

(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2017-505447

(P2017-505447A)

(43) 公表日 平成29年2月16日(2017.2.16)

(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 0 6 3
C 4 O B 30/06 (2006.01)	C 4 O B 30/06	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 A	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-560868 (P2016-560868)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月19日 (2014.12.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月11日 (2016.7.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/071571
 (87) 国際公開番号 WO2015/095744
 (87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)
 (31) 優先権主張番号 61/918,570
 (32) 優先日 平成25年12月19日 (2013.12.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516181871
 オベクサ セラピューティクス, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, テキサス 77381, ザ ウッドランズ, テクノロジー フォレスト ブールバード 2635
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞エピトーププロファイリング方法、T細胞組成物の製造方法及び疾患の治療方法

(57) 【要約】

本明細書にて、対象から単離されたサンプル中の抗原特定T細胞の検出方法及び抗原の免疫活性化エピトープのマッピング方法が開示される。このような方法は、例えば、癌、感染症及び自己免疫疾患などの疾患を治療するための抗原特定T細胞組成物の作製方法で使用することができる。

【選択図】 図 1

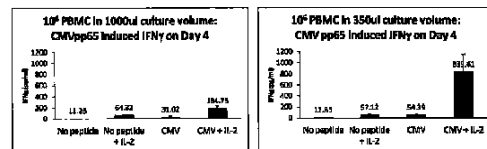


Figure 1: CNV pp65 induced IFN γ response on day 4 with PBMC at two seeding densities

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原特異的 T 細胞の検出方法及び前記抗原特異的 T 細胞が応答する免疫活性化エピトープの同定方法であって、

(a) 1 つ以上のペプチドを含むエピトーププールを有する対象者由来の T 細胞を含むサンプルの少なくとも 1 つのマクロバルク培養物をインビトロでプライミングすることであって、

前記エピトーププール中の各ペプチドは、異なる抗原断片であり；

(b) 前記エピトーププール中、前記ペプチドの少なくとも 1 つに特異的な T 細胞により、少なくとも 1 つの活性化サイトカインの前記検出可能な放出が可能な十分な期間、前記マクロバルク培養物を前記エピトーププールにより再刺激することと；

(c) 前記マクロバルク培養物中に前記少なくとも 1 つの活性化サイトカインの存在の有無を検出することであって、

前記培養物中に前記少なくとも 1 つの活性化サイトカインの前記存在により、前記抗原に特異的な T 細胞を検出し、抗原特異的 T 細胞が応答する免疫活性化エピトープを含むように、前記抗原の前記断片を同定することを含む、前記方法。

【請求項 2】

各エピトーププールは少なくとも 2 つのペプチドを含む、請求項 1 に記載の方法であって、

各ペプチドは、前記エピトーププールにおいて少なくとも 1 つの他のペプチドと同一の重なりアミノ酸配列の領域を共有し、前記エピトーププール中の前記ペプチドが前記抗原の連続領域を共にスパンし、前記培養物中の前記少なくとも 1 つの活性化サイトカインの前記存在により前記エピトーププール中の前記ペプチドによりスパンされる前記領域を、抗原特異的 T 細胞が応答する免疫活性化エピトープを含むと、同定する、前記方法。

【請求項 3】

各マクロバルク培養物は、 $4 \cdot 5 \times 10^5$ 細胞 / mL / mm³ の密度で T 細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記サンプルが患者から単離された末梢血単核球を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記患者は疾患を有し、前記抗原は前記疾患に関連する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記疾患は自己免疫疾患であり、前記抗原は前記自己免疫疾患関連自己抗原である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記自己免疫疾患は多発性硬化症であり、前記自己抗原はミエリンタンパク質である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ミエリンタンパク質は、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリン稀突起膠細胞タンパク質及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記疾患は腫瘍であり、前記抗原は腫瘍関連抗原である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ペプチドは約 16 アミノ酸長である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

各エピトーププールは少なくとも 2 つの異なるペプチドを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

2 つの異なるペプチド間の重なりアミノ酸の前記領域は 12 アミノ酸長である、請求項

10

20

30

40

50

1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記活性化サイトカインは I F N である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記活性化サイトカインは E L I S A によって検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記エピトーププールは、少なくとも 2 つのエピトーププールを含むライブラリー由来であり、前記ライブラリーにおいて各エピトーププールについてステップ (a) ~ (c) を繰り返し行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

エピトーププールの前記ライブラリーは、前記抗原の少なくとも 5 0 % をスパンするペプチドを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 に記載の方法であって、前記検出ステップは、前記マクロバルク培養物中に 2 つの活性化サイトカインの存在の有無を検出することと、前記培養物中に両方の活性化サイトカインの前記存在により、前記抗原に特異的な T 細胞を検出し、前記抗原の前記断片を、前記抗原特異的 T 細胞が応答する免疫活性化エピトープを含むと、同定すること、とを含む方法。

【請求項 1 8】

前記 2 つの活性化サイトカインは、(a) I F N 及び T N F a、(b) I F N 及び I L - 6、並びに (c) T N F a 及び I L - 6 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 1 9】

疾患を有する患者の治療用組成物の作製方法であって、

(a) 前記患者由来のサンプル内に抗原特異的 T 細胞を検出することと、前記疾患に関連し、前記抗原特異的 T 細胞が請求項 1 に記載の方法により応答する抗原の免疫活性化エピトープを同定することと、

(b) 前記同定された免疫活性化エピトープを有する前記患者から単離された T 細胞を伝播すること、とを含む、前記方法。

【請求項 2 0】

前記疾患は癌であり、前記抗原は腫瘍関連抗原または癌関連腫瘍特異的抗原である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

最終ステップとして、前記伝播 T 細胞を減衰させる前記ステップを更に含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記疾患は自己免疫疾患であり、前記抗原は前記自己免疫疾患関連自己抗原である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 9 に記載の方法により製造された T 細胞を含む組成物。

【請求項 2 4】

請求項 1 9 に記載の方法により製造された前記組成物を投与することを含む、疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、サンプル中の抗原特異的 T 細胞の検出方法、抗原特異的 T 細胞が応答する抗原の免疫活性化エピトープの同定方法、例えば、疾患の治療のための T 細胞組成物作成のための同方法の使用を提供する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

抗原に対するT細胞応答は、抗原断片のT細胞、すなわち、エピトープによる認識が関与し、抗原提示細胞に発現する分子を提示する抗原という文脈で提示される。抗原タンパク質の所定の断片が免疫活性化エピトープであるか否か、すなわち、T細胞応答を刺激することができるか否かは、多くの場合、抗原提示分子へのその結合特性及びエピトープの特異的アミノ酸と適切なT細胞受容体との相互作用に依存する。特に疾患の発病中に、抗原特異的T細胞を検出すること及び抗原のエピトープがT細胞媒介免疫に関与していることを理解することは、免疫応答の指向性調節及びワクチンの開発並びにアレルギー、自己免疫疾患及び腫瘍の治療の基礎となる。

【0003】

例えば、自己免疫疾患の場合、ミエリンタンパク質エピトープに対して自己T細胞の反応性を伴う免疫療法では、ミエリン反応性T細胞の除去及び/または負の調節での有効性及び多発性硬化症(MS)患者の潜在的な臨床的利点をもたらすことが明かになった。しかし、各患者のT細胞免疫療法では、こうした自己反応性T細胞のT細胞受容体が多様性に富み、かつ異なるMS患者間でそれらのエピトープの特異性が異なるため、個別化する必要がある(Vandevyver et al., Eur. J. Immunol., 1995; 25: 958~968, Wucherpfennig et al., J. Immunol., 1994; 152: 5581~5592, Hong et al., J. Immunol., 1999; 163: 3530~3538)。

【0004】

各患者の個別化に加えて、自己免疫疾患に対するT細胞免疫療法剤を上手く作製するには、自己反応性T細胞の検出及び自己反応性T細胞が結合するエピトープの同定を行う必要がある。抗原の免疫活性化エピトープのマッピング及びの治療用途のT細胞クローニングのための標準法としては、抗原のプライミングが関与し、一般に、T細胞と抗原とインキュベーションし、その後、個々の細胞を96ウェルプレートにプレーティングすることを含む。その後、細胞を拡張し、ペプチドの特異性に関して、抗原をカバーする個々のペプチドで、クローンをスクリーニングするという、労働集約型の時間がかかる工程によって、アッセイを行う。次に、T細胞免疫療法で使用するために、免疫刺激に対する陽性を試験するペプチドエピトープを用いて、クローン性T細胞株を得て拡張させる。

【0005】

細胞治療方法も、腫瘍、ウイルス及び病原菌に対する宿主免疫反応を向上するために開発されている。これらの細胞療法は、多くの場合、腫瘍または病原体に関連する抗原に特異的な自己T細胞のエクスピボ活性化及び拡張も伴う。これらの処置の種類例としては、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)細胞の使用(米国特許第5,126,132号(Rosenbergに発行)を参照のこと)、細胞障害性T細胞(米国特許第6,255,073号(Cai, et al.に発行)及び米国特許第5,846,827号(Celis, et al.に発行)を参照のこと)、拡張腫瘍灌流リンパ節細胞(米国特許第6,251,385号(Teimanに発行)を参照のこと)及びさまざまな他のリンパ球調整物(米国特許第6,194,207号(Bell, et al.に発行)を参照されたい;米国特許第5,443,983号(Ochoa, et al.に発行);米国特許第6,040,177号(Riddell, et al.に発行);米国特許第5,766,920号(Babbitt, et al.に発行))が挙げられる。

【0006】

しかし、患者から容易に得られるサンプル中でのこのような抗原特異的T細胞の頻度は低い可能性がある。例えば、MS患者の末梢血中での自己反応性T細胞の頻度は、末梢血単核球約 $1/10^5 \sim 1/10^6$ (Ota et al. (1990) Nature 346: 183~7; Martin et al. (1990) J. Immunol. 145: 540~8)である。T細胞生成物を作製している間の自己反応性T細胞の患者サンプルをスクリーニングするときには、この点が課題となる。採血120mlでの典型的な収率は、全T細胞約100万だからである。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

この目的を達成するために、稀な反応性T細胞を検出し、かつ、頑強な方法でそれらが応答する免疫活性化エピトープを同定するにあたって、十分に感受性のあるアッセイを必要とする。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本明細書にて、サンプル中の抗原特定T細胞の検出方法及び抗原の免疫活性化エピトープの同定方法が開示される。本明細書にて開示したように、こうしたアッセイを開発するために、いくつかの方法を調査したところ、驚くべきことに、T細胞のマクロバルク培養物が依然として生存可能であることが判明した。したがって、本明細書にて開示された好ましいアッセイ形式では、T細胞を含むサンプルの「マクロバルク培養物」を使用して、サンプルを高濃度及び高密度でエピトーププールと共に培養し、このプールは、自己抗原のペプチドが重なっていることを含むことが好ましい。

10

【 0 0 0 9 】

概して、抗原特異的T細胞の検出方法及び抗原特異的T細胞が応答する免疫活性化エピトープの同定方法は、以下を含む；(a) 1つ以上のペプチドを含むエピトーププールを有するT細胞を含む対象由来のサンプルの少なくとも1つのマクロバルク培養物をインビトロでプライミングすることであって、エピトーププール中の各ペプチドは、異なる抗原断片であり；(b) エピトーププール中、ペプチドの少なくとも1つに特異的なT細胞により検出可能な放出が可能な十分な期間、マクロバルク培養物をエピトーププールにより再刺激することと、(c) マクロバルク培養物中に少なくとも1つの活性化サイトカインの存在の有無を検出すること、であって、培養物中の少なくとも1つの活性化サイトカインの存在により抗原特異的T細胞が検出され、エピトーププール中のペプチド(複数可)によってスパンされる抗原領域は、抗原特異的T細胞が応答する免疫活性化エピトープを含むと同定される。一実施形態では、複数のマクロバルク培養物を用いて、成果物を更に精製し、統計分析を行うことができる。好ましい実施形態では、エピトーププールは、少なくとも2つのペプチドを含み、各ペプチドは、エピトーププールにおいて少なくとも1つの他のペプチドと同一であるアミノ酸配列が重なっている領域を共有し、かつエピトーププール中のペプチドは、共に、抗原の連続的領域をスパンする。

20

30

【 0 0 1 0 】

一実施形態では、本方法は、以下を含む；(a) 少なくとも2つのエピトーププールを含むライブラリー由来の異なるエピトーププールを有するT細胞を含む対象由来のサンプルの複数のマクロバルク培養物のそれぞれをインビトロでプライミングすることであって、ライブラリー内の各エピトーププールは、それぞれが異なる抗原断片を含む1つ以上のペプチドを含み、(b) 十分な期間プライムされるエピトーププールにより、T細胞を含む各マクロバルク培養物を再刺激して、エピトーププール中、少なくとも1つのペプチドに特異的な活性化T細胞により、少なくとも1つの活性化サイトカインの検出可能な放出を可能にすることと、(c) 複数のマクロバルク培養物のそれぞれにおける活性化サイトカインの存在の有無を検出することとであって、マクロバルク培養物中の活性化サイトカインの存在により、抗原特異的T細胞を検出し、マクロバルク培養物をプライムし、再刺激するために使用されるエピトーププール中のペプチド(複数可)によってスパンされている抗原の領域はT細胞が応答する免疫活性化エピトープを含むと同定すること。好ましい実施形態では、エピトーププールは、少なくとも2つのペプチドを含み、各ペプチドは、エピトーププール中、少なくとも1つの他のペプチドと同一であるアミノ酸配列が重なっている領域を共有し、かつエピトーププール中のペプチドは、共に、抗原の連続的領域をスパンする。一実施形態では、エピトーププールのライブラリーは、抗原の少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%をスパンするペプチドを含む。

40

【 0 0 1 1 】

50

一実施形態では、マクロバルク培養物は、約 2×10^5 細胞 / mL / mm³ ~ 約 2×10^6 細胞 / mL / mm³ を含む。一実施形態では、マクロバルク培養物は、約 4×10^5 細胞 / mL / mm³ ~ 約 1×10^6 細胞 / mL / mm³ を含み、好ましい実施形態では、マクロバルク培養物は、約 5×10^5 細胞 / mL / mm³ を含む。

【0012】

サンプルは、哺乳類から入手することが好ましい。一実施形態では、サンプルは、げっ歯類から入手する。好ましい実施形態では、サンプルは、ヒトサンプルである。別の実施形態では、サンプルは、抗原提示分子を更に含み、これらは可溶性であるか、または抗原提示細胞によって発現され得る。好ましい実施形態では、サンプルは、末梢血単核球細胞のサンプルである。別の好ましい実施形態では、サンプルは、ヒト末梢血単核球細胞である。

10

【0013】

好ましい実施形態では、サンプルは、疾患を有する患者から入手し、抗原は疾患と関連がある。一実施形態では、疾患は感染症であり、抗原は、疾患関連感染性病原体から単離される。別の実施形態では、疾患は癌であり、抗原は関連腫瘍または腫瘍特異的抗原である。好ましい実施形態では、疾患は自己免疫疾患であり、抗原は自己免疫疾患関連自己抗原である。最も好ましくは、疾患は多発性硬化症であり、抗原はミエリンタンパク質である。一実施形態では、ミエリンタンパク質は、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリン稀突起膠細胞タンパク質及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

20

【0014】

ある実施形態では、ペプチドプール中の各ペプチドは、約 10 ~ 約 20 のアミノ酸長さ、好ましくは約 16 のアミノ酸長である。別の実施形態では、各ペプチドプールは 1 つ以上のペプチド類を含む。一実施形態では、各ペプチドプールは、少なくとも 2 つのペプチドを含み、ペプチド間でアミノ酸が重なっている領域は、長さ約 4 ~ 約 16、好ましくは 12 のアミノ酸長である。

【0015】

一実施形態では、マクロバルク培養物は、1 ~ 10 日間エピトーププールによってプライミングする。好ましい実施形態では、マクロバルク培養物は、少なくとも 5 日間エピトーププールによってプライミングする。

30

【0016】

一実施形態では、マクロバルク培養物は、追加の抗原提示細胞またはペプチド担持人工 APC の存在下にて、エピトーププールで少なくとも 12 時間再刺激する。好ましい実施形態では、マクロバルク培養物は、少なくとも 1 日間エピトーププールで再刺激する。

【0017】

一実施形態では、活性化サイトカインは、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 9、IL - 10、IL - 13、IL - 17、IL - 18、IL - 21、IL - 22、IL - 35、TNF 及び IFN からなる群から選択される。好ましい実施形態では、活性化サイトカインは IFN である。別の実施形態では、検出ステップは、2 つの活性化サイトカイン（例えば、IFN 及び TNF、IFN 及び IL - 6、または TNF 及び IL - 6）の存在の有無を検出することを含む。好ましい実施形態では、活性化サイトカイン（複数可）は、フローサイトメトリー分析、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、ビード系多重アッセイ及びサイトカイン捕捉アッセイからなる群から選択される方法によって検出される。最も好ましくは、活性化サイトカインは、ELISA により検出される。別の実施形態では、活性化サイトカイン（複数可）は、ビード系多重アッセイを介して検出される。

40

【0018】

また本明細書で開示されるのは、疾患治療用の組成物の作製方法であって、(a) 疾患を有する患者において抗原特異的 T 細胞を検出すること、及び本明細書で開示される方法により抗原特異的 T 細胞が応答する免疫活性化エピトープを同定することであって、T 細

50

胞を含むサンプルは患者から単離されることと、(b)同定された免疫活性化エピトープを有する患者から単離されたT細胞を伝播することを含む。一実施形態では、疾患は癌であり、抗原は関連腫瘍または癌の腫瘍特異的抗原である。本明細書では、こうして作製されたT細胞の組成物及び癌などの疾患の処置方法におけるこうした組成物の使用も開示される。このような使用は、治療的有効量のT細胞を含む組成物を癌患者に投与することを含む。

【0019】

一実施形態では、疾患処置のための組成物の作製方法は、最終のステップ(c)として伝播T細胞を減衰させること、を更に含む。一実施形態では、疾患は自己免疫疾患であり、抗原は自己免疫疾患関連自己抗原である。好ましい実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症であり、自己抗原はミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質及びミエリン稀突起膠細胞からなる群から選択される。本明細書では、こうして作製されたT細胞の組成物及び自己免疫疾患などの疾患の処置方法におけるこうした組成物の使用も開示される。好ましい実施形態では、本明細書に開示の方法によって作製した減衰T細胞を含む組成物を使用して、自己免疫疾患の処置を行う。このような使用には、治療的有効量の減衰T細胞を自己免疫疾患患者に投与することを含む。好ましい実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症であり、自己抗原はミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質及びミエリン稀突起膠細胞からなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】2つの播種密度での第4日目のPBMCによるCMV pp65誘導IFN 応答。

【図2】2つの播種密度での第6日目のPBMCによるCMV pp65誘導IFN 応答。

【図3】キラー細胞として、MSドナー011034PBMCを用いた抗-ミエリンペプチドIFN 活性。

【図4】キラー細胞として、MSドナー011054PBMCを用いた抗-ミエリンペプチドIFN 活性。

【図5】免疫優勢破傷風毒素ペプチドエピトープへの応答。IFN ELISpot 前の直接エクスピボ対マイクロ培養5日目。データは、四通りのELISpotウェルの中央値及びSDを示す。

【図6】IFN ELISpotにより第6日目に検出された健常ドナー03106抗-ミエリンペプチド免疫。データは、四通りのELISpotウェルの中央値及びSDを示す。対照：陰性対照。

【図7】IFN ELISpotにより第6日目に検出された健常ドナー03106抗-ミエリンペプチド免疫。データは、四通りのELISpotウェルの中央値及びSDを示す。対照：陰性対照。

【図8A】IFN ELISpotにより第6日目に検出されたMSドナー03102抗-ミエリンペプチド免疫。データは、四通りのELISpotウェルの中央値及びSDを示す。(左パネルアッセイ1、右パネルアッセイ2)対照：媒質中の単独での細胞。

【図8B】IFN ELISpotにより第6日目に検出されたMSドナー03102抗-ミエリンペプチド免疫。データは、四通りのELISpotウェルの中央値及びSDを示す。(左パネルアッセイ1、右パネルアッセイ2)対照：媒質中の単独での細胞。

【図9A】IFN ELISpotにより第6日目に検出されたMSドナー03103抗-ミエリンペプチド免疫。データは、四通りのELISpotウェルの中央値及びSDを示す。(左パネルアッセイ1、右パネルアッセイ2)対照：媒質中の単独での細胞。

【図9B】IFN ELISpotにより第6日目に検出されたMSドナー03103抗-ミエリンペプチド免疫。データは、四通りのELISpotウェルの中央値及びSDを示す。(左パネルアッセイ1、右パネルアッセイ2)対照：媒質中の単独での細胞。

【図10】MOGm16ペプチドプールに対する陽性免疫の検出に及ぼす播種密度及び解

10

20

30

40

50

離ステップの影響。未処置：マイクロチューブ及びELISpotアッセイの双方においてペプチドの不存在下で培養したPBMC。データは、ELISpotアッセイにプレATINGされた四通りのウェルの中央値及びSDを示す。

【図11】ELISpot「スポット」の形状及び寸法分布 - 高頻度の反応亢進T細胞の不正確な定量化同一の設定を用いて、3つのすべてのウェルの計数を行った。

【図12】MSドナー03171 - ミエリンペプチドプールに対する陽性応答を検出するためのELISpotとcell ELISAとの比較斜影線は、アッセイの検出上限を超え、このため、公式の定量化を行うことなく、陽性応答が示されるcell ELISAデータ点を示す。対照：対照。

【図13】MSドナー03172 - ミエリンペプチドプールに対する陽性応答を検出するためのELISpotとcell ELISAとの比較斜影線は、アッセイの検出上限を超え、このため、公式の定量化を行うことなく、陽性応答が示されるcell ELISAデータ点を示す。対照：対照。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、サンプル中の抗原特異的T細胞の検出方法、及び抗原特異的T細胞が応答する、及び/または特異的である抗原の免疫活性化エピトープ（複数可）の同定方法を提供する。本明細書では、驚くべきことに、免疫細胞のマクロバルク培養物（例えば、高密度で、かつ、互いに極めて接近して細胞を培養しているなど）は、免疫活性化エピトープと接触したとき、培養物中、稀な抗原特異性免疫細胞の検出可能な活性化を助長する環境を提供するという発見が開示される。本明細書で開示される方法は、一般に、1つ以上のペプチドを含むエピトーププールで、T細胞を含むサンプルのインビトロマクロバルク培養物をプライミングすることを含む。T細胞を含むマクロバルク培養物をエピトーププールで再刺激し、エピトーププール中の1つ以上のペプチドに特異的であるT細胞は、検出可能レベルの活性化サイトカインを分泌することができる。こうした活性化サイトカインの検出は、サンプル中の活性化T細胞の検出及びエピトーププール中のペプチドによってスパンされる抗原の領域が活性化T細胞の免疫活性化エピトープを含んでいるという判定と相関する。

【0022】

免疫系のT細胞は、例えば、げっ歯類の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）またはヒトにおけるヒト白血球抗原（HLA）など、抗原提示細胞（APC）に発現する抗原提示分子に錯体化されたペプチドを認識する。T細胞による抗原認識の特異性は、いくつかのパラメーターによって定義される：1）抗原提示分子に錯体化したペプチドへのT細胞受容体のアフィニティー；2）抗原ペプチドの一次配列；及び3）抗原ペプチド内での特定のアミノ酸組み合わせの相乗効果。抗原特異性が高いことがT細胞活性化の特徴であると一般に考えられている。したがって、本明細書で使用するとき、抗原特異的T細胞は、特異的抗原によって活性化されたT細胞またはそれらの免疫活性化エピトープを指す。

【0023】

本明細書で使用するとき、「エピトープ」としては、抗原提示分子と関連して、T細胞受容体への特異的結合が可能である抗原の任意のペプチド断片が挙げられる。エピトープ決定基とは、通常、アミノ酸、糖側鎖などの化学的表面活性分子群であり、また、通常、特定の電荷特性など、特定の3次元構造的な特性を有する。本明細書で使用するとき、「免疫活性化エピトープ」としては、免疫細胞受容体への特異的結合が可能であり、また、例えば、結合時にT細胞などの免疫細胞の活性化が可能である抗原の任意のペプチド断片が挙げられる。

【0024】

当業者は、T細胞の活性化は増殖をもたらすことを理解するであろう。したがって、本明細書に記載のエピトーププールによるT細胞を含むサンプルのプライミング及び再刺激の双方により、T細胞の増殖が刺激される。

【0025】

10

20

30

40

50

本明細書で使用するとき、「プライミング」とは、獲得免疫細胞とその特異的抗原との間での初回接触を意味する。したがって、インビトロプライミングは、エピトープによるT細胞のインビトロ初回刺激を意味する。好ましい実施形態では、少なくとも24時間、好ましくは少なくとも約2日~10日間、T細胞をペプチドプールによりプライミング(例えば、接触、インキュベート、培養など)する。最も好ましくは、T細胞は、ペプチドプールにより、5日間、プライミングする。

【0026】

免疫細胞は、抗原(またはそのエピトープ)によりプライミングし、その後、免疫細胞と抗原とを接触させ、本明細書では、この抗原は「再刺激」とも称される。好ましい実施形態では、少なくとも2時間、好ましくは少なくとも約12時間以上(例えば、24時間、48時間または72時間など)、T細胞をペプチドプールにより再刺激(例えば、接触、インキュベート、培養など)する。最も好ましくは、T細胞は、ペプチドプールにより、約1日間、再刺激する。

10

【0027】

本発明の別の態様では、目的とする対象から単離されたT細胞を含むサンプルを、本明細書に記載の方法によって同定された免疫活性化エピトープと接触させて、エピトープが誘導される抗原に特異的なT細胞を伝播する。一実施形態では、約3~14日間、好ましくは少なくとも5日間、サンプルを免疫活性化エピトープと接触させる。最も好ましくは、サンプルは、治療的有効量のT細胞を提供するのに十分な時間、免疫活性化エピトープと接触させる。

20

【0028】

マクロバルク培養物

【0029】

本発明の一態様では、T細胞を含むサンプルのマクロバルク培養物はペプチドと接触させ、T細胞のインビトロプライミング及び/または再刺激が可能になる。本明細書で使用するとき、「マクロバルク培養物」とは、高濃度及び密度で培養している細胞を意味する。このような高濃度及び密度は、例えば、平底またはU型底のプレートまたはフラスコではなく、小容量培地及び培養チューブを用いて達成することができる。例えば、24ウェルプレートに 1×10^6 細胞/mLをプレーティングすることとは対照的に、1.5 mL培養チューブにプレートさせて、細胞の密度を増加させてもよい。代表的実施形態において、少なくとも、 1×10^6 細胞、好ましくは少なくとも 2.5×10^6 細胞、最も好ましくは少なくとも 3×10^6 細胞の培地、少なくとも1 mL、好ましくは少なくとも1.5 mLに懸濁し、例えば、1.5 mL培養チューブ、最も好ましくは5 mL培養チューブなどの小型培養チューブで培養する。

30

【0030】

好ましい実施形態では、サンプルのマクロバルク培養物は、約 2×10^5 細胞/mL/ mm^3 ~約 2×10^6 細胞/mL/ mm^3 を含む。一実施形態では、マクロバルク培養物は、約 4×10^5 細胞/mL/ mm^3 ~約 1×10^6 細胞/mL/ mm^3 を含む。好ましい実施形態では、マクロバルク培養物は、約 5×10^5 細胞/mL/ mm^3 を含む。マクロバルク培養物の使用に加えて、本明細書に記載されるように、細胞培養のために(例えば、T細胞のペプチドによるプライミング、再刺激、及び伝播など)の標準技術を使用する。

40

【0031】

T細胞を含むサンプル及び/またはT細胞は、例えば、げっ歯類、ヒトなどの任意の哺乳類から単離されてもよい。好ましい実施形態では、サンプルは、疾患を有する哺乳類から単離されるか、またはヒトの疾患モデルを提供する。更に好ましい実施形態では、サンプルは、ヒト、最も好ましくは、これらに限定されないが、感染症、癌または自己免疫疾患などの疾患に罹患しているヒトから単離される。

【0032】

T細胞を含むサンプル及び/またはT細胞は、哺乳類、哺乳類の細胞のインビトロ培養、細胞の凍結サンプルなど由来の新鮮サンプルとして単離させることができる。好適なサ

50

ンプルとしては、例えば、血液、リンパ液、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、膵臓、扁桃、胸腺、関節、滑液及びT細胞が誘導され得る他の組織を挙げることができる。好ましい実施形態では、T細胞を含むサンプルは、末梢血単核球(PBMC)として単離される。PBMCは、遠心分離法(例えば、軟膜からなど)によって、密度勾配遠心法(例えば、フィコール・ハイパックを介して)によって、パンニング法、アフィニティー単離法、細胞選別法(例えば、1つ以上の細胞表面マーカーに特異的な抗体を用いて)によって、及び富化したPBMC及び/またはT細胞をもたらす他の技術によって部分的に精製されてもよい。

【0033】

代表的な実施形態では、PBMCは、標準フィコール・ハイパック方法により血液サンプルから単離される。血液サンプルは、ヘパリンで処理し、Ficoll溶液に入れた。遠心分離後、回収した細胞はPBSまたはT細胞培養培地で洗浄することができる(例えば、2mM L-グルタミン、100µg/mlペニシリン/ストレプトマイシン、1mMピルビン酸ナトリウム及び15%貯留ヒト血清、AIM-V; OpTimizer CTSなどを補充したRPMI 1640)。既知の技術を使用して、洗浄した細胞は、細胞培養培地で再懸濁するか、または培養チューブに入れて、本明細書に記載されるように、マクロ培養物を形成してもよい。好ましい実施形態では、本明細書で開示される方法は、約 4.0×10^5 PBMC/mL/mm³ ~ 約 2×10^6 PBMC/mL/mm³の濃度及び密度で末梢血単核球細胞のマクロバルク培養物をプライミングすることを含む。好ましい実施形態では、本明細書で開示される方法は、約 4.5×10^5 PBMC/mL/mm³の濃縮及び密度でT細胞を含む末梢血単核球細胞のマクロバルク培養物をプライミングすることを含む。

【0034】

ペプチド、エピトーププール及びライブラリー

【0035】

上記のように、本明細書に開示の方法は、T細胞を含むサンプルのマクロバルク培養物をペプチド(例えば、プライミング及び再刺激ステップ中、エピトーププールの一部であってもよい)と共にインキュベートすることを含む。概して、ペプチドは、約9のアミノ酸長~約20のアミノ酸長以上であってもよい。好ましい実施形態では、ペプチドは、約16のアミノ酸である。エピトーププールまたはエピトープライブラリー中の各ペプチドは、異なる抗原断片(例えば、連続抗原断片と同一のアミノ酸配列を共有する)であってもよい。一実施形態では、各ペプチドは、抗原の連続断片と少なくとも75%、例えば、約80%、90%、95%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を共有し、該断片は、少なくとも7のアミノ酸長であってもよく、また、抗原の全長未満である。

【0036】

ペプチドは、任意の好適な抗原から誘導することができる。特定の実施形態において、抗原は、少なくとも約4キロダルトン(kD)、少なくとも約6kD、または少なくとも約10kDである。好適な抗原としては、例えば、病原菌から誘導される抗原、自己免疫疾患関連抗原、さまざまな癌と関連した腫瘍関連または腫瘍特異的抗原などを挙げることができる。

【0037】

例示的な実施形態では、抗原は、これらに限定されないが、以下などの腫瘍関連または特定の癌関連の腫瘍特異的抗原である；サイトケラチン、特にサイトケラチン8、18及び19；上皮細胞膜抗原(EMA)；ヒト胚抗原(HEA-125)；MBR1、MBR8、Ber-EP4、17-1A、C26及びT16などのヒト乳脂肪球；デスミン；筋特異的アクチン；胎盤アルカリリン酸分解酵素；ベータヒト柔毛膜性生殖腺刺激ホルモン；胎児性タンパク質；前立腺特異抗原(PSA)；結腸硬癌の癌胎児性抗原；HMB-45；クロモグラニン-A；シナプトフィジン、チロシナーゼなど。

【0038】

10

20

30

40

50

加えて、代表的実施形態では、抗原は病原体から誘導される。非限定例としては、単純ヘルペス - 2 ウイルス V P 1 6、破傷風毒素、インフルエンザ血球凝集素、H I V g a g、サイトメガロウイルス p p 6 5、H B V 表面抗原及び他のウイルスのエンベロープ及びコートタンパク質などが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

好ましい実施形態では、抗原は、自己免疫疾患関連自己抗原である。自己抗原の非限定的例としては、ミエリン塩基性蛋白質、プロテオリピドタンパク質、ミエリン稀突起膠細胞タンパク質、アクアポリン 4、血小板膜糖蛋白 I I b - I I I a 及び I b - I X、インスリン、プロインスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素 (G A D)、G A D 6 5、G A D 6 7、熱ショックタンパク質 6 5 (h s p 6 5)、膵島細胞抗原 6 9 (I C A 6 9)、膵島細胞抗原関連タンパク質チロシンホスファターゼ (P T P)、G M 2 - 1 ガングリオシド、T e p 6 9、膵島細胞タンパク質チロシンホスファターゼ及び膵島細胞タンパク質チロシンホスファターゼ誘導 3 7 k D a の自己抗原 (I A - 2 など)、p h o g r i n、ヒト軟骨細胞糖タンパク質 - 3 9、コラーゲン、コラーゲン I I 型、軟骨リンクタンパク質、エズリン、ラディキシン、モエシン、ミコバクテリウム熱ショックタンパク質 6、d e s m o g l i e n、- 2 - G P I、K u (p 7 0 / p 8 0) 自己抗原、またはその 8 0 k d のサブユニットタンパク質、核自己抗原 L a (S S - B) 及び R o (S S - A)、プロテアソーム - 型サブユニット C 9、中心体自己抗原 P C M - 1、多発筋炎 - 強皮症自己抗原 (P M - S c 1)、自己抗原 C E N P - A、U 5、核小体 U 3 - 及び T h (7 - 2) リボヌクレオ蛋白質、リボソーム蛋白質 L 7、h P o p 1、核マトリックス抗原由来の 3 6 k d のタンパク質、甲状腺ペルオキシダーゼ、及び甲状腺刺激ホルモン受容体、ヒト T S H 受容体、アセチルコリン受容体、筋受容体キナーゼ、または、他の任意の好適な自己抗原が挙げられる。

10

20

【 0 0 4 0 】

長い抗原については、重なりペプチドは、ペプチドプールに入れ、少なくとも 2 つのペプチドプールのライブラリーを形成してもよい。ペプチドプールは、一般に、1 つ以上のペプチドを含む。一実施形態では、エピトーププールのライブラリーは、抗原の少なくとも 1 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % を共にスパンするペプチドを含む。好ましい実施形態では、エピトーププールのライブラリーは、抗原の少なくとも 9 0 %、更に好ましくは少なくとも 9 5 %、最も好ましくは少なくとも 9 8 % をスパンするペプチドを含む。

30

40

【 0 0 4 1 】

ペプチドプールのペプチドは、典型的には、必須ではないが、約 2 ~ 約 1 5 以上のアミノ酸残基が重なっている (すなわち、アミノ酸配列の同一領域を共有する)。好ましい実施形態では、ペプチドプールのペプチドは、少なくとも 4 つのアミノ酸が重なっている。別の実施形態では、ペプチドプールのペプチドは、約 1 0 のアミノ酸が重なっている。好ましい実施形態では、重なりペプチドは、約 1 2 のアミノ酸が重なっている。例えば、ペプチド「 n 」は、抗原の残基 1 ~ 1 6 であってもよく、ペプチド「 n + 1 」は、抗原の残基 4 ~ 2 0 などであってもよい。しかし、当業者は、ペプチドの長さ及びペプチド間で重なる残基量は、抗原の長さ及び / または対象の領域、必要な解像度などに依存して変化し得ることを理解するであろう。

【 0 0 4 2 】

ペプチドをプールに入れる基準は、当業者によって理解されるように、変更してもよい。例えば、一実施形態では、少なくとも約 2 または約 3 ~ 約 8 の重なりペプチド (例えば、抗原の連続領域をスパンしているなど) のプールが提供される。一実施形態では、2 つの重なりペプチドのプールが提供される。好ましい実施形態では、少なくとも 6 つの重なりペプチドのプールが提供される。

【 0 0 4 3 】

他の実施形態では、ペプチドは、各プール中のペプチドが分かるように、または測定できるように、他の任意の好適な基準によってプールに分けられる。一実施形態では、プー

50

ル中のペプチドが共に抗原の異なる連続領域にスパンするように、ペプチドをプールに分ける。別の実施形態では、ペプチドは、プール中のペプチドが抗原の異なる連続領域を共にスパンし、かつ第1のプール中の少なくとも1つのペプチドが第2のプール中の少なくとも1つのペプチドと同一の重なりアミノ酸配列の領域を共有し、第1及び第2のプール中のペプチドが、第1のプール中のペプチドによってスパンされた抗原の連続領域及び第2のプール中のペプチドによってスパンされている抗原の連続領域をいずれも含む抗原の連続領域を共にスパンするように、更に選別される。

【0044】

いずれかの実施形態では、ペプチドは、さまざまな方法で調製することができる。例えば、ペプチドは、自動ペプチド合成装置を使用して合成することができる。また、ペプチドは、手動により合成してもよい。あるいは、ペプチドは、タンパク質分解的切断（例えば、トリプシン、キモトリプシン、パイン、V8プロテアーゼなどによる）または特定の化学的切断（例えば、臭化シアンによる）により作製することができる。また、ペプチドは、インビボまたはインビトロでの重なり核酸配列を発現させることによって合成ことができ、各核酸配列は、特定のペプチドをコードする。

10

【0045】

ペプチドは、T細胞を含むサンプルのマクロバルク培養物に接触させる前に、任意により単離させ、かつ精製することができる。好適な方法としては、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなど）、遠心分離法、示差溶解度またはペプチドまたはタンパク質の精製の他の任意の好適な技術が挙げられる。ある実施形態では、ペプチドは、標識して（例えば、放射性ラベル、発光ラベル、化学発光ラベル、アフィニティタグなど）、ペプチドの精製を容易にすることができる。

20

【0046】

別の態様では、候補免疫活性化エピトープを同定する方法が提供される。ある実施形態では、候補免疫活性化エピトープは、候補エピトープを同定するために、コンピュータ利用アルゴリズムを使用して同定してもよい。このようなコンピュータプログラムとしては、例えば、TEPITOPEプログラム（Hammer et al., Adv. Immunol. 66:67-100 (1997); Sturniolo et al., Nat. Biotechnol. 17:555-61 (1999); Manicci et al., J. Exp. Med. 189:871-76 (1999); de Lalla et al., J. Immunol. 163:1725-29 (1999); Cochlovius et al., J. Immunol. 165:4731-41 (2000)を参照されたい）、そのすべての内容全体を参照によって援用される）並びに他のコンピュータ利用アルゴリズムが挙げられる。

30

【0047】

候補エピトープの同定用のコンピュータ利用アルゴリズムにより、例えば、非常に大きいタンパク質中、関連タンパク質群（例えば、相同遺伝子、オルソログス遺伝子または多型変異型）中、非関連タンパク質の混合物中、組織または器官のタンパク質中、生命体のプロテオーム中の単一のタンパク質において候補エピトープを同定することができる。この方法を使用して、潜在的T細胞エピトープを同定するための効率的かつ感受性のある特異的方法として、既知の候補分子標的の分析に加えて、発現タンパク質（例えば、推定されたオープンリーディングフレームまたはcDNAライブラリー由来）の配列情報に基づいて、錯体組織または生命体を調べることができる。

40

【0048】

候補エピトープの同定後、候補エピトープ（複数可）に対応するペプチドまたはペプチドプールが形成され得る。例えば、候補エピトープが同定されると、候補エピトープまたはそれらの一部をスパンしている重なりペプチドを調製して、T細胞の刺激を確認ことができ、必要に応じて、エピトープの同定を改良することができる。あるいは、候補エピトープの同定用にコンピュータ利用アルゴリズムを使用して同定した複数の候補エピト

50

ープを含むペプチドプールを調製することができる。

【0049】

ペプチドによるT細胞を含むマクロバルク培養物の刺激

【0050】

別の態様では、T細胞を含むサンプルのマクロバルク培養物をペプチドプールに接触させて、エピトープ特異的方法で、プール中の少なくとも1つのペプチドがT細胞に結合し、刺激しているか判断する。このような接触は、プライミングステップ、再刺激ステップ及び伝播ステップ中に発生し得る。いくつかの実施形態では、複数のマクロバルク培養物を使用する。

【0051】

概して、目的とする対象から単離させたT細胞を含むサンプルのマクロバルク培養物は、ペプチドと共に培養し、これは、すなわち、ペプチドプールのライブラリーの一部であるペプチドプール内であってもよい。好ましい実施形態では、対象から単離されたT細胞の正確な文脈では、マクロバルク培養物は、ペプチドを提示することができる抗原提示分子を更に含み、可溶性であるか、または細胞に発現してもよい。

【0052】

いくつかの実施形態では、T細胞は、エピトーププールまたは免疫活性化エピトープの存在下においてT細胞培地で約1~10日間またはそれ以上、プライミング、再刺激、伝播、培養、接触、インキュベートなどを施して、エピトープが誘導される抗原に特異的なT細胞の増殖を刺激する。培養及び/またはT細胞の生存度(例えば、血清、抗生物質、サイトカイン、共刺激物質受容体アゴニストなど)のために、他の構成成分を任意により培地に補充してもよい。

【0053】

T細胞を含むサンプルは、好適な結合条件下でペプチドプール/免疫活性化エピトープと接触させる。一実施形態では、結合条件は、任意の好適なT細胞培地(例えば、RPMI 1640、AIM-V、Optimixer CTS培地)、リン酸塩バッファ生理食塩水、ダルベッコリン酸塩バッファ生理食塩水、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、ダルベッコ改変イーグル培地、Iscove培地などで37である。培養及び/またはT細胞の生存度(例えば、血清、抗生物質、サイトカインなど)のために、任意により他の構成成分を培地に補充してもよい。ペプチドの適切な濃度は、滴定によって測定され得る。一実施形態では、最終濃度約2ng/mL~約100µg/mLでペプチドプール中の各ペプチドまたは免疫活性化エピトープが添加される。一実施形態では、特に、提示前に更なる工程を必要としないペプチドでは、各ペプチドは20~200ng/mLの濃度で添加される。より大きいペプチドについては、各ペプチドは、約10µg/mL~約50µg/mL、最も好ましくは20µg/mLの濃度で、添加される。

【0054】

抗原特異的T細胞の検出及び免疫活性化エピトープの同定

【0055】

抗原特異的T細胞及び結合する免疫活性化エピトープは、T細胞の活性化を検出することによって同定され得る。異なるペプチドプールと接触するとき、対象由来のT細胞を含むサンプルの異なるマクロバルク培養物の活性化状態を比較することによって、抗原の免疫活性化エピトープを含有する1つ以上のペプチドプールが同定され得る。一実施形態では、マクロバルク培養物中の活性化T細胞の検出により、マクロバルク培養物と共にインキュベートしたエピトーププール中のペプチドによってスパンされている抗原領域が、活性化T細胞の免疫活性化エピトープを含むと識別する。

【0056】

ある実施形態では、1つ以上の追加のスクリーニングラウンド(またはサイクル)を実施し、同定ペプチドプール(複数可)中の各ペプチドを使用して、T細胞を含むサンプルのマクロバルク培養物のスクリーニングを行う。個々のペプチドの分析によって、免疫活性化エピトープ(複数可)は、ペプチド(複数可)として、または1つ以上のペプチドの

10

20

30

40

50

一部として同定され得る。関連実施形態では、任意により、追加のペプチドを合成して、エピトープ（複数可）を更に定義することができる。例えば、切断ペプチドを調製して、エピトープの同定を改良することが可能である。

【0057】

T細胞活性化は、複数の標準活性化基準（例えば、T細胞増殖の測定、活性化サイトカインの放出、細胞表面活性化マーカーの発現など）のいずれかを検出する及び/または測定するために、既知の方法を使用して測定され得る（例えば、Novak et al., J. Immunol. 166:6665-70 (2001); Kwok et al., J. Immunol. 164:4244-49 (2000); Fraser et al., Immunology Today 14:357 (1993); Novak et al., International Immunology 13:799 (2001)を参照されたい；その開示は、本明細書に参照によって援用される）。

10

【0058】

好ましい実施形態では、活性化は、既知の活性化サイトカインの存在を検出することによって決定される。非限定例としては、IL-2、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17、IL-18、IL-21、IL-22、IL-35、TNF及びIFN、例えば、IL-2、IFN、TNFなどが挙げられる。好ましい実施形態では、活性化は、1つの活性化サイトカイン、好ましくはIFNの存在を検出することによって決定される。

20

【0059】

別の実施形態では、活性化は、少なくとも第2の既知の活性化サイトカインの存在を検出することによって決定される。第1の活性化サイトカインの活性化レベルが、存在すると考えられるしきい値未満である場合、第2の活性化サイトカインの有無が検出される。このような実施形態では、活性化は、第1及び第2の活性化サイトカインの存在を検出することによって決定され得る。

【0060】

活性化サイトカインの活性化レベルは、陰性対照培養物（例えば、陰性対照ペプチドとインキュベートしたか、またはペプチドの非存在下でインキュベートしたサンプルのマクロバルク培養物）との比較によって測定されてもよい。概して、活性化サイトカインの活性化レベルは、本明細書に開示の方法によりプライミングされ、かつ再刺激されるマクロバルク培養物の上清中の活性化サイトカインの濃度を陰性対照としてインキュベートしたサンプルのマクロバルク培養物の上清中の活性化サイトカインの濃度と比較することによって測定され得る。活性化レベルは、陰性対照を上回る倍加に関して測定されてもよい。例えば、濃度の1.5倍増は、活性化レベル1.5であると考えられるか、または陰性対照の10倍増は、活性化レベル10と考えられ得る。一実施形態では、その活性化レベルが少なくとも約1.2、（例えば、約1.5、約1.8、約2、約2.5、約5、約7.5及び好ましくは少なくとも約10）である場合、活性化サイトカインの存在が測定される。別の実施形態では、第1活性化サイトカイン及び第2の活性化サイトカインの累積活性化レベルが、少なくとも約1.2、（例えば、約1.5、約1.8、約2、約2.5、約5、約7.5及び好ましくは少なくとも約10）に到達する場合、第1及び第2の活性化サイトカインが存在していると判断される。

30

40

【0061】

例示的实施形態では、活性化サイトカインの存在の有無は、酵素結合抗体、例えば、酵素結合免疫吸着スポット（ELISPOT）及び酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を使用して検出する。好ましい実施形態では、活性化は、ELISAを用いて測定される。別の好ましい実施形態では、活性化サイトカインの存在の有無は、ビード系アッセイを用いて検出する。

【0062】

活性化T細胞を含む組成物及び疾患の処置に同組成物を使用する方法

【0063】

50

対象中の抗原特異的 T 細胞の検出時及び応答する免疫活性化エピトープの同定時、免疫活性化エピトープは、例えば、疾患の処置に使用するための、抗原特異的 T 細胞を含む組成物の製造方法で使用することができる。

【 0 0 6 4 】

したがって、本明細書に提供するのは、抗原特異的 T 細胞を含む組成物の製造方法である。本方法は、(a) 疾患を有する患者内において抗原特異的 T 細胞を検出すること、及び本明細書に開示の方法で抗原特異的 T 細胞が応答する免疫活性化エピトープを同定することであって、T 細胞を含むサンプルは患者から単離され、(b) 同定された免疫活性化エピトープを有する患者から単離された T 細胞を伝播することを含む。一実施形態では、T 細胞を伝播して、それを必要とする患者への投与用に治療的有効量の T 細胞を提供する。

10

【 0 0 6 5 】

「治療的有効量」または「有効量」は、疾患、障害または病態を治療するために対象に投与したとき、疾患、障害または病態のこうした治療に十分に影響を及ぼす、組成物、化合物、治療法、処置過程の量を意味する。「治療的有効量」は、組成物、化合物、治療法、処置過程、疾患、障害または病態、及びその処置予定の対象の重症度、年齢、重量などに依存して変化し得る。別の実施形態では、本方法は、最終ステップとして、T 細胞を減衰させるステップを更に含む。

【 0 0 6 6 】

また、本明細書においては、上記の方法により作製された抗原特異的 T 細胞を含む組成物も提供される。一実施形態では、本組成物は減衰した抗原特異的 T 細胞を含む。好ましい実施形態では、組成物は、治療的有効量の抗原特異的 T 細胞を含んで(これは減衰されていてもよく)、癌、感染症、及び自己免疫疾患からなる群から選択される疾患が処置されてもよい。

20

【 0 0 6 7 】

当業者は、こうした組成物は、癌及び感染症の処置並びに T 細胞が減衰しているときは自己免疫疾患の処置において特定の有用性が明らかになり得ることを理解するであろう。こうした方法は、本明細書に記載のとおり、治療有効量の抗原特異的 T 細胞を含む組成物を患者に投与することを含む。これらの組成物については、抗原特異的 T 細胞は検出され、免疫活性化エピトープは本明細書記載の方法により同定され、抗原は、疾患に関連している。好ましい実施形態では、プライミングステップ、再刺激ステップ及び伝播ステップ用の T 細胞を含むサンプルは、投与される組成物が自己 T 細胞を含むように、処置される予定の患者から単離させる。

30

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、患者は癌を有し、本明細書に開示の方法によって同定された免疫活性化エピトープは、腫瘍関連または癌と関連する腫瘍特異的抗原から誘導される。特定の目的の癌は、腫瘍関連または腫瘍特異的抗原を提示する癌である。このような抗原は、異常な高レベルで、一般的でない文脈で存在してもよいが、または変異形態であってもよい。腫瘍抗原に特異的な自己 T 細胞は、腫瘍細胞に対する宿主 T 細胞応答の一部として投与してもよい。

40

【 0 0 6 9 】

腫瘍抗原の例としては、癌抗原として、サイトケラチン、特にサイトケラチン 8、18 及び 19 が挙げられる。上皮膜抗原 (E M A)、ヒト胚性抗原 (H E A - 1 2 5)、ヒト乳脂肪球、M B r 1、M B r 8、B e r - E P 4、1 7 - 1 A、C 2 6 及び T 1 6 も既知の癌抗原である。デスミン及び筋特異的アクチンは、筋原性肉腫抗原である。胎盤アルカリホスファターゼ、ベータ - ヒト繊毛性性腺刺激ホルモン及びアルファ - 胎児性タンパクは、絨毛性腫瘍及び細菌細胞腫瘍抗原である。前立腺特異的抗原は、前立腺癌抗原、結腸腺癌の癌胎児性抗原である H M B - 4 5 及びチロシナーゼは、黒色腫関連抗原である。クロモグラニン - A 及びシナプトフィジンは、神経内分泌腫瘍及び神経外胚葉腫瘍の抗原である。特に興味深いのは、壊死部分を有する腫瘤を形成する浸潤性腫瘍である。

50

【0070】

例えば、化学療法及び放射線治療などの多くの従来の癌療法により、リンパ球集団が激しく低減する。対象の療法によりこの免疫抑制をある程度軽減し、好ましい併用処置過程では、対象治療の前または後に、こうしたリンパ球毒性療法を使用する。

【0071】

上記の組成物は、更に、病原体への宿主応答の一部として、投与されてもよい。宿主抗ウイルス性機構が上手く働かない場合は、特定のウイルスによる感染症は慢性になる。このような感染症は、長年、または、感染宿主の生存期間に渡って持続し得るか、多くの場合重篤な疾患となる。重篤な罹患及び早期の死に関連する慢性感染としては、2つのヒト肝炎ウイルス、肝炎Bウイルス(HBV)及び肝炎Cウイルス(HVC)を伴う感染症であって、慢性肝炎、肝硬変及び肝癌を引き起こす。人における他の慢性ウイルス感染としては、ヒトレトロウイルス、AIDSを引き起こすヒト免疫不全ウイルス(HIV-1及びHIV-2)、及びT細胞白血病及び脊髄障害を引き起こすヒトTリンパ向性ウイルス(HTLV-1及びHTLV-2)を有する感染症が挙げられる。単純ヘルペスウイルス(HSV)タイプ1及び2、EBウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)及びヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)を含むヒトヘルペスウイルスによる感染症は通常、宿主機構によって根絶されることはない。病原性原虫(例えば、トリパノソーマ、マラリア及びトキソプラズマ・ゴンディ)、細菌(例えば、マイコバクテリア、サルモネラ菌及びリステリア)、及び菌(例えば、カンジダ)など細胞内で複製される他の病原体による感染症が、宿主防衛機構により除去することができない場合にも、慢性となり得る。

10

20

【0072】

本明細書に開示の組成物は、T細胞が、病原体から誘導される抗原の同定された免疫活性化エピトープに特異的であるような、慢性病原体感染などの患者に投与することができる。種々のこのような抗原は当技術分野において既知であり、病原体の単離または組換え法による発現で利用可能である。例としては、HIV gp120、HBV表面抗原、ウイルスのエンベロープ及びコートタンパク質などが挙げられる。

【0073】

上記の組成物が減衰したT細胞を含むとき、こうした組成物は、T細胞免疫療法として、それを必要とする患者に投与してもよい。一実施形態では、患者は自己免疫疾患を有し、本明細書に開示の方法によって同定された免疫活性化エピトープは、自己免疫疾患関連自己抗原抗原から誘導される。

30

【0074】

自己免疫疾患の非限定例としては、多発性硬化症、関節リウマチ、自己免疫ブドウ膜網膜炎、糖尿病、神経炎、多発性筋炎、乾癬、白斑、シェーグレン症候群、自己免疫性膵炎、炎症性腸疾患(例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎)、腹腔疾患、糸球体腎炎、強皮症、サルコイドーシス、自己免疫性甲状腺疾患(例えば、橋本甲状腺炎及びグレーブス病)、重症筋無力症、アディソン病、尋常性天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変症、悪性貧血及び全身性エリテマトーデスが挙げられる。好ましい実施形態では、自己免疫疾患は、多発性硬化症である。

40

【0075】

自己免疫疾患の免疫療法用のT細胞の拡張に有用な自己抗原の例としては、これらに限定されないが、多発性硬化症用のミエリンタンパク質(例えばミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質(PLP)、及びミエリン稀突起膠細胞糖蛋白質)が挙げられる。

【0076】

強皮症、全身性硬化症及び全身性エリテマトーデスでは、自己抗原としては、例えば、-2-GPI、Ku(p70/p80)またはその80-kdサブユニットタンパク質、核自己抗原La(SS-B)及びRo(SS-A)、プロテアソーム型サブユニットC9、中心体自己抗原PCM-1、多発性筋炎-強皮症自己抗原(PM-Sc1)、自己

50

抗原 CENP - A、U5、核小体U3 - 及びTh (7 - 2) リボ核タンパク質、リボソームタンパク質L7、hPop1及び核マトリックス抗原由来の36 - kdタンパク質が挙げられる。

【0077】

皮膚の自己免疫疾患について、有用な抗原としては、これらに限定されないが、450kdのヒト表皮自己抗原、230kd及び180kdの水疱性類天疱瘡抗原、落葉状天疱瘡抗原(デスマグレイン1)、尋常性天疱瘡抗原(デスマグレイン3)、BPAG2、BPAG1、タイプVIIコラーゲン、瘢痕性類天疱瘡患者のサブセット中における168 - kDaの粘膜抗原及び218 - kd核タンパク質(218 - kd Mi - 2)が挙げられる。

10

【0078】

インスリン依存性糖尿病関連自己抗原としては、これらに限定されないが、インスリン、プロインスリン、GAD65及びGAD67、熱ショックタンパク質65(hsp65)、膵島細胞抗原69(ICAG9)、膵島細胞抗原関連タンパク質 - チロシンホスファターゼ(PTP)、GM2 - 1ガングリオシド、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)、膵島細胞抗原(ICAG9)、Tep69、膵島 - 細胞タンパク質チロシンホスファターゼ及びIA - 2などから誘導される37 - kDaの自己抗原及びフォグリンが挙げられる。

【0079】

関節リウマチ関連自己抗原としては、これらに限定されないが、ヒト軟骨細胞糖タンパク質 - 39、コラーゲン、コラーゲンタイプII、軟骨リンクタンパク質(cartilage link protein)、エズリン、ラディキシン、モエシン及びマイコバクテリア熱ショックタンパク質6が挙げられる。

20

【0080】

自己免疫性甲状腺疾患関連自己抗原としては、非限定例として、甲状腺ペルオキシダーゼ、及び甲状腺刺激ホルモン受容体、及びヒトTSH受容体が挙げられる。

【0081】

重症筋無力症関連自己抗原としては、これらに限定されないが、アセチルコリン受容体及び筋受容体キナーゼが挙げられる。

【実施例】

30

【0082】

実施例1：抗原特異的T細胞応答の誘導に関する培養環境、培養時間の評価。マイクロ培養後の稀な抗原特異的T細胞の検出するための高感度法としてのIFN ELISpotの評価、及び抗原特異的免疫を検出するための培養第6日目の従来のELISAの評価及びエピトーププロファイリングアッセイの確立。

【0083】

実施例1.1：材料と方法

【0084】

組織培養培地

【0085】

40

方法を開発している期間を通して、完全Optmizer CTS培地(Life Technologies)が使用され使用前に、2容積%で加熱不活性化貯留ヒトAB血清(Valley Biomedical)を補充し、L - グルタミン(Life Technologies)を最終濃度2mMになるまで補充した。製造者の指示によって、再構築培地の使用期間を1ヶ月に設定した。

【0086】

末梢血単核球(PBMC)

【0087】

末梢血単核球(PBMC)は、Key Biologies, Memphis, TNで獲得した健常ドナーのアフェレーシス生成物から得た。MSドナー由来のPBMCは、I

50

R B承認OpexaプロトコールOP - BD - 007にて、臨床部位で採血として120 mlを収集した。対象動員、スクリーニング及び採血は、次に述べる2つの臨床部位から収集した：Dr Gazda, Integra Clinical Research, LLC, San Antonio, TX及びDr Fox, Central Texas Neurology Consultants, Round Rock, TX。初期の方法開発には、Opexaプロトコール2005.00, Phase 2b臨床治験指定「TERMS」で得た保管されたPBMCも使用した。

【0088】

1:2希釈の原料物質/リン酸塩バッファ生理食塩水(PBS)にてアフレーシス及び全血からPBMC富化を得て、複数の希釈生成物の30mlアリコートに50ml円錐形チューブに入れ、それぞれは15mlフィコール-ハイパックプレミアム(GE Healthcare)を含有する。フィコール勾配は、20分間、800gで遠心分離にかけた。単核球は、各チューブの界面から収集し、貯留し、1:5でPBS中に希釈し、300gで10分間遠心分離することにより、PBMCを洗浄した。製造者の指示書を使用して、細胞を50mlPBSに再懸濁し、数え、方法開発で使用したか、またはCS10凍結防御物質(BioLife)中 5×10^7 /mlまたは 2×10^8 /mlのPBMCで凍結保存した。マイナス80にて一晩、速度を制御して凍結するために、Coolcell(Biocision)に移動させる前に、細胞をCoolbox(Biocision)で2~8に維持した。長期保管用にPBMCを気相液体窒素に移動させた。

10

【0089】

全血またはアフレーシス生成物由来の凍結保存PBMCは、37の水浴にて、細胞の4つ以下のバイアルの急速解凍により液体窒素保管から収集し、OptimizertCTS完全培地50mlで希釈した。10ml完全OptimizertCTS培地に再懸濁する前に、細胞を250gで10分間遠心分離にかけ、その後、数を数え、下流の方法開発のために使用した。

20

【0090】

サイトメガロウイルス(CMV)リコール応答を用いるマイクロ培養アッセイの調査

【0091】

アフレーシスにより、プレスクリーニングしたHLA-A2陽性、抗-CMV免疫グロブリン反応性の健常ドナーからPBMCを収集した。CMVpp65(NLVPMVA TV)由来の最適化HLA-A2結合9-merペプチドは、20IU/ml IL-2(R&D systems)を補充した完全OptimizertCTS培地中、200ng/mlの濃度で利用し、3日間または5日間のいずれかで、1mlマイクロチューブでPBMCを刺激した(350µlに対して 1×10^6 または 1×10^6 /ml)。培養の第3日目または第5日目のいずれかに200ng/mlペプチドを添加することにより、マイクロ培養を再刺激した。24時間ペプチドパルス後、上清を収集し、サンドイッチELISA法により、IFN 含量のアッセイを行った。

30

【0092】

得られたMSドナーPBMCを用いた、マイクロ培養物中での抗-ミエリン免疫の調査

【0093】

初期の開発では、MBP、MOG及びPLPの配列を含む109ペプチドパネルへの免疫は、TERMS臨床治験から得られたPBMCを用いて調査を行った。ペプチドライブラリーは、12-merの重なりを有する一連の16-merのペプチドとして構築した。ペプチドは、各ミエリン抗原のそれぞれのタンパク質配列において、質量を基準にして、線形位置に基づいて、「対」で混合した(質量)。配列表、対混合物及び最終プールを付録として提供する。

40

【0094】

20IU/ml IL-2を補充し、1µg/mlの各ペプチド「対」でパルスして、合計55マイクロチューブ培養物になる350µlの完全OptimizertCTS培地において、1.2ml丸底マイクロ培養チューブあたり 1×10^6 のPBMCを樹立した。

50

5日後、 1×10^6 のPBMC、及び適切なペプチド対 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加することにより培養物を再刺激した。陰性対照培養には、0日目及び5日目にペプチド刺激の不在下でPBMCを加えた。第6日目に、培養上清を全培養物から採取し、サンドイッチELISA法によりIFN含量を分析した。

【0095】

サンドイッチELISA法による培養上清でのIFNの測定

【0096】

サンドイッチELISA法によるIFN含量は、OptEIA Assay希釈剤に加えて、BD Bioscienceのストレプトアビジン-HRPによる捕捉抗体及び検出抗体を用いて実施した。製造者の指示書を用いて、ELISAを実施した。端的に言えば、96-ウェルELISAプレートを1:250希釈の原捕捉抗体 $100 \mu\text{l}$ /コーティングバッファ(pH9.6)でコーティングし、2~8で一晩インキュベートした。プレートは、Biotek ELx405 96-ウェルプレート洗浄器を使用して、PBSで5回洗浄した。タンパク質ブロッキング溶液をウェルあたり $100 \mu\text{l}$ でウェルにいれ、室温で2時間インキュベートした。プレートをデカントし、容積 $100 \mu\text{l}$ の上清を指定のウェルに添加する前に、吸収組織にブロッキングすることにより、ブロッキング溶液を除去した。いくつかの実験では、ELISAプレートに添加する前に、上清を倍加希釈で「未希釈」から1:8に希釈した。いずれの場合も、プレートのレイアウトによって、各プレートは、組み換えIFNの標準曲線を受容して、 $300 \sim 25 \text{pg}/\text{ml}$ の範囲を網羅することができる。アッセイ用LLOQは、 $11.25 \text{pg}/\text{ml}$ に設定した。インキュベーション培養2時間後、1:250希釈のストレプトアビジン-HRPに錯体化されたビオチン化検出抗体の添加前に、プレートは0.05% Tween 20/PBSにより7回洗浄した。プレートは、更なる時間、室温にてインキュベートし、その後14回、0.05% Tween 20/PBSで洗浄した。蒸留水 20ml 当たり1つの尿素錠剤及び1つのOPD錠剤を添加することによって、O-フェニルジアミン(OPD)酵素基質を再構成した。基質溶液 $100 \mu\text{l}$ をすべてのウェルに入れて、室温で暗所にて30分間インキュベートした。光学密度(OD)は、BioTek ELx800 ELISAプレートリーダーを用いて、フィルターを 450nm に設定して測定した。Genie 5 software(BioTek)を使用して、IFN標準曲線を作製し、OD読取り値をIFN濃度(pg/ml)に変換した。

10

20

30

【0097】

ELISpotによるIFN分泌細胞の頻度の測定

【0098】

eBioscienceのキット形態に供給した試薬を用いて、96ウェルプレートフォーマットですべてのELISpotを実施した。使用24時間前に、ELISpotプレートを、2~8で $100 \mu\text{l}$ の1:250希釈抗-IFN捕捉抗体でコーティングした。捕捉抗体をデカントして、RPMI培地と10% FBSから構成される $200 \mu\text{l}$ ブロッキング溶液に置き換え、プレートは、更に室温にて2時間インキュベートした。ブロッキング溶液をデカントして、さまざまな実験のPBMC調製物(実験デザイン及び手順を参照されたい)を総容量 $100 \mu\text{l}$ で指定ウェルに添加した。必要な場合、容量 $50 \mu\text{l}$ 中の抗原提示(APC)源として、追加の 1×10^5 PBMCを各ウェルに添加した。ペプチドは、容積 $50 \mu\text{l}$ 中 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加して、アッセイウェル中、最終ペプチド濃度 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ を得た。APCまたはペプチドのいずれかを除き(陰性対照)、培地のみ、必要に応じて、細胞懸濁液またはペプチド溶液の量に置き換えた。アッセイの陽性対照としては、キラー細胞及びAPCを収容している対照ウェルを、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でペプチドの代わりに $50 \mu\text{l}$ でパルスした。装填ロードELISpotプレートは、37で約18時間インキュベートして、さまざまなマイクロウェルでのIFNの分泌及び捕捉が可能になった。細胞培養終了時、インキュベーションからプレートを取り外し、蒸留水で2回洗浄し、細胞を溶解して除去し、その後更に5回0.05% Tween 20/PBSで洗浄する。すべての洗浄は、BioTek ELx4

40

50

05プレート洗浄機を用いて実施した。洗浄プレートにアッセイ希釈剤中1:250希釈のビオチン化抗-IFN 検出抗体100 μ l/ウェルを入れ、プレートを更に室温にて2時間インキュベートした。その後、1:100希釈のストックストレプトアビジン-HRP/アッセイ希釈剤100 μ l/ウェルを添加する前に、0.05% Tween 20/PBSを7回変えて、再びプレートを洗浄した。次にプレートを1時間室温でインキュベートした。終了時、プレートを0.05% Tween 20/PBSで7回洗浄し、その後更にPBSのみで5回洗浄した。AEC基質は、アッセイ希釈剤10mlまでの濃度で10滴添加することによって調製し、基質溶液100 μ lは各ELISpotウェルに添加した。約20分後、発現したスポットが目に見えるようになり、蒸留水で5回洗浄することにより、反応をクエンチさせる。ImmunoSpotソフトウェアバージョン5.1.8を用いて、CTL Immunospot readerでスポットを数える前に、発現したプレートを一晩空気乾燥させた。

【0099】

ELISpotによる抗-破傷風毒素(TT)応答の定量化

【表1】

供給元	ペプチド指示	アミノ酸配列	供給元	ペプチド指示	アミノ酸配列
CS Bio	TT1	DIKNDLYEKTLDNDYKAIANK	CS Bio	TT5	LMQYIKANSKFIGITELKKL
CS Bio	TT2	IVVYNLQSKITLPNDRTPV	CS Bio	TT6	GINGKAIHLVNNESSEVIV
CS Bio	TT3	TNSVDDALINSTKIYSTFPS	CS Bio	TT7	NNFTVSFWLRVPKSASHLE
CS Bio	TT4	IDKISDVSTIVPYIGPALNI			

【0100】

直接エクスピボELISpot

【0101】

健常ドナー由来のPBMCを直接、既知の免疫優性決定因子を含有する7つのパネル(TT1~TT7)由来の単一の破傷風毒素ペプチド20 μ g/mlを補充した完全Optimixer CTS培地200 μ lにおいて 2×10^5 細胞/ウェルで四通り播種した。FMOc法を用いてペプチドを合成し、95%ペプチド純度超までHPLC精製した。個々のペプチドを最終濃度5mg/mlまでジメチルスルホキシド(DMSO)、酢酸及び/または水で可溶化した。200ng/mlのHLA-A2 CMVpp65 9-merの入った四通りのウェルは、このペプチドへの免疫がこのドナー由来のPBMCを使用してこれまでに検出された対照リコール抗原として含めた。陰性対照ウェルは、ペプチドの不在下でPBMCを加えた。ELISpotプレートは、一晩インキュベートして、その後、スポットを数えることによってIFN 分泌細胞の算出を行うために上記のように調製した。

【0102】

マイクロ培養5日後のELISpot

【0103】

PBMCは、マイクロクラスターチューブに対して 1×10^6 細胞で500 μ lの量の完全Optimixer CTS培地に播種した。各チューブに7つのパネル(TT1~TT7)由来の単一の破傷風毒素ペプチド20 μ g/ml及び最終濃度5IU/mlのIL

- 2を補充した。陰性対照マイクロ培養は、培地及びIL-2中の細胞で構成されるが、いかなるペプチドも不在である。培養5日後、各マイクロチューブの内容物を緩やかに再懸濁し、培養物は、4つのELISpotウェルで100 μ lアリコートに配分して、アッセイで四通りの複製ウェルを作製した。ウェルは、抗原提示源として、 1×10^5 PBMCを容積50 μ lで更に播種し、ペプチドは、50 μ l中80 μ g/mlの濃度で重ね合わせて、ELISpot培養物中、最終濃度20 μ g/mlとした。陰性対照ウェルは、ここでも、ペプチドの不在下で追加のPBMCを含んだ。37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした後、ELISpotプレートを発現させ、IFN γ スポットを上記のように数えた。

【0104】

マイクロ及びマクロ培養及びELISpot対Cell-ELISAを用いた抗ミエリン免疫の定量化

10

【0105】

マイクロ培養後の破傷風毒素ペプチド応答の定量化に使用されるとき、類似のアッセイフォーマットを拡張して、抗-破傷風応答を検出するために利用される7つのペプチドライブラリーとは対照的に、MBP、MOG及びPLPをコードする55のペプチド「対」を用いて、抗-ミエリン免疫を調べた。このフォーマットでは、合計55マイクロチューブに5IU/ml IL-2及び最終濃度20 μ g/mlの1つのペプチド対が補充された完全OpTmizer CTS培地 1×10^6 PBMC培養容積500 μ lを作製し、完全ミエリンペプチドライブラリーを網羅した。IL-2と共にPBMCで構成されるが、ペプチド不存在下である陰性対照培養を再び同時に行った。

20

【0106】

いずれか1つの抗原源に晒したPBMCの総数を増加させるために、ペプチドは、「対」で行われる試験とは対照的に、6つのセットにおいて、質量を基準として同等に貯留させ、第0日目にこれらのペプチドプールの20 μ g/mlを 3×10^6 PBMC/1.5ml 完全OpTmizer CTSの入った滅菌5ml丸底チューブに添加した。

【0107】

培養第5日目に、各マイクロ培養チューブ中の細胞を緩やかに再懸濁し、100 μ lアリコートを四通り、ELISpotプレートをプレートアウトした。5mlチューブのマクロ培養物については、培地1mlを除去し、アッセイ用のプレーティング前にその細胞を残存している500 μ l中に再懸濁した。いずれの場合においても、第0日目に利用した適合ミエリンペプチド対またはプール20 μ g/mlの存在下で、抗原提示源として 1×10^5 PBMCを用いてウェルを再刺激した。一晩インキュベートした後、ELISpotプレートを発現し、IFN γ スポットを定量化した。いくつかの実験では、全培養物を4つのウェルに均等にプレーティングするのとは対照的に、各ウェルの潜在的スポットの数を減少させ、これによって、スポットの定量化の正確性を改善するように、培養物の1/2及び1/8をそれぞれ2つのウェルにプレーティングした。

30

【0108】

ELISpotの代替として、IFN γ 分泌細胞の数の定量化とは対照的に、インサイチュ累積IFN γ 分泌を検出する方法としてcell ELISAを調べた。第5日目の培養物をELISpotウェルと同じ方法で播種した。しかし、cell ELISAでは、ELISAプレートは、あらかじめELISpotプレートと置き換えた抗-IFN γ 捕捉抗体でコーティングした。一晩インキュベートした後、細胞は0.05% Tween 20/PBSで5回洗浄してプレートから除去し、このアッセイは、eBioscienceによって供給された試薬で発現させし、上記の従来サンドイッチELISA法で使用した。光学密度を再び、細胞の不存在下で、cell ELISAで滴定したIFN γ の標準曲線を参照して、IFN γ 濃度に換算した。

40

【0109】

いくつかの実験では、ELISpotまたはcell-ELISAアッセイにプレーティングする前に、細胞の「解離ステップ」を培養物に実施した。これは、第5日目に培養チューブを遠心分離(10分、250g)にかけて得て、消耗培地を除去し、その後、0

50

．5 ml PBSで洗浄し、遠心分離と懸濁（1 mM EDTA、10 U/ml DNase / PBS 0.5 mlで10分間、37℃）とを繰り返し行った。遠心分離により解離溶液を除去し、下流アッセイの前に、細胞に0.5 ml完全 Optimizer CTSを補充した。

【0110】

最適化エプトーププロファイリングアッセイ

【0111】

5 IU/ml IL-2を補充した完全Optimizer培地1.5 mlの入った各18.5 ml FACSチューブに 3×10^6 PBMCを播種した。各培養物に18のペプチドプールのうちの1つを最終濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ になるまで添加する。2つの陰性対照チューブには、ペプチドの不在下で、培地においてPBMCを加えた。追加のチューブは、第0日目にPBMCを播種し、その後、第5日目に追加のPBMC及びPHAでパルスしたとき、陽性対照として使用される。チューブはいずれもゆるくキャップし、5日間、37℃、5% CO₂でインキュベートした。第5日目では、消耗培地を1 ml各チューブから除去し、 1×10^6 PBMCを適合ペプチドプールを補充した総量0.5 mlに添加して、最終培養量1 ml中最終濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ とした。陰性対照チューブに、ペプチド不存在下で、0.5 ml培地に 1×10^6 PBMCを入れた。陽性対照（第0日目にペプチドの入っていないチューブから作製する）は、ペプチドに置換したPHA-Lと共に追加の 1×10^6 PBMCを入れて、最終培養物量の1 ml中、最終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$ を得た。チューブは、18～24時間、37℃、5% CO₂でインキュベートする。その後、上清を採取して、「未希釈」から1：8へ二重希釈し、従来のサンドイッチELISA法に適用する。IFN濃度は、各試験プレートに織り込んだIFN標準曲線を参照して報告する。

10

20

【0112】

「反応性」ペプチドプールに関して陽性とする暫定的定義は、陰性対照の2.5倍を超える1：2希釈の上清、すなわち、常時ペプチドの不存在下で維持したPBMC培養物中のIFN含量によって定義した。

【0113】

実施例1.2：結果

【0114】

実施例1.2.1：抗原特異的T細胞応答の誘導への培養環境、培養時間の影響

30

【0115】

図1及び図2は、HLA-A2によって提示された最適化9-merペプチドを用いて、CMV pp65 T細胞リコール応答への時間及び培養条件の影響を示す。高密度（ 1×10^6 PBMC / 350 μl ）での培養細胞は、培養第4日目及び第6日目の両日に検出された抗原特異的IFN濃度の4～5倍増となる。20 IU/ml IL-2を培養物に添加して、T細胞増殖を支持するために、IFN応答を大きく増大させ、これによって、培養物中にクローン性提示抗-CMV pp65反応性T細胞が増大する。培養物中でちょうど4日後（第3日目の抗原再刺激を含む）に培養し、アッセイした細胞と比較して、合計培養6日間（第5日目の抗原再刺激を含む）に、抗CMV pp65 T細胞応答が大きく増大する。

40

【0116】

図3及び図4は、播種密度及び発生させる最適のCMV pp65抗原想リコール応答（図2）を作製した培養条件を用いて、109ミエリンペプチドライブラリーの対混合物での刺激時の2つのMSドナーPBMC調製物のIFN応答を示す。いずれのドナーも、陰性対照、バックグラウンドの2倍超と定義されるマイクロ培養物のみを培地を上回る有意のIFN抗ミエリンペプチド活性を示すことはなかった。ドナー011054を用いたこのアッセイでは、陰性対照培養物の1つにおいて高バックグラウンド応答で定義されるように「偽陽性」活性の存在が明かになる。

【0117】

50

実施例 1.2.2 : マイクロ培養後、稀な抗原特異的 T 細胞を検出するための高感度法としての IFN E L I S p o t の評価

【0118】

透明な抗ミエリンペプチド IFN 活性を観察できなかつたことにより、作製した培養条件が低頻度ミエリン反応性 T 細胞レポトリーを支持するのに不十分であるか、または、アッセイ読取り値が、バックグラウンドの陽性応答を示すのに十分な感受性を示さなかつたことが示唆される。後者を評価するにあたって、上清中で測定された累積 IFN 応答とは対照的に、従来のサンドイッチ E L I S A 法の代わりに IFN E L I S p o t アッセイを実施して、培養物中の IFN 分泌細胞の頻度を定量化した。E L I S p o t アッセイは、従来、低頻度 T 細胞応答を検出するために用いる。加えて、培養物中のバックグラウンド応答をコントロールするために、IL-2 の濃度は、20 IU/ml から 5 IU/ml に低減させた。

10

【0119】

稀な T 細胞応答を定量化するために、E L I S p o t 前の細胞培養の影響を作り出すため、健常ドナー (03094) 由来 P B M C に、文献にこれまでに記載されたような破傷風毒素由来の 7 つの既知の免疫優性決定因子ペプチドのパネルに対して、直接エクスピボ E L I S p o t を行うようなアッセイを設定した。あるいは、各ペプチドの存在下で細胞培養し、E L I S p o t 環境で再刺激後、第 5 日目にアッセイを繰り返し行った。

【0120】

図 5 は、CMV pp65 由来の H L A - A 2 免疫優性ペプチドに対する免疫は、「リコール」応答として速やかに検出可能であるが、ドナーの P B M C の直接エクスピボ E L I S p o t では、IFN 分泌抗破傷風毒素 T 細胞の存在は検出できないことがわかる。しかし、P B M C を各破傷風毒素ペプチドの存在下で 5 日間細胞培養し、稀な T 細胞クローンが拡張され、その後 E L I S p o t を行った場合、特定の応答が得られた。少なくとも T T 4 への応答が「偽陽性」でないことを確認するために、ペプチド及び培養期間 21 日を超えて、ドナー細胞のサンプルの追加の P B M C で、毎週繰り返し再刺激することによって T T 4 反応性 T 細胞株を作製できた。

20

【0121】

候補抗原、すなわち、破傷風毒素のマイクロクラスターチューブ及び E L I S p o t エンドポイントを確立することで、マイクロ培養物は破傷風応答を検出可能な範囲に増幅することができ、抗ミエリン T 細胞免疫を調査するために、本アッセイを行った。最初に健常ドナー P B M C に対して、アッセイを行った。組織バンクに保管された同一供給源からの 2 つのアッセイを実施して、分析法間分散を示した。図 6 及び図 7 は、2 つの E L I S p o t アッセイ間で、陽性応答を有するペプチドプールを同定する際の不一致を示す。

30

【0122】

共培養マイクロクラスター IFN E L I S p o t プラットフォームによる不十分なアッセイ間の変動を確認するにあたって、2 つの M S ドナーから収集した P B M C に対してアッセイを行った。このアッセイを各ドナーに 2 回実施し、第 2 のアッセイでは、凍結保存供給源から同一の P B M C を利用した。ここで、データでは、不一致の結果を得た (図 8 及び図 9)。

40

【0123】

任意の 1 つのペプチド混合物に関して、再現性の欠落、及び四通りのウェルの標準偏差により、四通りの E L I S p o t シリーズの各メンバーウェルの可能性のある反応性 T 細胞の不十分な分布が示唆された。これは、E L I S p o t に移動する前に非効率的解離する 5 日間の細胞培養に応じた、マイクロクラスターチューブ内に形成される凝集体の結果であり得る。また、凝集体が、E L I S p o t において、洗浄時に、非効率的に E L I S p o t ウェルから除去される細胞くずにより「偽陽性」データとなり、その後、アッセイにおいて「偽スポット」となる検出抗体の非特異的捕捉となり得る。1 つのペプチド混合物に対していずれか 1 つの四通りの E L I S p o t への細胞の分布を改善するために、及び凝集体が「偽陽性」データポイントを生成するリスクを低減するために、最初に、マイ

50

ク口培養サンプルを「解離ステップ」に晒し、単一の細胞懸濁液のプレートアウトの可能性を上昇させ、ELISpotアッセイに引き継がれる細胞凝集体及びくず凝集体の数を減少させた。マイクロ培養物の洗浄により、また、細胞プレーティング及び最終分析用の培地中で再懸濁する前に、10分間、37℃で10 U/ml DNase / PBSにて1 mM EDTAで再懸濁することにより、解離ステップが達成された。

【0124】

別の懸念は、各ペプチド対によりサンプル化したPBMCの数に対するキラー細胞の点における抗ミエリンT細胞免疫の絶対頻度に関する。120 ml採血からのPBMCの見込み収率に基づいて、アッセイ設計を支持するために、「対」内で混合させた109のペプチドライブラリーを使用して、1つのマイクロ培養物当たり 1×10^6 細胞のPBMCサンプルサイズを決定した。文献から、末梢血中の抗ミエリンT細胞の頻度は、 10^5 細胞中1～ 10^6 細胞中1の範囲内であってもよいことが示唆される場合、本サンプルサイズは、小さすぎて、信頼される抗ミエリンT細胞免疫の検出を期待できない場合がある。凝集体が最終ELISpotアッセイに及ぼす影響に加えて、この問題を解決するために、マイクロクラスターチューブ中において、350 μ l中 1×10^6 または 3×10^6 細胞のいずれかのPBMCサンプルサイズを含むマイクロ培養においてPBMCを設置し、前述のように、「対」中でMOGペプチドを混合して、MOGペプチドライブラリーへの応答を調査した。

10

【0125】

図10は、初期に 1×10^6 PBMCで播種したマイクロチューブ培養物からのプレーティングELISpotから、ペプチド混合MOG m16に対する「弱い」応答を示すことがわかる。この実験では、解離ステップの適用により、「未処置」培地対照によって定義されるとおり、「偽陽性」の可能性に及ぼす影響を最少にした。しかし、第0日の播種材料として、 3×10^6 PBMCを利用することで、ペプチドプールMOG m16に対して更に頑強な応答となり、未処置対照内のスポットの存在によって定義されるとおり、解離ステップにより「偽陽性」のリスクを除去した。

20

【0126】

上記のデータにより、1つのペプチドプールに対するサンプルサイズの増大が裏付けられる。しかし、120 ml採血から採取されるPBMCの数が限定され、「対」内で混合された109のペプチドライブラリーをスクリーニングすることができず、これによって、55のペプチド「標的」（1つの標的に対してサンプルサイズ 3×10^6 PBMC）となる。1つのペプチド「標的」に対して 3×10^6 細胞までPBMCサンプルサイズを増大できるようにするためには、重なり合ったペプチドライブラリーを混合して、ただの「対」とは対照的に、6のペプチドの「プール」を作製することが必要になる。実際には、MBPライブラリーは、6のペプチドの6の「プール」から構成される。MOGについては、c末端プール(MOG p6)を有する6ペプチドの5「プール」は、8のペプチドから成る。最終的には、PLPは、6のペプチドの5の「プール」から構成され、1つ(PLP p6)は5のペプチドから成る。このシナリオでは、ペプチドファミリーはMBP、MOG及びPLPを包含し、それぞれが全109ペプチドライブラリーを包含する6の「標的」からなる。1つのペプチドプール当たりのサンプル細胞数を容易に多くするため(すなわち 3×10^6 PBMC)、350 μ l容積のマイクロクラスターチューブとは対照的に、第0日目に5 ml FACSチューブ内に容積1.5 mlの量の細胞培養物を作製した。この構成により、「マクロバルク」培養物と称される。

30

40

【0127】

ELISpotを用いることによる別の懸念は、計算するスポットの「半定量的」性質であった。CTL Immunospotソフトウェアを校正して、均一の性質のスポットを認識することができるが、ELISpotアッセイで形成されたスポットは、形状、寸法及び分布に関して、きわめて可変性であった。これは、図11に上手く示されている。共培養5日後、ELISpotアッセイを用いるため、抗原特異的T細胞は、不揃いのサイズの大きいスポットとなり、再刺激時のアッセイの18時間、IFN 分泌のそれら

50

の高反応性及びE L I S p o t ウェルでの運動性を示す。E L I S p o t ウェル内で活性が上昇するにつれて、計算するスポットの精度を低下させた(図11)。

【0128】

E L I S p o t 数の正確性を改善するために(特に、陽性シグナルの検出可能性を増大するように、第0日目に播種P B M C サンプルサイズを 1×10^6 から 3×10^6 のP B M Cへ増大させて)、正確なスポットの計数を容易にするように、細胞希釈ステップを含めてE L I S p o tを設定した。要約すると、第5日の1.5ml培養物を遠心分離し、消耗培地を除去し、「細胞解離」ステップを適用し、細胞ペレットを最終的に新鮮培地400 μ lに再懸濁した。E L I S p o tプレートの2つのウェル(マクロ培養物の1/2を示す)は、それぞれ、100 μ lで播種した。100 μ l細胞懸濁液を再び、2つのE L I S p o tウェルのそれぞれに配置して、原液播種のマクロバルク培養物の1:8希釈を作製する前に、細胞の残部(200 μ l)を新鮮培地600 μ lで更に希釈した。

10

【0129】

E L I S p o tで「サイトカイン分泌細胞」の数を計算する代替として、平行c e l l E L I S Aも樹立して、「累積分泌」のI F N を検出した。アッセイフォーマットは、ニトロセルロースE L I S p o tプレートではなく、抗I F N 抗体コーティングE L I S Aプレートに細胞をプレートアウトする点を除き、E L I S p o t用と本質的に同一である。ペプチドプールを添加して再刺激後、及びA P C源としてP B M Cを支持した後、培養の18時間後細胞を洗浄し、比色分析基質など従来のE L I S Aとして、プレートを発現させる。この方法の利点は、I F N の濃度依存標準曲線に対してO Dを解釈する場合は、読取り値は実際に定量的である。同じ凍結保存P B M C原料物質からE L I S p o t及びc e l l E L I S Aアッセイを作製したが、いずれのアッセイも、異なる日に第0日から開始した。

20

【0130】

図12及び図13は、好ましいエピトーププロファイリングアッセイを作製する際に、異なる日に設定された同一の細胞原料物質に基づいて独立したアッセイを実施するとき、また、最終読取り値の代替アッセイプラットフォームを適用するときであっても、最初に、個々内における応答ペプチドプールの検出に関して一致していることを示す。データの質の改善は、ほぼ確実に初期培養サイズの増大(すなわち、第0日目に 3×10^6 対 1×10^6 P B M C)に関連する。これにより、109のペプチドライブラリーを含む重なり配列由来のいずれか1つのペプチドプールの存在下で、共培養の最初の5日間で拡張され得る比較的稀なミエリン反応性T細胞の捕捉可能性が増大する。

30

【0131】

E L I S p o t及びc e l l E L I S Aの両者は、検出可能な範囲に関する問題を有する。数の多い大型反応性スポットを有するE L I S p o tウェルでは、スポット数が200を超えると、正確に定量化することは困難である。C e l l E L I S Aは、いくつかのデータポイントで、「範囲外」となり得る約300pg/mlの定量上限を有する。この問題を解決するために、いずれのアッセイも播種材料の希釈ステップを含めて設定した(図12及び図13)。正確なデータを得るために、均質細胞懸濁液の正確な希釈を必要とし、細胞の「解離ステップ」の導入と、その後「稀な事象」、すなわちミエリン反応性T細胞のサンプルウェルへの均等な配分が必要とされた。達成可能ではあるが、希釈シリーズによって、マクロバルク培養をかなり操作することとなり、1つがそれぞれ抗原標的M B P、M O G及びP L Pである、合計3つの96ウェルプレートに播種する。その目的が「高スループット」プラットフォームを設計することであるとき、細胞希釈を実施する錯体及びアッセイの「サイズ」が問題となる。

40

【0132】

実施例1.2.3: 抗原特異的免疫を検出するための培養第6日目の従来のE L I S Aの評価及びエピトーププロファイリングアッセイ(E P A)の確立。

【0133】

C e l l E L I S Aの読取り値は、細胞から分泌され、それによって、アッセイ自体

50

内のインサイチュの周囲の上清から捕捉されるIFNの濃度である。このため、アッセイ領域内のIFN含量を分析するためにキラー細胞数を希釈する代わりに、容易な方法では、キラー細胞を希釈しないが、上清を希釈し、従来のELISAに第2のアッセイとして適用する。その後、均質細胞懸濁は決定的なものではないため、細胞内「解離ステップ」を回避することができる。第5日目には、IFN含量の定量化のために、上清の採集前にマクロバルク培養の再刺激を培養チューブ自体において直接行うことができ、有意に培養の操作を削減することができる。

【0134】

上述のように精製アッセイの最初の試験としては、健常ドナー(3183)から破傷風毒素の公開免疫優性ペプチド配列(合計7つのペプチド(TT1~TT7)を包含する)に対する免疫応答を検出するために、4つの独立した演算子による認定を設定した。要約すると、各演算子から、第0日目に1.5ml培地量で5mlFACSチューブに 3×10^6 PBMCの7つの培養を設定し、それぞれ、7つのパネルから1つのペプチドの $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ でパルスした。第5日目に、培養上清1mlを除去し、抗原提示源として 1×10^6 PBMCを添加し、培養物を再びペプチド $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ /最終培養量1mlでパルスした。一晚インキュベートした後、上清を収集し、従来のELISAを用いて、 pg/ml に変換した光学密度を用いて、組み換え型IFNの標準曲線を参照することにより、IFN含量に関するアッセイを行った。「未希釈」及び希釈1:2、1:4及び1:8に関して、上清のアッセイを行った。

10

【0135】

表1は、陰性対照(ペプチドの不存在下で培養したPBMC)を2.5倍上回るように設定したしきい値を上回って測定されたIFN濃度(pg/ml)を示す。一致率は、個々のペプチド標的に対する陽性または陰性応答が正確に認識された演算子(合計4つ)の百分率を示す。当然のことながら、陽性応答が検出される場合、上清が滴定されると一致率が低下し、これは、演算子間で検出されるIFNの絶対濃度の差異を示す。重要なことに、未希釈の上清をアッセイするとき、TTペプチド、TT3、TT5、TT6及びTT7については、4つの演算子間で、陽性活性の100%一致が明らかになっている。TTペプチド、TT1及びTT2については、非反応性の100%一致が明らかになっている。TT4のデータは、更に可変的であり、唯一の演算子(HK)が頑強な応答を検出する。TT4の再現性がないことは、培養第0日目に開始したと考えられる稀な一次免疫応答が検出されていることを示し得る。

20

30

【0136】

表1：破傷風毒素ペプチドを用いたエピトーププロファイリングアッセイの演算子間検査

【表 2】

TT ペプチド	上清の希釈	演算子				一致率 (%)
		CSA	HK	GM	MM	
TT1	未希釈	0	0	0	0	100
	1:2	0	0	0	0	100
	1:4	0	0	0	0	100
	1:8	0	0	0	0	100
TT2	未希釈	0	0	0	0	100
	1:2	0	0	0	0	100
	1:4	0	0	0	0	100
	1:8	0	0	0	0	100
TT3	未希釈	ALOQ	ALOQ	84	131	100
	1:2	184	138	44	30	100
	1:4	78	42	1	0	75
	1:8	14	0	0	0	75
TT4	未希釈	3	197	0	0	50
	1:2	0	66	0	0	75
	1:4	0	15	0	0	75
	1:8	0	0	0	0	100
TT5	未希釈	ALOQ	ALOQ	ALOQ	ALOQ	100
	1:2	ALOQ	226	137	235	100
	1:4	268	97	49	112	100
	1:8	120	32	6	66	100
TT6	未希釈	32	104	ALOQ	240	100
	1:2	0	21	257	101	75
	1:4	0	0	115	30	50
	1:8	0	0	39	15	50
TT7	未希釈	ALOQ	137	ALOQ	41	100
	1:2	140	40	132	0	75
	1:4	49	0	44	0	50
	1:8	5	0	5	0	50

10

20

30

【0137】

データは、陰性対照（ペプチドなし）培養を上回る2.5倍に設定して、陽性しきい値を上回るIFN（pg/ml）を示す。ALOQ：定量化レベルを超える（313pg/ml）

【0138】

追加の2つの演算子により、破傷風毒素ペプチドパネルを有する異なるドナー（03190）由来のPBMCを用いて、EPAの更なる検査を行った。表2のデータは、試験上清の1:2希釈点での陰性対照（ペプチドなし）の2.5倍のIFNの濃度（pg/ml）を示す。「未希釈」上清中に検出されるシグナルと比較したとき、シグナルを滴定可能な必要があるため、分析にもっとも適切な滴定点として、1:2希釈点を選択した。さらに、弱く、このため、偽陽性の可能性のあるデータは、分析に含まれないよう排除される。データは、ドナー03190の破傷風毒素ペプチドTT3、TT6及びTT7に対する陽性反応に関する2つの演算子間の100%一致を示す。

40

【0139】

【表 3】

表 2：破傷風毒素ペプチドを用いたエピトーププロファイリングアッセイの二次検査

演算子	破傷風毒素ペプチド							一致率(%)
	TT1	TT2	TT3	TT4	TT5	TT6	TT7	
LC	0	0	37	0	0	26	60	100
CA	0	0	143	0	0	59	58	

10

【0140】

データは、上清の 1 : 2 希釈点に関して、陰性対照（ペプチドなし）培養を 2 . 5 倍上回るように設定した、陽性しきい値を上回る IFN（pg / ml）を示す。

【0141】

ミエリンペプチドプールを有する好ましいアッセイフォーマットを定量化するために、1つのペプチドプール当たり 3×10^6 PBMC を第 0 日目に開始し、第 5 日目に再刺激し、第 6 日目に上清の IFN 含量を定量化した。健常ドナーから誘導される単一の PBMC 源を使用して、1つの演算子当たり 3つの複製 EPA を作製した。表 3 は、滴定された上清の 1 : 2 希釈点からデータをプロットしたとき、ドナー（03190）が MOG p 6、PLP p 1 及び PLP p 4 に対して検出可能な応答を有することを示す。IFN

20

ELISA アッセイのより低いレベルでの定量（LLOQ）は 11.25 pg / ml である。ペプチドなしの対照において、陽性しきい値が応答を 2 . 5 倍上回るように再び設定し、これらのアッセイでは、LLOQ は同等であった。

【0142】

表 3：ミエリン反応性 T 細胞を検出するエピトーププロファイリングアッセイ（EPA）の演算子間及びアッセイ間検査。データは、各培養物中の陽性しきい値を上回って検出された IFN の濃度（pg / ml）を示す。

【表 4】

ペプチド 混合物	演算子LC			演算子GM			一致率 (%)
	アッ セイ1	アッ セイ2	アッ セイ3	アッ セイ1	アッ セイ2	アッ セイ3	
MBPp1	0	0	0	0	0	0	100
MBPp2	0	0	0	0	0	0	100
MBPp3	0	0	0	0	0	0	100
MBPp4	0	0	0	0	0	0	100
MBPp5	0	0	0	0	0	0	100
MBPp6	0	0	0	0	0	0	100
MOGp1	0	0	0	0	0	0	100
MOGp2	0	0	0	0	0	0	100
MOGp3	0	0	0	0	0	0	100
MOGp4	0	0	0	0	0	0	100
MOGp5	0	0	0	0	0	0	100
MOGp6	40	14	0	5	67	55	83
PLPp1	152	79	152	286	225	278	100
PLPp2	0	0	0	0	0	0	100
PLPp3	0	0	0	0	4	0	83
PLPp4	58	37	22	262	285	281	100
PLPp5	0	0	0	0	0	51	83
PLPp6	0	0	0	0	0	0	100

10

20

【0143】

このドナーの反復性陽性スコアを有する3つの免疫反応性ペプチドプールは、MOGp6、PLPp1及びPLPp4であった。2つのもっとも反応の高いペプチドプール（PLPp1及びPLPp4）の一致率は100%であった。MOGp6に対する反応性は弱く、実施した6つのアッセイのうちの5つに検出された。このため、偽陰性データの可能性が存在するが、これは、低い頻度で、反応が低下しているペプチドプールを用いた場合のみである。データを基準にして、15のペプチドプールは、「非反応性」と考えられる。合計90培養物（6つのアッセイで15のペプチドプール）で、2つのみが偽陽性を示した（つまり約2%）。T細胞免疫療法プロトコルにおいて使用するためにミエリン反応性T細胞株を上手く作製する能力は、T細胞伝播用を選択される真の反応性ペプチドプールだけに依存する。EPAにおいて偽陽性率が非常に低いことにより、抗原特異性を欠くT細胞株が作製されるリスクが軽減される。

30

【0144】

実施例1.3

40

【0145】

ミエリンペプチドに対する陽性T細胞免疫反応性を明らかにするためにサイトカイン検出を使用する例を更に挙げると、エピトーププロファイリングアッセイの上清に対して、さらに詳細な分析を行った。この目的を達成するために、13のサイトカインを同時に検出するビード系多重アッセイを実施して、ミエリンペプチドに対する多官能性T細胞免疫をプロファイルした。

【0146】

EPAは、個々の5つのMSドナー由来のPBMCで実施した。従来どおり、追加のPBMC及びペプチドで培養物の再刺激の24時間後、上清を第6日目に収集した。

50

【0147】

多重アッセイ前に、サンプルを遠心分離にかけて細胞くずを除去し、アッセイまでマイナス20℃で保存した。アッセイ用に調製する際に、試薬はMILLIPLEX Magnetic Human Th17 kitで提供され（抗体固定用ビーズ、品質管理サンプル及びサイトカイン標準物質を含む）、それらの適切なバッファ中で再構成させた。提供したアッセイバッファを用いて、ストック標準液から1：4連続希釈を実施することによって標準曲線サンプルを調製した。提供したプレートの全ウェルを200µLアッセイバッファと共に10分間インキュベートし、非特異的結合を阻害した。その後、アッセイバッファを廃棄し、適切なマトリクス溶液25µLに加えて、各標準液または対照液25µLを適切なウェルに添加した。各サンプルウェルに対して、サンプル上清25µLと共に、アッセイバッファ25µLを添加した。その後、25µL抗体固定用ビーズと共に光から保護し、攪拌しながら、18時間、4℃ですべてのウェルを培養した。その後、BioTek EL-405プレート洗浄機を使用して、プレートを洗浄し、検出抗体溶液を1.5時間適用した。非洗浄プレートには、ストレプトアビジンPE溶液を30分間適用し、過剰な試薬はすべて直ちに洗浄して除去した。その後、MagPix照度計で捕捉する前に、すべてのウェルにMagPixランニングバッファ150µLを充填した。Millipore Milliplex Analystソフトウェアを使用して、サンプル中のサイトカイン濃度を定量化した。

10

【0148】

表4に示すように、5つのすべてのドナーは、1つ以上のペプチドプールに対して陽性反応を示した。全ての場について、ペプチドなし（NP）対照培養物を使用して、各サイトカインの分泌の基準自然発生レベルを設定した。検出されたアナライトでは、IFN-γ、TNF-α及びIL-6は最も速やかに、最も高い頻度で検出された。

20

【0149】

表4：ミエリンペプチドに応答する5つのMSドナーサンプルのサイトカインレベル

【表 5】

ドナー 14008005	ベブチド	IL-27	TNF-a	IL-10	IL-5	IL-17A	IL-6	IL-12 p70	IL-23	IL-17F	IL-2	IL-4	IL-17E/IL-25	IFN- γ
	NP	<0.01	5.28	1.11	<0.56	<2.25	4.45	1.13	<0.02	<0	<1.15	<0.01	<0.21	2.52
	MOG2	0.02	20.11	3.05	0.85	<2.25	181	1.13	<0.02	0.01	36.44	<0.01	<0.21	111
	MOG6	0.02	45.73	4.65	4.24	4.99	702	1.71	<0.02	0.14	20.87	<0.01	<0.21	838
ドナー 14008007	ベブチド	IL-27	TNF-a	IL-10	IL-5	IL-17A	IL-6	IL-12 p70	IL-23	IL-17F	IL-2	IL-4	IL-17E/IL-25	IFN- γ
	NP	<0.01	5.28	2.02	<0.56	2.54	9.52	1.13	<0.02	<0	<1.15	<0.01	<0.21	2.52
	PLP1	0.02	175	4.41	0.85	3.66	1285	1.71	<0.02	0	6.3	<0.01	<0.21	222
	PLP4	0.02	301	1.11	<0.56	<2.25	20.31	1.13	<0.02	<0	11.19	<0.01	<0.21	162
ドナー 14002202	ベブチド	IL-27	TNF-a	IL-10	IL-5	IL-17A	IL-6	IL-12 p70	IL-23	IL-17F	IL-2	IL-4	IL-17E/IL-25	IFN- γ
	NP	<0.01	<1.11	1.11	<0.56	3.28	89.79	1.41	<0.02	<0	<1.15	<0.01	<0.21	3.17
	PLP4	0.02	211	2.02	1.62	2.91	227	1.71	<0.02	0.02	12.32	0.01	<0.21	286
ドナー 14012005	ベブチド	IL-27	TNF-a	IL-10	IL-5	IL-17A	IL-6	IL-12 p70	IL-23	IL-17F	IL-2	IL-4	IL-17E/IL-25	IFN- γ
	NP	<0.01	7.11	3.27	<0.56	<2.25	99.67	0.99	<0.02	<0	1.28	<0.01	<0.21	5.27
	MOG4	0.08	316	3.49	0.85	2.54	2693	1.71	<0.02	<0	1.67	<0.01	<0.21	816
ドナー 14008003	ベブチド	IL-27	TNF-a	IL-10	IL-5	IL-17A	IL-6	IL-12 p70	IL-23	IL-17F	IL-2	IL-4	IL-17E/IL-25	IFN- γ
	NP	0.07	3.13	1.28	<0.56	3.66	3045	2.03	<0.02	0.01	7.06	0.01	<0.21	260
	MBP1	0.09	13.66	1.63	<0.56	3.66	3569	2.36	<0.02	0.01	8.19	0.01	<0.21	878
	MOG4	0.06	31.65	13.51	<0.56	3.66	>11518	2.36	0.03	0.02	5.16	0.01	<0.21	745
	PLP1	0.07	82.06	7.37	<0.56	4.03	>11518	3.26	0.06	0.07	5.54	0.01	<0.21	692
	PLP4	0.07	73.85	3.05	1.24	3.66	4949	2.71	0.03	0.03	12.69	0.01	<0.21	1585

10

20

30

40

【0150】

多官能性MRTCを検出するために、リード活性化サイトカイン候補として、IFN、TNF及びIL-6の実用性を確立し、更なる8のMSドナーに対して3つのアナライトの多重アッセイを行った。データを表5に示す。

50

【 0 1 5 1 】

表 5 : ミエリンペプチドに反応する 8 つの M S ドナーサンプルのサイトカインレベル
【表 6】

対象者 UPN-USN 14010029-03855								
ランク	ペプチド	濃度 (pg/ml)	アナライツ(ルール)	追加のルールによる陽性	陽性しきい値 (pg/mL)			
1	MBPp6	291.7	IFNg (R1)	IFNg (R2)	TNFa	IL-6	IFNg	IFNg (R1)
2	MOGp6	106.48	IFNg (R3)		67.6	215.15	48.85	97.7
3	PLPp1	202.6	TNFa (R4)					
対象者 UPN-USN 14010030-03856								
ランク	ペプチド	濃度 (pg/ml)	アナライツ(ルール)	追加のルールによる陽性	陽性しきい値 (pg/mL)			
1	PLPp1	89.21	TNFa (R4)		TNFa	IL-6	IFNg	IFNg (R1)
					48.5	127.4	48.5	97
対象者 UPN-USN 14016007-03823								
ランク	ペプチド	濃度 (pg/ml)	アナライツ(ルール)	追加のルールによる陽性	陽性しきい値 (pg/mL)			
1	MOGp4	149	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R3) TNFa (R4)	TNFa	IL-6	IFNg	IFNg (R1)
2	PLPp1	129	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R2) TNFa (R4)	82.35	510	56.75	113.5
3	PLPp4	117	IFNg (R1)					
対象者 UPN-USN 14023002-03824								
ランク	ペプチド	濃度 (pg/ml)	アナライツ(ルール)	追加のルールによる陽性	陽性しきい値 (pg/mL)			
1	MOGp3	5076	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R3) TNFa (R4)	TNFa	IL-6	IFNg	IFNg (R1)
2	PLPp6	3882	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R3) TNFa (R4)	174.8	200.05	324.2	648.4
3	PLPp4	3499	IFNg (R1)	IFNg (R2)				
4	MOGp4	911	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R3) TNFa (R4)				
5	PLPp5	327	IFNg (R3)					
対象者 UPN-USN 14027005-03846								
ランク	ペプチド	濃度 (pg/ml)	アナライツ(ルール)	追加のルールによる陽性	陽性しきい値 (pg/mL)			
1	PLPp4	1680	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R3) TNFa (R4)	TNFa	IL-6	IFNg	IFNg (R1)
2	PLPp3	368	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R3) TNFa (R4)	48.5	85.95	48.5	97
3	MOGp4	184	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R3) TNFa (R4)				
4	PLPp1	94.35	IFNg (R2)	IFNg (R2) TNFa (R4)				
5	MOGp2	122	IFNg (R1)					
対象者 UPN-USN 14102003-03831								
ランク	ペプチド	濃度 (pg/ml)	アナライツ(ルール)	追加のルールによる陽性	陽性しきい値 (pg/mL)			
1	PLPp4	95.14	IFNg (R1)		TNFa	IL-6	IFNg	IFNg (R1)
2	PLPp6	54.82	IFNg (R1)		196.2	199.9	16.05	21.4
3	MOGp3	28.14	IFNg (R1)					
4	MOGp6	21.96	IFNg (R1)					
対象者 UPN-USN 14016004-03874								
ランク	ペプチド	濃度 (pg/ml)	アナライツ(ルール)	追加のルールによる陽性	陽性しきい値 (pg/mL)			
1	MOGp3	124	IFNg (R1)		TNFa	IL-6	IFNg	IFNg (R1)
2	PLPp1	58.52	TNFa (R4)		48.85	48.85	48.85	97.7
対象者 UPN-USN 14007001-03890								
ランク	ペプチド	濃度 (pg/ml)	アナライツ(ルール)	追加のルールによる陽性	陽性しきい値 (pg/mL)			
1	PLPp6	238	IFNg (R1)	IFNg (R2) IFNg (R3) TNFa (R4)	TNFa	IL-6	IFNg	IFNg (R1)
					49.6	73.8	48.85	97.7

【 0 1 5 2 】

実施例 1 . 4 : 考察

【 0 1 5 3 】

方法開発に注力して、信頼のあるプラットフォームを作製して、IFN の分泌を示す最終機能的読取りを有する P B M C 中ミエリン反応 T 細胞 (M R T C) を検出した。

【 0 1 5 4 】

10

20

30

40

50

2つの主要な考察を示した：

【0155】

1) P B M C 中の低い頻度の M R T C、及び陽性免疫を検出するためのそのサンプルサイズへの影響

【0156】

2) 個々のペプチドプールに対する陽性免疫の高スループット読取り値が可能になる好ましい検出システム。

【0157】

最初の目的は、「対」で109のペプチドライブラリーを使用し、55の「標的」を作製し、それに対するT細胞免疫を測定することであった。しかし、120ml採血を原料物質として利用することで、典型的には、1.2億~1.5億細胞へのアッセイに利用可能なP B M Cの総数が限定され、約1億~1.2億のT細胞を含む。簡素なエクスピボアッセイ(例えばE L I S p o t)は、前培養期間がなく、非感受性であり、アッセイ前に抗原特異的T細胞を拡張することができないことが判明した。55のペプチド標的を利用して、十分な細胞を維持して、アッセイで培養物を再刺激することができるようにするために、「対」としてのいずれか1つのペプチド混合物に対する免疫に関して、サンプルサイズ100万のP B M Cのアッセイを行う必要がある。試験にかかわらず、最初のサンプルサイズ100万P B M Cを利用したアッセイでは、頑強となることはない。M R T Cは、「稀な事象」であり、P B M C中、 $1/10^5 \sim 1/10^6$ T細胞が発生していると考えることができ、1つのペプチド混合物またはプール当たりちょうど100万のP B M Cのサンプルサイズは「偽陰性」データとなる傾向にあると考えられる。こうした制限を回避するために、対とは対照的に6つの群でペプチドを貯留し、18のペプチド標的のパネルを作製し、それぞれが、「マクロバルク」培養環境中、300万細胞のP B M Cサンプルサイズに対して評価された。

【0158】

陽性抗ミエリン免疫の検出に関して、P B M Cのマクロバルク培養5日目以降、M B P、M O G及びP L Pを含む18のペプチドプールの存在下において、全体で、3つのアッセイプラットフォームを評価した。低頻度免疫応答が検出されるその可能性により、E L I S p o tを好ましいアッセイであると考えた。しかし、培養5日目までに事前に感作させた免疫を検出するためにアッセイを使用することにより、半定量的データのみ得られた。プレーティング前に細胞の解離に必要とするアッセイに加えて、信頼され得ると考えられるこれらの滴定により、「スポット」を定量化する。代替法として、インサイチュエ11 E L I S Aで発現させて、累積I F N 分泌を測定した。しかし、ダイナミックレンジを欠いていることにより、細胞は、再び、解離及び滴定により、I F N の有意性のある定量化を必要とする。いずれのアッセイも助長するデータとなったが、プラットフォームの複雑性により、それ自体が「高スループット」形式とはならなかった。

【0159】

最終のアッセイの構成には、第5日目に培養物の再刺激を行う第0日目の各ペプチドプールに、サンプルサイズ300万P B M Cを利用した。上清を第6日目に採取して、従来のI F N サンドイッチE L I S A法に滴定した。キラー細胞の滴定を回避したこの方法で、アッセイプラットフォームの複雑性を大きく低減した。

【0160】

18のミエリンペプチドプールへの免疫に加えて、破傷風毒素由来の7つの免疫優性ペプチドに対する免疫を試験する演算子間分散、アッセイ間分散に関して、好ましいアッセイプラットフォームを評価した。

【0161】

アッセイを設計するときの重要な考察は、「偽陽性」データを検出する可能性が制限されることであった。このために、陽性しきい値は、初めに陰性対照培養物の2.5倍上に設定した。加えて、このしきい値は、E L I S A内の培養上清の1:2希釈で侵害する必要があった。このようなしきい値を選択することにより、確実に、「未希釈」上清のデー

10

20

30

40

50

タを分析するときのみ陽性と判定され得る弱い応答を、可能性のある「偽陽性」ペプチドの選択肢として選ぶことができない。このようなしきい値では、不定期の「偽陰性」が報告される可能性が保持される（表3を参照されたい）。しかし、T細胞株を上手く作製することができる、抗原特異免疫を示すように、選択させるペプチドプールが頑強な応答を示すことが最も重要なことである。

【0162】

T細胞ワクチンに対する陽性応答の定義及びペプチドの配分製造

【0163】

開発中、任意の1つのペプチドプールに対する陽性応答は、対応する陰性対照培養物中に記録されたものよりも少なくとも2.5倍高い上清の1:2希釈点でIFN (pg/ml)の濃度を検出することによって定義した。IFNの濃度がアッセイの検出上限(313pg/ml)を超える場合、1:4及び1:8希釈点が範囲内であり、滴定のエビデンスを示す。IFNの存在を示す(例えば、所定のレベルを上回る活性レベルを有する)ペプチドプールを利用すると、複数のT細胞株は、T細胞免疫療法として使用するために作製することができる。

10

【0164】

開発が進むにつれて、EPA上清の多重のサイトカイン分析の利用は、単一のアナライト(例えば、IFN)の検出と対照的に、ミエリンペプチドプールに対する多官能性T細胞応答の検出が可能になる。結果として、幅広い反応度のアレイが検出され、その結果、より多くのドナーがミエリンに対して陽性反応を示す。サイトカインの異なる組み合わせを検出することが、異なる疾患に伴うエピトープのプロファイリングに有用となり得ることが想定される。

20

【0165】

表5は、ペプチドなし対照に対する各ドナーの乗数に基づいてミエリンに対する陽性反応を同定するために利用される「活性レベル」を示す。ミエリンペプチドプールに対する陽性反応の選択を裏付けするために、以下の活性レベルにより、1つ以上のサイトカインの存在を決定した。

【0166】

10xペプチドなし対照を超えるIFN 応答のみ。IFN によるランク付け

【0167】

5xペプチドなし対照を超えるIFN 応答及び5xペプチドなし対照を超えるTNF 応答。IFN によるランク付け

30

【0168】

5xペプチドなし対照を超えるIFN 応答及び5xペプチドなし対照を超えるIL-6 応答。

IFN によるランク付け。

【0169】

5xペプチドなし対照を超えるTNF 応答及び5xペプチドなし対照を超えるIL-6 応答TNF によるランク付け

【0170】

各ドナーについて、表5は、各陽性ペプチドプールに関して、サイトカインまたは第1及び第2のサイトカインの存在をどのように判定したかを示す。濃度(pg/ml)欄は、最も高いランクのサイトカインの濃度及びその関連する活性レベルを示す。多くの場合、ミエリンペプチドプールに対する免疫は、2つ以上のサイトカインの存在によって判定した。8つのうち7つのドナーでは、IFN が存在することによってMRTC反応性が満たされた。1つのドナー(14010030~03856)については、IFN の不在下でのTNF-a及びIL-6シグナルの両者の存在によって陽性が満たされる。

40

【0171】

本明細書で言及されるすべての特許及び特許公報は、参照によって本明細書に援用される。

50

当業者は、前述の明細書を読んだときに、特定の変化形態及び改善形態を思いつくだらう。こうした変化形態及び改善形態はすべて、簡潔性及び可読性のために、本明細書に記載されていないが、適切に次の請求項の範囲内であることを理解すべきである。

【0172】

ミエリンペプチド配列、混合物及びプール

【表7】

MBP			
プール	混合	配列番号	配列
MBPp1	MBPm1	MBP 3	QRHGSKYLATASTMEH
		MBP 4	SKYLATASTMDHARHG
	MBPm2	MBP 5	ATASTMDHARHGFLPR
		MBP 6	TMDHARHGFLPRHPT
	MBPm3	MBP 7	ARHGFLPRHPTGILD
		MBP 8	FLPRHPTGILDSIGR
MBPp2	MBPm4	MBP 11	SIGRFFGGDRGAPKRG
		MBP 12	HGGDRGAPKRGSGKV
	MBPm5	MBP 13	DRGAPKRGSGKVPALK
		MBP 14	PKRGSGKVPALKPGRS
	MBPm6	MBP 15	SGKVPALKPGRSPLPS
		MBP 16	PALKPGRSPLPSIANS
MBPp3	MBPm7	MBP 17	PGRSPLPSIANSQPL
		MBP 18	PLPSIANSQPLCNMY
	MBPm8	MBP 19	HARSQPLCNMYKDSH
		MBP 20	QPLCNMYKDSHHPAR
	MBPm9	MBP 23	HPARTAHYGSLPKKSH
		MBP 24	TAHYGSLPKKSHGRTQ
MBPp4	MBPm10	MBP 25	GSLPKKSHGRTQDENP
		MBP 26	QKSHGRTQDENPVVHF
	MBPm11	MBP 27	GRTQDENPVVHFFKNI
		MBP 28	DENPVVHFFKNIVTRR
	MBPm12	MBP 29	VVHFFKNIVTRTPPP
		MBP 30	FKNIVTRTPPPSQGK
MBPp5	MBPm13	MBP 31	VTRTPPPSQGKGAEG
		MBP 32	TPPPSQGKGAEGQRFQ
	MBPm14	MBP 33	SQGKGAEGQRFQFGYG
		MBP 34	GAEGQRFQFGYGGRAS
	MBPm15	MBP 37	GRASDYKSAHKGFKGV
		MBP 38	DYKSAHKGFKGVDAQG
MBPp6	MBPm16	MBP 39	AHKGFKGVDAQGTLSK
		MBP 40	FKGVDAQGTLSKIFKL
	MBPm17	MBP 41	DAQGTLSKIFKLGGRD
		MBP 42	TLKIFKLGGRDSRSG
	MBPm18	MBP 43	FKLGGRDSRSGSPVA
		MBP 44	GGRDSRSGSPVAFR

MOG			
混合	プール	配列番号	配列
MOGp1	MOGm1	MOG 1	GQFRVIGFRHPIRALV
		MOG 2	VIGFRHPIRALVQDEV
	MOGm2	MOG 3	RHPIRALVQDEVFLPC
		MOG 4	RALVQDEVFLPCRISP
	MOGm3	MOG 5	QDEVFLPCRISPGKNA
		MOG 6	ELPCRISPGKNATGME
MOGp2	MOGm4	MOG 7	RSPKNAIGMEVQWY
		MOG 8	GKNATIGMEVQWYRPF
	MOGm5	MOG 9	TGMEVQWYRPFGRVV
		MOG 10	VQWYRPFGRVVHLYR
	MOGm6	MOG 11	RPFGRVVHLYRNGKD
		MOG 12	SRVVHLYRNGKDDQGD
MOGp3	MOGm7	MOG 13	LHLYRNGKDDQGDQAF
		MOG 14	NGKDDQGDQAFYRIR
	MOGm8	MOG 21	VTLRIRVRFSDDEGGF
		MOG 22	IRVRFSDDEGGFTOFF
	MOGm9	MOG 23	RFSDEGGFTOFFRDHS
		MOG 24	EGGFTOFFRDHSYQEE
MOGp4	MOGm10	MOG 27	YGEEAAMELKVLDPFY
		MOG 28	AAMELKVEDPFYVWSP
	MOGm11	MOG 29	LKVDPFYVWSPGVLV
		MOG 30	DPFYVWSPGVLLAV
	MOGm12	MOG 31	VWSPGVLLAVLPLV
		MOG 32	GVLLAVLPLVLLQI
MOGp5	MOGm13	MOG 37	FLQLQYFLRIGKLRAE
		MOG 38	LQYFLRIGKLRAEENL
	MOGm14	MOG 39	LRIGKLRAEENLHRTF
		MOG 40	URAEENLHRTFHPHF
	MOGm15	MOG 41	ENLHRTFHPHFRLRVP
		MOG 42	HRTFHPHFRLRVPQWKI
MOGp6	MOGm16	MOG 43	QPHFRVPCWIKILFV
		MOG 44	LRVPCWIKILFVMPV
	MOGm17	MOG 45	QAKILFVMPVVLGPI
		MOG 46	TLFVMPVVLGPIVALI
	MOGm18	MOG 47	NFVLGPIVALICYN
		MOG 48	LGPIVALICYMVALHR
MOGm19	MOG 51	VALHRVALICYMVALHR	
	MOG 52	PLAGQFLLELHNNF	

10

20

30

40

【表 8】

PLP			
プール	混合	配列番号	配列
PLPp1	PLPm1	PLP 1	MGLECCARCLVGAFF
		PLP 2	ECCARCLVGAFFASLV
	PLPm2	PLP 7	CFFGVALFCGCGHEAL
		PLP 8	VALFCGCGHEALTGTE
	PLPm3	PLP 11	TGTEKLIETYFSKNYQ
		PLP 12	KLIETYFSKNYQDYEY
PLPp2	PLPm4	PLP 21	LYGALLLAEGFYTTGA
		PLP 22	LLLAEGFYTTGAVROI
	PLPm5	PLP 23	EGFYTTGAVROIQFDY
		PLP 24	TTGAVROIQFDYKTTI
	PLPm6	PLP 25	VRQIFGDYKTTICGKG
		PLP 26	FGDYKTTICGKGLSAT
PLPp3	PLPm7	PLP 33	QHQAHSLERVCHCLGK
		PLP 34	HSLERVCHCLGKWLGH
	PLPm8	PLP 35	RVCHCLGKWLGHFDKF
		PLP 36	CLGKWLGHFDKVFVGIT
	PLPm9	PLP 37	WLGHFDKVFVGIYALT
		PLP 38	FDKVFVGIYALTVVWL
PLPp4	PLPm10	PLP 43	CSAVPVYIYFNTWTTIC
		PLP 44	PVYIYFNTWTTIQSIA
	PLPm11	PLP 47	QSIAFPSKTSASIGSL
		PLP 48	FPSKTSASIGSLCADA
	PLPm12	PLP 49	TSASIGSLCADARMYG
		PLP 50	IGSLCADARMYGVLFW
PLPp5	PLPm13	PLP 51	CADARMYGVLFWNAFP
		PLP 52	RMYGVLFWNAFRGKVC
	PLPm14	PLP 53	VLPWNAFRGKVCNSL
		PLP 54	NAFRGKVCNSLLSIC
	PLPm15	PLP 55	GKVCNSLLSICKTAE
		PLP 56	GSNLLSICKTAEFQMT
PLPp6	PLPm16	PLP 63	ATLVSLTFMAATYN
		PLP 64	SLLTFMAATYNFAVL
	PLPm17	PLP 65	FMAATYNFAVLKLMG
		PLP 66	ATYNFAVLKLMGRGTK
	PLPm18	PLP 67	FAVLKLMGRGTKF

10

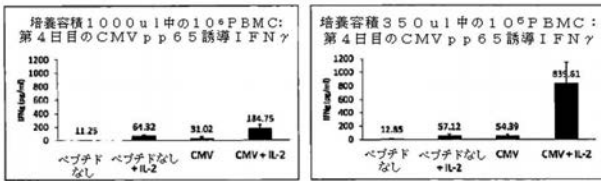
20

30

40

【 図 1 】

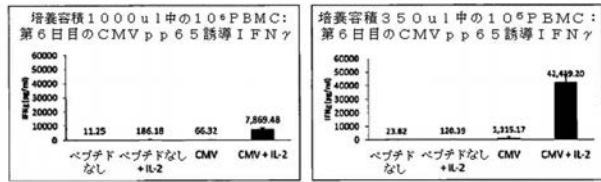
図1



第4日目の2つの播種密度でのPBMCによるCMV pp65誘導IFN γ 応答

【 図 2 】

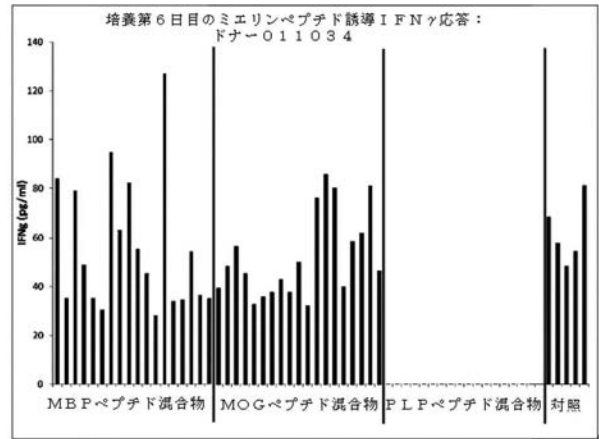
図2



第6日目の2つの播種密度でのPBMCによるCMV pp65誘導IFN γ 応答。

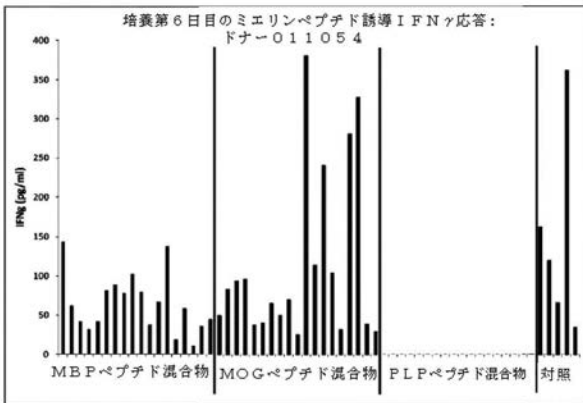
【 図 3 】

図3



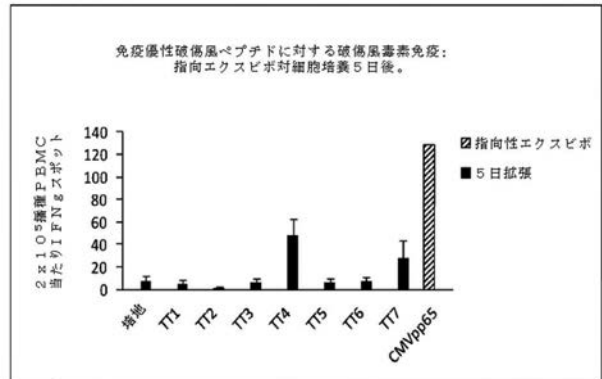
【 図 4 】

図4



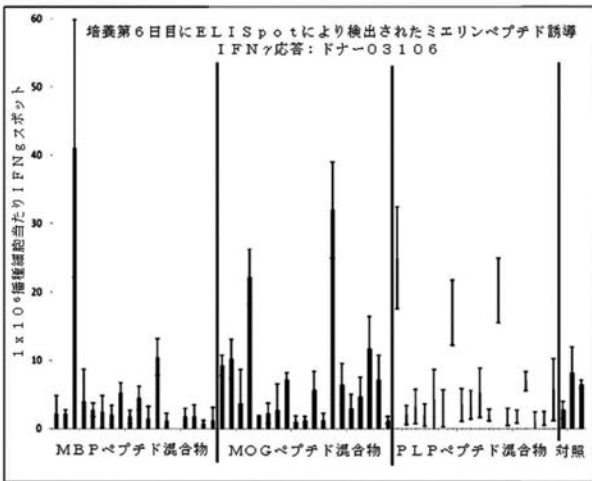
【 図 5 】

図5



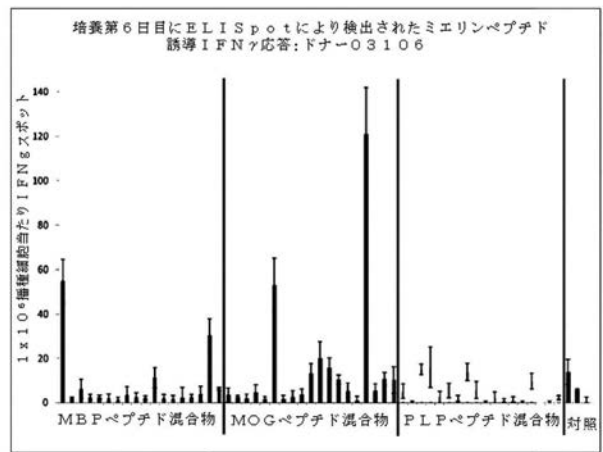
【 図 6 】

図 6



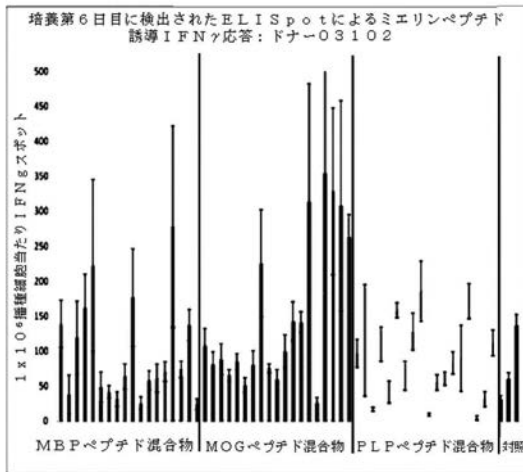
【 図 7 】

図 7



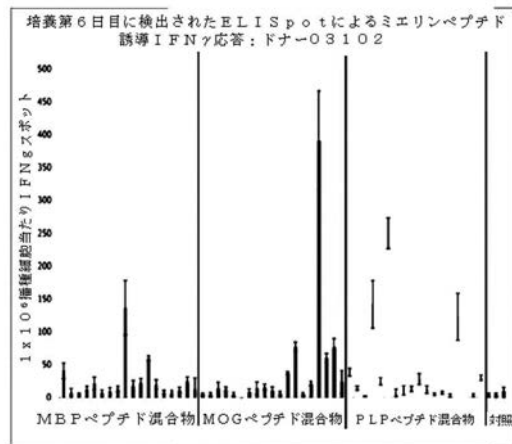
【 図 8 A 】

図 8 A



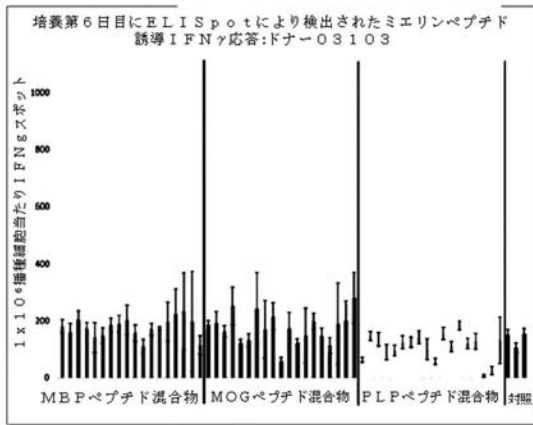
【 図 8 B 】

図 8 B



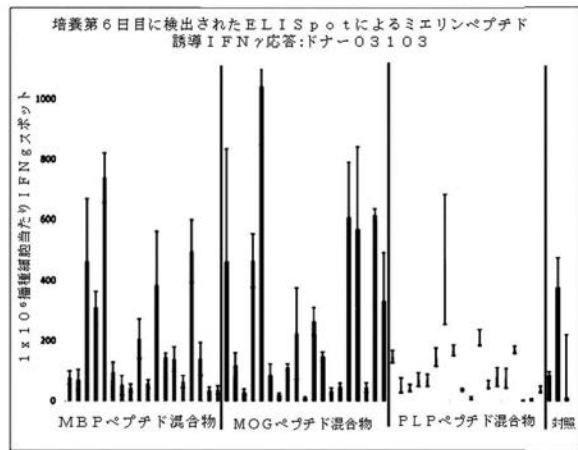
【 図 9 A 】

図 9 A



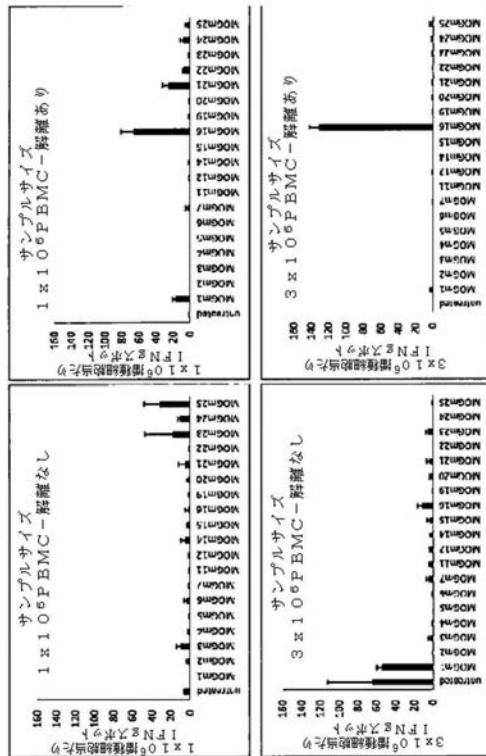
【 図 9 B 】

図 9 B



【 図 1 0 】

図 1 0



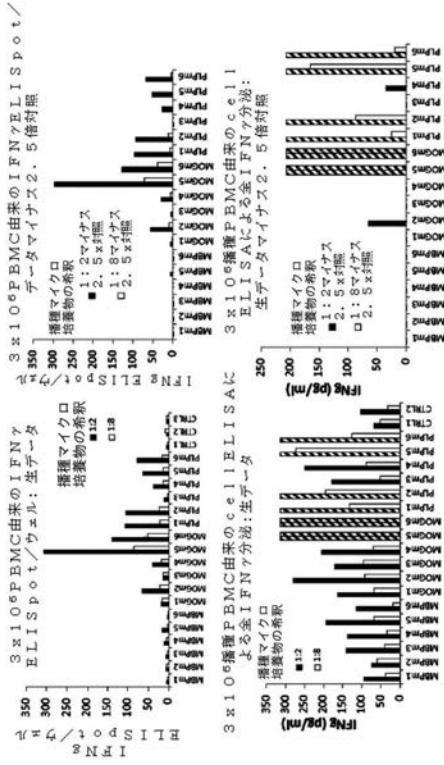
【 図 1 1 】

図 1 1



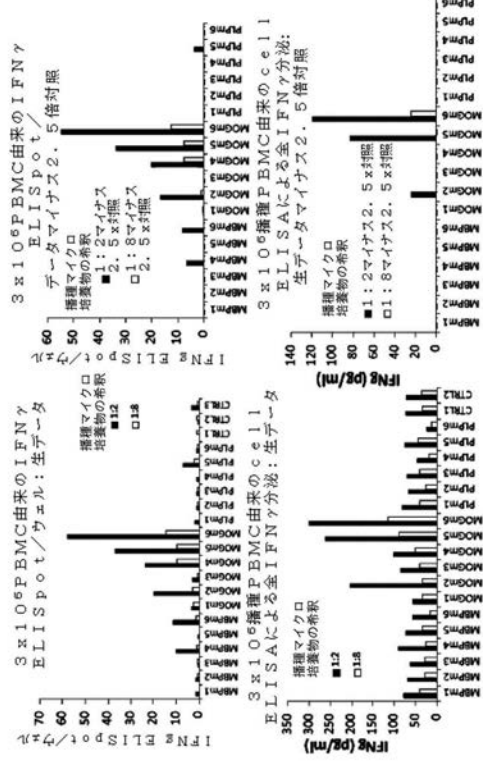
【 図 1 2 】

図 1 2



【 図 1 3 】

図 1 3



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/071571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. G01N33/50 G01N33/564 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 practicable, 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	WO 2004/050909 A2 (DARTMOUTH COLLEGE [US]; IDM IMMUNO DESIGNED MOLECULES [FR]; ABASTADO J) 17 June 2004 (2004-06-17)	1-24
Y	fig. 5-8; examples 1, 4; claims 1-5, 10-13, 19-22, 31, 33; p. 27, l. 35-p. 28, l. 16; whole document	1-16
X	----- BERCOVICI N ET AL: "Multiparameter precursor analysis of T-cell responses to antigen", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 276, no. 1-2, 1 May 2003 (2003-05-01) , pages 5-17, XP004422637, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/S0022-1759(03)00059-0 the whole document ----- -/--	1-24
<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 26 March 2015		Date of mailing of the international search report 02/04/2015
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 Schindler-Bauer, P

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/071571

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. GREER ET AL: "Increased immunoreactivity to two overlapping peptides of myelin proteolipid protein in multiple sclerosis", BRAIN, vol. 120, no. 8, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 1447-1460, XP55103452, DOI: 10.1093/brain/120.8.1447 abstract page 1449, column 2, last paragraph - page 1450, column 2, paragraph first the whole document	1-16
A	----- WO 2007/131210 A2 (OPEXA THERAPEUTICS [US]; WILLIAMS JIM C [US]; MONTGOMERY MITZI M [US];) 15 November 2007 (2007-11-15) the whole document	1-24
A	----- THERESA L. WHITESIDE: "Enzyme-linked Immunospot, Cytokine Flow Cytometry, and Tetramers in the Detection of T-Cell Responses to a Dendritic Cell-based Muropeptide Vaccine in Patients with Melanoma1", CLINICAL CANCER RESEARCH, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 641-649, XP55178934, the whole document	1-24
A	----- LALLA DE C ET AL: "Cutting edge: identification of novel T cell epitopes in Lol p5a by computational prediction", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 163, no. 4, 15 August 1999 (1999-08-15), pages 1725-1729, XP002300994, ISSN: 0022-1767 the whole document	1-24
A	----- MARTIN R ET AL: "FINE SPECIFICITY AND HLA RESTRICTION OF MYELIN BASIC PROTEIN-SPECIFIC CYTOTOXIC T CELL LINES FROM MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS AND HEALTHY INDIVIDUALS", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 145, no. 2, 15 July 1990 (1990-07-15) , pages 540-548, XP000916917, ISSN: 0022-1767 the whole document ----- -/--	1-24

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/071571

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HONG J ET AL: "A COMMON TCR V-D-J SEQUENCE IN VBETA13.1 T CELLS RECOGNIZING AN IMMUNODOMINANT PEPTIDE OF MYELIN BASIC PROTEIN IN MULTIPLE SCLEROSIS", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 163, no. 6, 15 September 1999 (1999-09-15), pages 3530-3538, XP002928174, ISSN: 0022-1767 the whole document -----	1-24

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/071571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004050909 A2	17-06-2004	AU 2003288212 A1	23-06-2004
		CA 2508720 A1	17-06-2004
		EP 1570265 A2	07-09-2005
		US 2006160153 A1	20-07-2006
		WO 2004050909 A2	17-06-2004

WO 2007131210 A2	15-11-2007	AU 2007247869 A1	15-11-2007
		CA 2651328 A1	15-11-2007
		EP 2016414 A2	21-01-2009
		EP 2420833 A1	22-02-2012
		EP 2712623 A1	02-04-2014
		IL 195115 A	31-12-2012
		JP 2009536036 A	08-10-2009
		JP 2013252142 A	19-12-2013
		NZ 572644 A	29-06-2012
		US 2010003228 A1	07-01-2010
		WO 2007131210 A2	15-11-2007

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 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	

(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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72) 発明者 ドン ヒーリー

アメリカ合衆国, テキサス 77830, アンダーソン, カウンティー ロード 188 1730

(72) 発明者 ローレン ウェスト コリソン

アメリカ合衆国, テキサス 78382, ザ ウッドランズ, プレイヤー オークス プレイス 2

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QR48 QS33

4C085 AA03 EE01

4C087 AA01 AA02 BB34 NA14 ZB07 ZB26

专利名称(译)	T细胞表位谱分析方法，T细胞组合物制备方法和疾病治疗方法		
公开(公告)号	JP2017505447A	公开(公告)日	2017-02-16
申请号	JP2016560868	申请日	2014-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	オペクサセラピューテイクスインコーポレイティド		
申请(专利权)人(译)	Opekusa治疗， Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ドンヒーリー ローレンウエストコリソン		
发明人	ドン ヒーリー ローレン ウエスト コリソン		
IPC分类号	G01N33/53 C40B30/06 C12Q1/02 A61K35/17 A61P35/00 A61K39/00 A61P37/02		
CPC分类号	G01N33/6866 A61K35/17 A61K2035/124 G01N33/505 G01N33/564 G01N33/6863 G01N2333/57		
FI分类号	G01N33/53.P C40B30/06 C12Q1/02.ZNA A61K35/17.A A61P35/00 A61K39/00.H A61P37/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4C085/AA03 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB34 4C087/NA14 4C087/ZB07 4C087/ZB26		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 中岛胜		
优先权	61/918570 2013-12-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了检测从受试者中分离的样品中的抗原特异性T细胞的方法和定位抗原的免疫刺激性表位的方法。这样的方法可以用于例如制备用于治疗疾病如癌症，传染病和自身免疫病的抗原特异性T细胞组合物的方法。 [选型图]图1

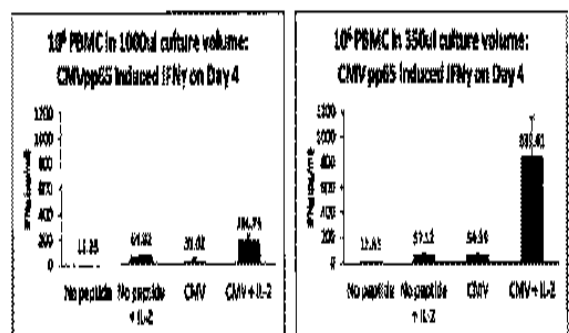


Figure 1: CMV pp65 induced IFN-gamma response in 10⁶ PBMCs at Day 4 with PBMCs of the heading described