、および単球を含む。免疫細胞の集団は、T細胞を含んでよい。1つの態様において、免疫細胞の集団は、末梢血単核細胞を含む。

【0066】

細胞試料を少なくとも3種のウイルス抗原と接触させることは、任意の適切な体積で実施してよい。試料の典型的な体積は、約10 μ l~約1ml、好ましくは約50 μ l~約500 μ l、より好ましくは約100 μ l~約200 μ lの範囲である。典型的には、細胞を少なくとも3種のウイルス抗原と接触させる時間の長さは、約5分~約50時間、例えば約10分~約40時間、約20分~約30時間、約30分~約20時間、約45分~約12時間、約1時間~約6時間、好ましくは約10分~約2時間である。細胞を、抗原と一晚接触させてもよい。

20

【0067】

細胞は、任意の適切な温度で抗原と接触させてよい。典型的には、適切な温度は、細胞の由来元であるヒトまたは動物の通常体温と同じ範囲の温度である。典型的には、インキュベーションは、約4~約38の間、好ましくは約20~約38の間の定温で、より好ましくは約37で、実施される。

30

【0068】

典型的には、細胞は、ウェル中に存在する。好ましくは、細胞は、好ましくはメンブレンで裏打ちしたプレートである平らなプレートのウェル中に存在する。より好ましくは、試料は、標準的な96ウェルプレートまたは384ウェルプレートのウェル中に存在する。このようなプレートは、Fisher scientific、VWR suppliers、Nunc、Starstedt、またはFalconから市販されている。典型的には、ウェルの容量は、約25 μ l~約250 μ l、約30 μ l~約200 μ l、約40 μ l~約150 μ l、または約50~100 μ lである。対象から得られる細胞は、方法で使用される前に培養されてよい。これにより、分析される各試料中に、等しい数の付着細胞が存在することが可能になる。あるいは、細胞が固定または捕捉される場合、新鮮な血液細胞のような細胞を播種前に計数してもよい。細胞を培養するための技術は、当業者には周知である。典型的には、細胞は、血清を補充した培地において37、5%CO₂の標準条件下で培養される。

40

【0069】

細胞は、任意の適切なフラスコまたは容器中で培養し、次いで、ウェルに移してよい。典型的には、細胞は、ウェル中で培養される。好ましくは、細胞は、2個またはそれより多いウェルを含む平らなプレート、例えば、標準的な96ウェルプレートまたは384ウェルプレート中で培養される。典型的には、細胞をマーカーと共にインキュベートすることは、各ウェル中の培地を、マーカーを含む適切な溶液と交換することを伴う。適切な溶液は、当業者に周知である。

【0070】

50

免疫応答性

前述したように、本発明の方法は、少なくとも3種のウイルス抗原に対する免疫応答をインビトロで検出することを含む。免疫応答の検出は、対象が免疫適格性であることを示す。免疫応答の検出の欠如(または検出のないこと)は、対象が免疫応答性ではなく、低い免疫能を有していることを示す。例えば、免疫適格性アッセイ法における免疫適格性ドナーとは、陰性対照においてスポットがなく、陽性対照において20個より多いスポットを示し、イムノコンピテンシーアッセイ法(ICA)抗原に反応して特異的IFN- γ スポットを生じるドナーである。

【0071】

治療的応用

本発明は、免疫細胞、例えば対象からの末梢血単核細胞(PBMC)を含む試料に対して細胞媒介性イムノアッセイ法(CMI)を実施することを含み、少なくとも3種のウイルス抗原に由来するペプチドのプールに対する免疫応答をインビトロで検出することを含む、対象の免疫能を測定するための方法を提供する。本発明の方法は、少なくとも3種のウイルス抗原に対するドナーの幅広いT細胞応答をモニターするために、臨床で有用であり得る。これは、移植、癌、自己免疫疾患、HIVを含むいくつかの疾患状態に関する患者の免疫能を評価する際、およびワクチン試験において、臨床医の助けになり得る。

【実施例】

【0072】

実施例1-免疫原性が最も高い抗原の選択

ELISPOTアッセイ法によって、23個の市販のペプチドプールを用いて健常ドナー試料(31~167)をスクリーニングした。免疫適格性ドナーのカバー率が最も良かったペプチドプールを特定するために、任意の10スポットのカットオフを設定した。次いで、各ペプチドプールに対する応答を、このカットオフを用いて評価した。表1は、応答性ドナーの比率に基づいてペプチドプールを順位付けしたものである。

【0073】

(表1) ペプチドプールの順位付け

10

20

ウイルス/細菌	抗原	略語	応答率 (任意の 10スポットの カットオフ)	プール 中の ペプチド の数
ヒトアデノウイルス 3	ヘキソンタンパク質	ヘキソン	85% (142/167 ドナー)	234
インフルエンザ	基質タンパク質1 (H3N2)	MP1	77% (61/79 ドナー)	61
エプスタイン・バー ウイルス(EBV)	EBV	EBV	73% (112/153 ドナー)	26
インフルエンザ	ヌクレオカプシドタンパク質 (H3N2)	NP	62% (70/112 ドナー)	122
呼吸器 合胞体ウイルス (RSV)	融合糖タンパク質 F0	FGF0	50% (54/106 ドナー)	141
ヒトアデノウイルス 5	ペントンタンパク質	ペントン	48% (81/167 ドナー)	140
EBV	エプスタイン・バー核 抗原 1	EBNA1	48% (20/41 ドナー)	158
EBV	エプスタイン・バー核 抗原 3a	EBNA-3a	47% (72/153 ドナー)	234
EBV	トランスアクチベーター タンパク質 BZLF1	BZLF1	45% (64/142 ドナー)	59
インフルエンザ	インフルエンザ	INF	40% (56/138 ドナー)	17
RSV	ヌクレオカプシド タンパク質 N	NCPN	29% (32/107 ドナー)	95
RSV	主要表面糖タンパク質	MSG	26% (11/41 ドナー)	72

10

20

30

40

インフルエンザ	A型インフルエンザの ヘマグルチニン (H1N1/ブリスベン)	HA INF-bris	25% (18/72 ドナー)	139
アデノウイルス	ADV	ADV	19% (24/122 ドナー)	5
EBV	トランスアクチペーター タンパク質 BZLF1	BZLF1 タンパク質	17% (25/145 ドナー)	N/A
カンジダ・アルビカンズ (Candida albicans)	マンノタンパク質 MP65	MP65	14% (6/41 ドナー)	92
EBV	エプスタイン・バー核 抗原 -3A	EBNA-3a タンパク質	13% (19/137 ドナー)	N/A
RSV	RSV	RSV	12% (5/39 ドナー)	28
EBV	潜伏感染膜タンパク質 2	LMP2	9% (4/41 ドナー)	122
インフルエンザ	A型インフルエンザの ヘマグルチニン (H1N1/カリフォルニア)	HA INF-ca	8% (4/48 ドナー)	139
EBV	DNAポリメラーゼ 処理能力を高める因子 BMRF1	BMRF1	7% (3/41 ドナー)	99
インフルエンザ	基質タンパク質 2	MP2	0% (0/34 ドナー)	22
EBV	分泌タンパク質 BARF1	BARF1	0% (0/41 ドナー)	53

10

20

30

【 0 0 7 4 】

この解析により、応答性が最も高い5種の抗原の選択が可能になった(任意の10スポットのカットオフを基準とする) ヘキソン、MP1、EBV、NP、およびFGF0。

【 0 0 7 5 】

ヘキソン、MP1、EBV、NP、およびFGF0に対する応答が弱かったドナー(<10スポット)を、残りのスクリーニング抗原に対する応答について評価した。BZLF1抗原は、これらのドナーにおいて10個を超えるスポット計数値を示したため、さらに試験するために選択した。

【 0 0 7 6 】

実施例2 溶解性

特別仕様のペプチドプール(ヘキソン、EBV、MP1、NP、FGF0、およびBZLF1)を合成し、凍結乾燥させたプールとして供給した。ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて、これらのペプチドプールを溶解して、プール中のペプチド1つ当たり625 µg/mLの濃度にした。

【 0 0 7 7 】

すべてのペプチドプールの溶解を、首尾よく完了した。溶解性の問題は認められなかった。

【 0 0 7 8 】

実施例3 個々のペプチドプールの安定性の評価

使用濃度(3 µg/mL)の各ペプチドプールの安定性を、加速安定性試験を用いて評価した。手短に言えば、次のとおりである:使用濃度のペプチドプールを37 °Cで8週間保存した。

40

50

次いで、ELISPOTアッセイ法において、ストレスを加えたペプチドプールを、新たに希釈したペプチドプール(対照)と比較して試験した。各ドナーについて、3つのレプリケートを試験した。これらの研究の結果を図1に示している。

【0079】

統計学的解析(マンホイットニーの検定)により、対照と37で8週間保存されたペプチドとでスポット計数値に統計学的有意差はないと判定された。

【0080】

実施例4 免疫原性抗原の混合

ELISPOTアッセイ法でのペプチドプールのスクリーニングから得られたデータを再評価して、あたかも様々な抗原に由来するペプチドが混合されて1つのプールにされたかのように、ドナーの理論的カバー率を決定した。これは、個々のペプチドプールについてのスポット計数値を足すことによって実施した(例えば、ドナー15、ヘキソンスポット計数値=5、EBVスポット計数値=26、NPスポット計数値=5、理論上のミックス16スポット計数値=36)。スポット10~350個の範囲内のドナーの比率を各ミックスについて計算した。この解析の結果を表2に示している。

【0081】

(表2) ELISPOTアッセイ法におけるペプチドプールの理論上の組合せおよび結果として得られたドナーのカバー率(n=94~100)

理論上の ミックスの 番号	理論上のスーパープール						スポット10~ 350個以内の ドナーの比率	試験した ドナーの数
1	ヘキソン	MP1	FGF0				97.9	94
2	ヘキソン	FGF0	NP				96.8	94
3	ヘキソン	BZLF1	MP1	FGF0			96.8	94
4	ヘキソン	BZLF1	NP	FGF0			94.7	94
5	MP1	NP	FGF0				97.9	94
6	ヘキソン	BZLF1	MP1				98.0	100
7	ヘキソン	NP	BZLF1				96.0	100
8	ヘキソン	MP1	NP	FGF0			97.9	94
9	MP1	NP	BZLF1	FGF0			95.7	94
10	ヘキソン	BZLF1	FGF0				93.6	94

10

20

30

11	ヘキソン	MP1	NP	BZLF1	FGF0		92.6	94
12	BZLF1	MP1	NP	FGF0			95.7	94
13	ヘキソン	EBV	FGF0				94.0	100
14	BZLF1	NP	FGF0				92.6	94
15	ヘキソン	EBV	MP1				96.0	100
16	ヘキソン	EBV	NP				94.0	100
17	ヘキソン	EBV					93.0	100
18	EBV	BZLF1	MP1	NP			89.0	100
19	BZLF1	MP1	FGF0				93.6	94
20	ヘキソン	EBV	BZLF1				94.0	100
21	ヘキソン	EBV	MP1	NP			90.0	100
22	ヘキソン	EBV	BZLF1	EBNA-3a			83.0	100
23	EBV	BZLF1	EBNA-3a				81.0	100
24	ヘキソン						87.0	100
25	ヘキソン	EBV	MP1	NP	FGF0		88.3	94
26	ヘキソン	EBV	BZLF1	MP1	NP	FGF0	79.8	94

10

20

30

【 0 0 8 2 】

理論上の解析によって、以下のことを確認した：

- ・10種のミックスが、評価したドナーの95%以上に応答を生じさせたであろうこと。
- ・ミックス25および26が、ELISPOTプレートリーダー上で正確に計数可能である上限であるスポット計数値(400+スポット)を理論上与えるであろうこと。これにより、スポット計数値10~350個の範囲内のドナーの比率が低下した。
- ・13種のミックスをELISPOTアッセイ法でさらに試験するために選択した(表3)。

【 0 0 8 3 】

(表3) イムノコンピテンシーアッセイ法(ICA)のために選択したペプチドプールのミックス

ICA ミックス	ミックス中の抗原						ペプチド の数
1	ヘキソン	MP1	FGF0				436
2	ヘキソン	FGF0	NP				497
3	ヘキソン	BZLF1	MP1	FGF0			495
4	ヘキソン	BZLF1	NP	FGF0			556
5	MP1	NP	FGF0				324
6	ヘキソン	MP1	NP	FGF0			558
7	MP1	NP	BZLF1	FGF0			383
8	ヘキソン	NP	BZLF1				415
9	ヘキソン	BZLF1	FGF0				434
10	ヘキソン	BZLF1	MP1				354
11	EBV	BZLF1	MP1	NP			268
12	ヘキソン	EBV	MP1	NP	FGF0		584
13	ヘキソン	EBV	BZLF1	MP1	NP	FGF0	643

10

20

【0084】

混合ペプチドプールの予測されるパフォーマンスが達成されるであろうことを確認するために、32種のドナーを用いるELISPOTアッセイ法において、ペプチドプールを個別に、およびミックスとして試験した。これらのミックスについて得られたスポット計数値を、個々の抗原に由来するスポット計数値を足した値と比較した(例えば、ドナー9743、ヘキソンスポット計数値=5、MP1スポット計数値=10、FGF0スポット計数値=6、ミックス1スポット計数値=28)。この比較の結果を図2に示す。

【0085】

統計学的解析(マンホイットニーの検定)により、個々のペプチドプールのスポット計数値を足した値と混合ICAミックスとで統計学的有意差はないと判定された。

30

【0086】

実施例5 ICAミックスの調製

溶解させたペプチドプール(プール中のペプチド1つ当たり625 µg/mL)を混合して、イムノコンピテンシーアッセイ法(ICA)ミックスとした。調製時に問題は認められなかった。

【0087】

実施例6 民族性

35名のコーカサス人ドナー、10名のアフリカ系アメリカ人ドナー、10名のラテンアメリカ系ドナー、および9名のアジア人ドナーから採取した血液試料を用いるELISPOTアッセイ法において、13種の選択されたICAミックスを試験した。この試験で得られた結果を図3に示している。

40

【0088】

10スポットのカットオフを用いて、応答性ドナーの数を決定した(表4)。

【0089】

(表4)任意の10スポットのカットオフを基準とする、ICAミックスに対して応答性のドナーの比率

	応答性ドナーの比率(任意の10スポットのカットオフを基準とする)												
	ミックス 1	ミックス 2	ミックス 3	ミックス 4	ミックス 5	ミックス 6	ミックス 7	ミックス 8	ミックス 9	ミックス 10	ミックス 11	ミックス 12	ミックス 13
コーカサス人 (n=35)	94%	100%	100%	97%	97%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
アフリカ系 アメリカ人 (n=10)	90%	90%	90%	90%	80%	90%	80%	80%	90%	80%	90%	90%	90%
ラテン アメリカ系の人 (n=10)	90%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
アジア人 (n=9)	89%	100%	89%	89%	100%	100%	89%	89%	100%	78%	78%	100%	89%

10

【 0 0 9 0 】

20

13種のミックスのうち4つ(ICAミックス2、6、9、および12)は、10スポットのカットオフを基準として、民族性に関わらず、試験したドナーの90%以上で応答性であった。

【 0 0 9 1 】

実施例7 ICAミックスに対する応答の経時的変動

ICAミックスによって誘導される応答の自然変動を明らかにするために、ELISPOTアッセイ法でICAミックスを用いて、6名の免疫適格性血液ドナーを次の時点:0日目、3日目、7日目、14日目、28日目、56日目、および84日目に試験した。

【 0 0 9 2 】

図4は、2つのミックス例について、短期間(7日)および長期間(84日)における応答の変動を示す。

30

【 0 0 9 3 】

統計学的解析は、BioBridgesによって実施された。手短に言えば、次のとおりである:各ドナーの全時点のデータを用いて、個々のミックスに対して変動係数(%CV)を算出した。その後、6名のドナーから得られた各ミックスに対する%CV値をグループ分けし、平均値を算出した。これらの%CVの平均値は、ELISPOTアッセイ法においてICAミックスを用いたスポット計数値の変動の尺度であり、概略については表4を参照されたい。

【 0 0 9 4 】

(表5) ELISPOTアッセイ法におけるICAミックスに対する免疫適格性応答の自然変動の統計学的解析(n=6)

ICAミックス	変動 (7日間)	変動 (84日間)
ミックス1	20%	26%
ミックス2	16%	21%
ミックス3	13%	23%
ミックス4	11%	18%
ミックス5	22%	25%
ミックス6	18%	23%
ミックス7	24%	31%
ミックス8	18%	25%
ミックス9	19%	25%
ミックス10	21%	24%
ミックス11	27%	34%
ミックス12	21%	23%
ミックス13	25%	24%

10

20

【 0 0 9 5 】
(表 6)

EBV プール					
	ペプチド配列	親 タンパク質	位置	タンパク質 ID	SEQ ID 番号
1	FLDKGTYTL	BALF-4	276-284	P03188	SEQ ID NO: 1
2	GLCTLVAML	BMLF-1	259-267	Q04360	SEQ ID NO: 2
3	DYCNVLNKEF	BRLF1	28-37	P03209	SEQ ID NO: 3
4	ATIGTAMYK	BRLF1	134-142	P03209	SEQ ID NO: 4
5	RVRAYTYSK	BRLF-1	148-156	P03209	SEQ ID NO: 5
6	RAKFKQLL	BZLF-1	190-197	P03206	SEQ ID NO: 6
7	EPLPQGQLTAY	BZLF-1	54-64	P03206	SEQ ID NO: 7
8	HPVGEADYFEY	EBNA-1	407-417	P03211	SEQ ID NO: 8
9	QAKWRLQTL	EBNA-3A	158-166	P12977	SEQ ID NO: 9
10	FLRGRAYGL	EBNA-3A	193-201	P12977	SEQ ID NO: 10
11	RPIFIRRL	EBNA-3A	247-255	P12977	SEQ ID NO: 11
12	YPLHEQHGM	EBNA-3A	458-466	P12977	SEQ ID NO: 12
13	RLRAEAQVK	EBNA-3A	603-611	P12977	SEQ ID NO: 13
14	AVFDRKSDAK	EBNA-3B	399-408	I1YP20	SEQ ID NO: 14

10

20

30

15	RRYDLIEL	EBNA-3C	79-87	Q69140	SEQ ID NO: 15
16	EENLLDFVRF	EBNA-3C	102-111	Q69140	SEQ ID NO: 16
17	QPRAPIRPI	EBNA-3C	881-889	Q69140	SEQ ID NO: 17
18	IVTDFSVIK	EBNA-4	416-424	P03203	SEQ ID NO: 18
19	YLLEMLWRL	LMP-1	125-133	P03230	SEQ ID NO: 19
20	PYLFWLAAI	LMP2	131-139	P13285	SEQ ID NO: 20
21	IEDPPFNSL	LMP2	200-208	P13285	SEQ ID NO: 21
22	SSCSCPLSK	LMP-2	340-349	P13285	SEQ ID NO: 22
23	FLYALALLL	LMP-2	356-364	P13285	SEQ ID NO: 23
24	TYGPVFMCL	LMP-2	419-427	P13285	SEQ ID NO: 24
25	TYGPVFMSL	LMP2	419-427	P13285	SEQ ID NO: 25
26	CLGGLTMV	LMP-2	426-434	P13285	SEQ ID NO: 26

10

20

【 0 0 9 6 】

エプスタイン・バーウイルス、トランスアクチベータータンパク質BZLF1 タンパク質ID :P03206 SEQ ID NO: 27

MMDPNSTSEDKFTDPYQVPFVQAFDQATRQVYQDLGGPSQAPLPCVLWVPLPEPLPQGG
LTAYHVSTAPTGSWFSAPQAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQNNQTNQAGGEAPQPGDNS
TVQATAAVVFACPGANQGQQLADIGVQPAPVAAPARRTRKPPQESLEECDSELEIKRY
KNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAATAKSSENDRLRLLKQMCPSLDVDSIIPRTPDVLHE
DLLNF

30

【 0 0 9 7 】

ヒトアデノウイルス3、ヘキソンタンパク質 タンパク質ID: P36849 SEQ ID NO: 28
>sp|P36849|CAPSH_ADE03 ヘキソンタンパク質 OS=ヒトアデノウイルスB血清型3 GN=L3
PE=2 SV=2

MATPSMMPQWAYMHIAQDASGYLSPGLVQFARATDTYFSMGNKFRNPTVAPTHDVTDR
SQRLMLRFVPVDREDNTYSYKVRYTLAVGDNRVLDMASTFFDIRGVLDRGPSFKPYSGTA
YNSLAPKGAPNTSQWIVTTNGDNAVTTTTNTFGIASMKGGNITKEGLQIGKDITTEGEE
KPIYADKTYQPEPQVGEESWTDTDGTNEKFGGRALKPATNMKPCYGSFARPTNIKGGQAK
NRKVKPTTEGGVETEEDIDMEFFDGRDAVAGALAPEIVLYTENVNLETPDSHVYKPET
SNNSHANLGQQAMPNRPNYIGFRDNFVGLMYNSTGNMGVLAGQASQLNAVVDLQDRNTE
LSYQLLLDSLGDRTYFMSWNQAVDSYDPDVRIENHGIEDELPNYCFPLNGIGPGHTYQ
GIKVKTTDDTNGWEKDANVAPANEITIGNNLAMEINIQANLWRSFLYSNVALYLPDVYKYT
PPNITLPTNTNTYEYMNGRVVSPSLVDSYINIGARWSLDPMDNVNPFNHHRNAGLRYRSM
LLGNGRYVFPFHQVQKFFAVKNLLLLPGSYTYEWNFRKDVNMVLQSSLGNDLRTDGATI
SFTSINLYATFFPMAHNTASTLEAMLRNDTNDQSFNDYLSAANMLYPIPANATNIPISIP
SRNWAAFRGWSFTRLKTKETPSLGSFGDPYFVYSGSIPYLDGTFYLNHTFKKVAIMFDSS
VSWPGNDRLLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQCNMTKDWFLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYK
DRMYSFFRNFPMSRQVVDEVNNTDYKAVTLQYHNSGFGVGYLAPTMRQGEYPANYPY
PLIGTTAVKSVTQKKFLCDRTMWRIPFSSNFMSMGALTDLGQNMLYANSAHALDMTFEVD
PMDEPTLLYLLFEVFDVVRVHQPHRGVIEAVYLRTPFSAGNATT

40

【 0 0 9 8 】

インフルエンザA(H3N2)ウイルス、核タンパク質 タンパク質ID: I6LFN1 SEQ ID NO: 2

50

9

>tr|I6LFN1|I6LFN1_9INFA 核タンパク質 OS=インフルエンザウイルス(A/ナンチャン/A2/1994(H3N2)) GN=NP PE=3 SV=1
 MASQGTKRSYEQMETDGERQNA TEIRASV GKMIDGIGRFYIQMCTELKLS DYEGRLIQNS
 LTIERMVLSAFDERRNRYLEEHP SAGKDPKKTGGPIYKRVDGRWMREL VLYDKEEIRRIW
 RQANNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDTTYQRTRALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAG
 AAVKIGITMVMELIRMIKRGINDRNFWRGENGRKTRSA YERM CNILK GK FQTA AQRAMMD
 QVRESRNP GNAEIEDLIFSARSALILRGSVAHK SCLPACVYGP AVSSGYNFEKEGYSLVG
 IDPFKLLQNSQVYSLIRPNENPAHKSQ LVWMACHSAAFEDLRLLSFIRG TKVSPRGKLT
 RGVQIASNENMDNMESSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQRASAGQISVQPTFSVQRNLPF
 EKSTVMAAFTGNTGRTSDMRAEIIRMMEGAKPEEVSFRGRGVFELSDEKATNPVPSFD
 MSNEGSYFFGDNAEEYDN

10

【 0 0 9 9 】

呼吸器合胞体ウイルス、融合糖タンパク質F0 タンパク質ID:036634 SEQ ID NO: 30
 >sp|036634|FUS_HRSVB 融合糖タンパク質F0 OS=ヒト呼吸器合胞体ウイルスB(B1株) GN=
 F PE=1 SV=1
 MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNYTIN
 TTKNLNVSISKKRKR RFLGFL LGVGSIAIASGIAVSKVLHLEGEV NKIKNALLSTNKAVVS
 LSNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVN
 AGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK KLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV
 QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKT
 KCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKNLYVKGEPIINY YDP
 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIIVVLLS
 LIAIGLLLYCKAKNTPVTL SKDQLSGINNI AFSK

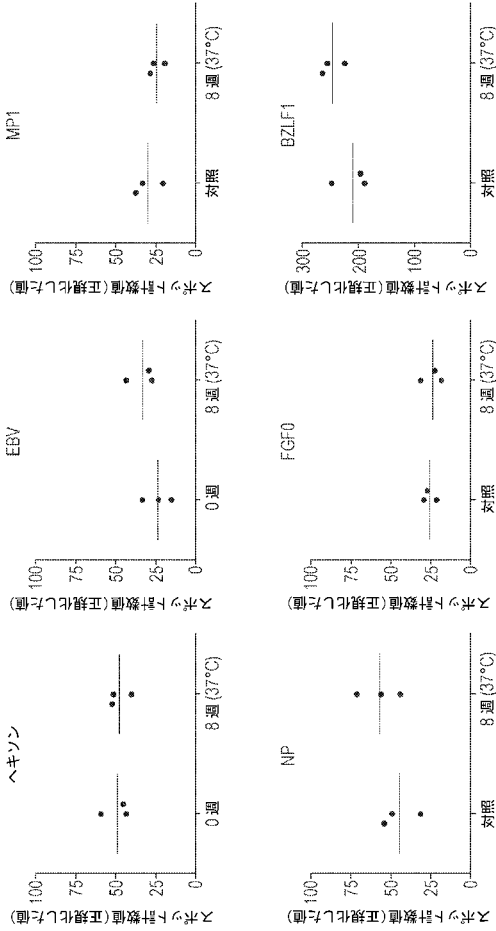
20

【 0 1 0 0 】

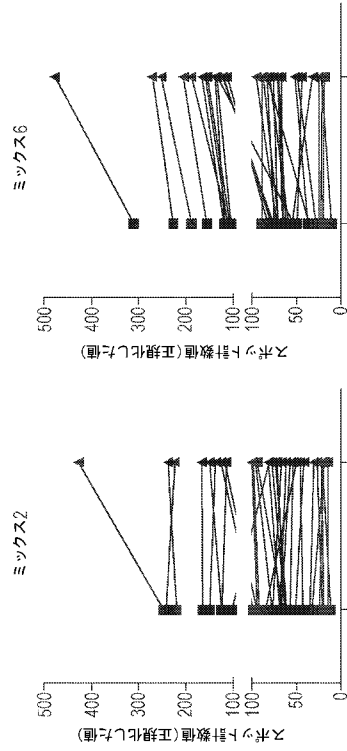
インフルエンザウイルス(H3N2)。基質タンパク質1。タンパク質ID:Q67157 SEQ ID NO
 : 31
 >sp|Q67157|M1_168A0 基質タンパク質1 OS=インフルエンザウイルス(A株/アイチ/2/196
 8 H3N2) GN=M PE=3 SV=1
 MSLLTEVETYVLSIVPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGIL
 GFVFTLTCPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAVKLYRKLKREITFHGAKEIALSYS
 AGALASCMGLIYNRMGAVTTEVA FGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTTTNPLIRHENRMV
 LASTTAKAMEQMAGSSEQA AEEAMEVASQARQMVQAMRAIGTHPRSSAGLKDDLLENLQAY
 QKRMGVQMQRFK

30

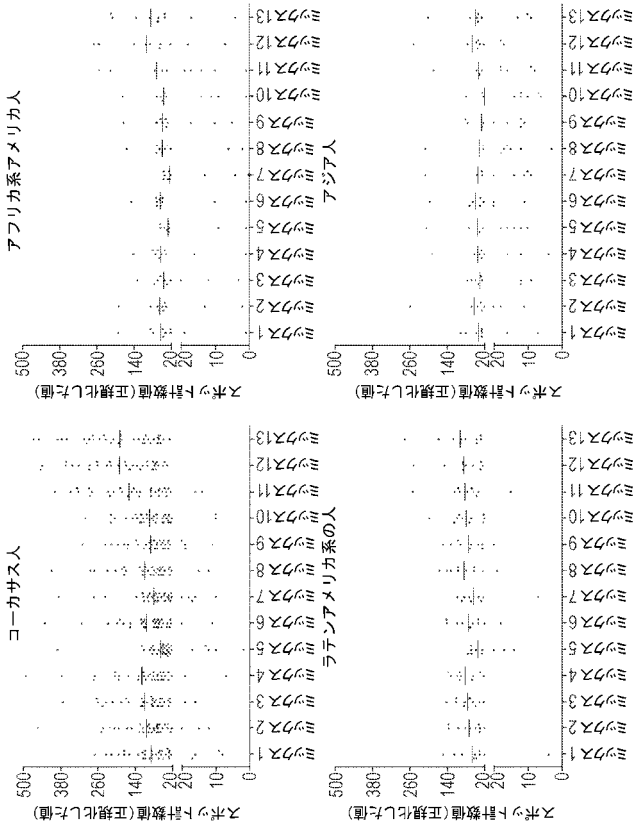
【図1】



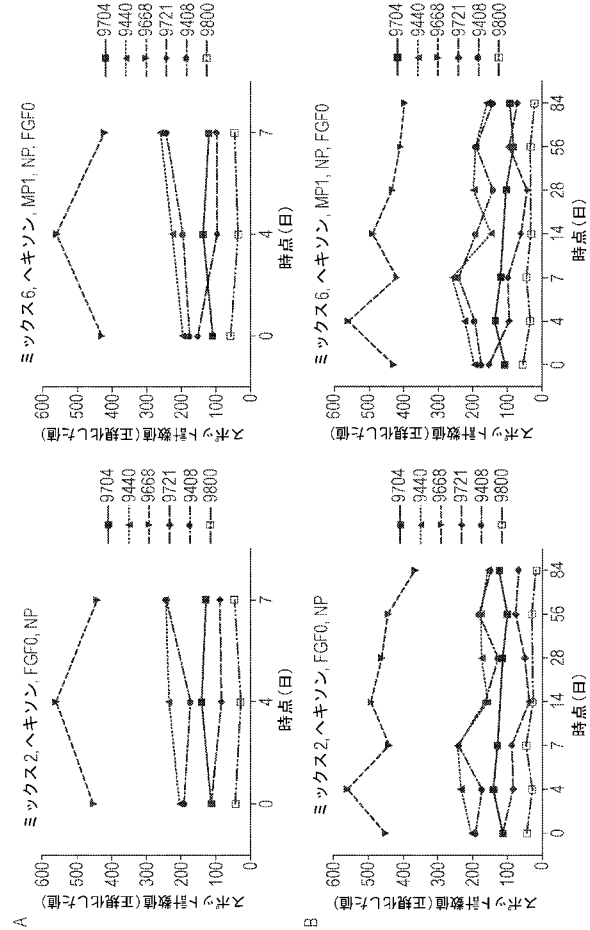
【図2】



【図3】



【図4】



【配列表】

2019511722000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2017/050855

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, INSPEC, 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 Y	WO 2013/172926 A1 (UNIV YALE [US]) 21 November 2013 (2013-11-21) page 6, line 10 - line 15 page 30, line 22 - line 30 page 35, line 23 - page 36, line 3 -----	1-5,11, 12,15,18 6-10,13, 14,16,17
X	Anaspec: "Product Information Sheet", 23 November 2013 (2013-11-23), XP055369436, Retrieved from the Internet: URL:https://www.anaspec.com/products/produ ct.asp?id=45991&productid=27088 [retrieved on 2017-05-04]	1-5,11, 12,15,18
Y	the whole document ----- -/--	6-10,13, 14,16,17
<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 application or patent 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		Date of mailing of the international search report
4 May 2017		15/05/2017
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 Jacques, Patrice

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2017/050855

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/050855

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	F Kern: "PepMix(TM)PeptidePools APPLICATIONNOTE IMMUNOLOGY March2012 JPTPeptideTechnologies 1 CytomegalovirusProteinSpanningPepMix TM PeptidePoolstoDiscover ChangesinT-CellImmunityintheAgingPopulatio n", March 2012 (2012-03), XP055369438, Retrieved from the Internet: URL:https://www.jpt.com/fileadmin/user_upload/NEW/Products__Services/Products/PepMix_TM_Peptide_Pools/AppNote_HCMV_1203.pdf [retrieved on 2017-05-04]	1-5,11, 12,15
Y	the whole document	6-10,13, 14,16,17
X	Jpt: "Product Data Sheet", March 2012 (2012-03-01), XP055369442, Retrieved from the Internet: URL:https://shop.jpt.com/images/upload/pdf/Datasheet_CEF_Pool_(extended)_120-70.pdf [retrieved on 2017-05-04]	1-5,11, 12,15,18
Y	the whole document	6-10,13, 14,16,17
X	J H Coxandp ET AL: "PepTrack(TM)PeptideLibraries QualificationandUseofPeptideLibrariesforClinicalTrial Immunomonitoring", January 2013 (2013-01-01), XP055369333, Retrieved from the Internet: URL:https://www.jpt.com/fileadmin/user_upload/NEW/Products__Services/Products/PepMix_TM_Peptide_Pools/AppNote_PepTrack_PepMix_1301_01.pdf [retrieved on 2017-05-04]	1-5,11, 12,15,18
Y	the whole document	6-10,13, 14,16,17
X	CURRIER J R ET AL: "A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 260, no. 1-2, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 157-172, XP004332570, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/S0022-1759(01)00535-X	1-5,11, 12,15,18
Y	abstract	6-10,13, 14,16,17
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/050855

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Anonymous: "PepMix(TM) Peptide Pools - JPT", 22 March 2016 (2016-03-22), XP055369415, Retrieved from the Internet: URL:https://www.jpt.com/products/pepmix-peptide-pools/ [retrieved on 2017-05-04] page 1 - page 7 page 7, section "Custom PepMixes™ Peptide Pools" and Custom PepMixes™ Production". -----</p>	6-10,13, 14,16,17
Y	<p>ROEDERER M ET AL: "Optimized determination of T cell epitope responses", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 274, no. 1-2, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 221-228, XP004411935, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00423-4 the whole document -----</p>	6-10,13, 14,16,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2017/050855

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013172926 A1	21-11-2013	US 2015140017 A1	21-05-2015
		WO 2013172926 A1	21-11-2013

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/075 (2006.01)	C 0 7 K 14/075	
C 0 7 K 14/115 (2006.01)	C 0 7 K 14/115	
C 4 0 B 40/10 (2006.01)	C 4 0 B 40/10	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 タスカー スコット
英国 エスタブリュ 1 1 4 エルイー グレーター ロンドン ロンドン バターシー パーク
ロード パーク コート フラット 9 0

F ターム (参考) 4B063 QA05 QQ08 QR48
4B065 AA90X AA93X AA94X AC20 BB19 BD39 CA46
4H045 AA30 BA10 BA17 CA01 DA86 EA50

专利名称(译)	测量受试者的细胞介导的免疫力的方法		
公开(公告)号	JP2019511722A	公开(公告)日	2019-04-25
申请号	JP2018551422	申请日	2017-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	牛津免疫科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛津Imyunotekku有限公司		
[标]发明人	タスカースコット		
发明人	タスカー スコット		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C12N5/0783 C07K14/05 C07K14/11 C07K14/075 C07K14/115 C40B40/10		
CPC分类号	G01N33/505 C07K7/08 C40B40/08 G01N33/5047 G01N33/5052 G01N33/56983		
FI分类号	G01N33/53.P C12Q1/02.ZNA C12N5/0783 C07K14/05 C07K14/11 C07K14/075 C07K14/115 C40B40/10		
F-TERM分类号	4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA94X 4B065/AC20 4B065/BB19 4B065/BD39 4B065/CA46 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA17 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2016005210 2016-03-29 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在受试者中测量细胞介导的免疫的方法。该方法包括对包含来自受试者的免疫细胞的样品进行细胞介导的免疫测定 (CMI)。该方法进一步包括体外检测对源自至少三种病毒抗原的肽库的免疫应答。

