

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4550414号  
(P4550414)

(45) 発行日 平成22年9月22日(2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月16日(2010.7.16)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Z N A K	
<b>GO 1 N 33/531</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/531	Z	
<b>C 1 2 Q 1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02		
<b>C O 7 K 7/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 7/04		

請求項の数 8 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2003-524010 (P2003-524010)
(86) (22) 出願日	平成14年8月27日 (2002.8.27)
(65) 公表番号	特表2005-501257 (P2005-501257A)
(43) 公表日	平成17年1月13日 (2005.1.13)
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/002937
(87) 国際公開番号	W02003/019195
(87) 国際公開日	平成15年3月6日 (2003.3.6)
審査請求日	平成17年7月28日 (2005.7.28)
(31) 優先権主張番号	01/11136
(32) 優先日	平成13年8月27日 (2001.8.27)
(33) 優先権主張国	フランス (FR)

(73) 特許権者	500488225
	アンスティテュ ナショナル ド ラ サ ント エ ド ラ ルシュルシェ メディ カル (アンセルム)
	INSTITUT NATIONAL D E LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
	フランス、エフ-75654 パリ セデ ックス 13、リュド トルビアク、1 01
	101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 France

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固体担体上に固定されたペプチドを用いる細胞性免疫試験

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ペプチドが固体担体に付着していることを特徴とする、個体の末梢血単核細胞中に存在するCD4<sup>+</sup> Tリンパ球および/またはCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を含む生体試料を、該個体のMHC分子により提示され得る抗原の1つもしくは複数のTエピトープを構成する1つ以上の該ペプチドと接触させ、この接触により活性化されたエフェクターTリンパ球を検出することにより、該抗原に対する該個体の細胞性免疫応答をインビトロで検出および/または特徴づけるための方法。

## 【請求項 2】

そのうちの少なくとも1つが個体のMHC分子により提示されることが可能であり、抗原の2つの異なるTエピトープを構成する少なくとも2つのペプチドが、固体担体に付着していることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

ペプチドの混合物が固体担体に付着していることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

固体担体が、ペプチドがマイクロタイトレーションプレートの少なくとも2つの異なるウェルに付着している該プレートからなり、生体試料が少なくとも2つのアリコートに分割され、その各々を該ペプチドの1つと接触させることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

10

20

## 【請求項 5】

用いられるペプチドが、1つまたは複数のCD4<sup>+</sup> Tエピトープを構成することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 6】

用いられるペプチドが、1つまたは複数のCD8<sup>+</sup> Tエピトープを構成することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 7】

- 固体担体に付着し、それぞれが抗原の同定されたTエピトープを構成する、同じ抗原に由来するペプチドの組；および

- 活性化されたエフェクターTリンパ球を検出する手段

を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載の方法を行うためのキット。

10

## 【請求項 8】

固体担体に付着し、それぞれが抗原の同定されたTエピトープを構成する、同じ抗原に由来するペプチドの組を含み、該組が、CD4<sup>+</sup> Tエピトープを構成する少なくとも1つのペプチド、およびCD8<sup>+</sup> Tエピトープを構成する少なくとも1つのペプチドを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか1項に記載の方法を行うためのキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、細胞性免疫を検出するための新規の手段に関する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞媒介性免疫は、ウイルス、および宿主細胞内で進化する事ができ、それにより抗体から逃れる、ある種の細菌またはある種の原生動物のような微生物に対する免疫応答において、主要な役割を演じる。これは、移植の拒絶反応および腫瘍の破壊の現象にも含まれる。

## 【0003】

体液性免疫の場合には、分子エフェクターはBリンパ球により分泌される抗体であるが、細胞性免疫の分子エフェクターはTリンパ球の細胞質膜に固定されたTcR受容体である。

## 【0004】

TcRによるTエピトープの認識は、抗体によるBエピトープの認識に含まれるものよりも、さらにより複雑な機構を含む。具体的には、TcRは、エピトープが提示細胞の表面におけるMHC(主要組織適合複合体)のクラスIまたはクラスII分子と結合する場合、そのエピトープを構成するペプチドのみを認識する。よってCD4およびCD8 Tリンパ球のTcRは、MHCのクラスII分子およびクラスI分子によりそれぞれ提示されるエピトープを認識する。

30

## 【0005】

抗原の「Tエピトープ」は、適切なMHCの関係において、Tリンパ球のTcR受容体により認識され得る、そして該リンパ球の活性化を誘導し得る該抗原のいずれかのペプチド断片として定義される。

## 【0006】

Tエピトープのサイズは、ペプチドを提示するMHC分子のクラスに依存して変動する；クラスI MHC分子により提示されるCD8<sup>+</sup> Tエピトープは、8~10アミノ酸のサイズであり、クラスII MHC分子により提示されるCD4<sup>+</sup> Tエピトープは、13~25アミノ酸のサイズである。

40

## 【0007】

同じ抗原について、そして同じMHCクラスについては、エピトープの配列は、関係するMHCの対立遺伝子により変動する。

多数の抗原について、種々のクラスII MHCまたはクラスI MHC対立遺伝子に拘束されるTエピトープの多くの種類が同定されており、これらのエピトープの配列は、文献において入手可能である。

## 【0008】

50

TcR/MHC-結合Tエピトープ相互作用は、T細胞の表面における分子および提示細胞の表面における分子の相互作用に起因する種々の共刺激(costimulation)シグナルの存在下で、リンパ球刺激を誘導し、エフェクターTリンパ球を産生する細胞増殖となる。

【0009】

エフェクターリンパ球は、種々のタイプの免疫応答を定義するそれらのエフェクター機能に従って、種々の集団と一緒にグループ化することができる。これらの集団は、種々の分子(サイトカイン、溶解因子(lytic factors))を分泌するそれらの能力、または特定の分子の組み合わせにより特に区別される。例えば、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>細胞を区別し得るエフェクターリンパ球のうち、サイトカイン、特にインターロイキン2 (IL-2)およびガンマイインターフェロン(γ-IFN)の分泌を特徴とするTh1およびT1リンパ球、ならびにIL-4、IL-5、IL-6およびIL-10のようなサイトカインを分泌するTh2またはT2細胞が挙げられる。

10

【0010】

免疫原との最初の接触から約1ヶ月後に、かなりを検出し得る体液性免疫とは異なり、細胞媒介性免疫は、この最初の接触後、数日にわたって現れる；次いでこれは、増殖することができ、その後の同じ免疫源の提示の間にエフェクター機能を迅速に獲得することができる記憶Tリンパ球の形態で長期間存続する。

【0011】

よって、細胞性免疫は良好な指標を構成することができ、所定の抗原に対する免疫応答の非常に初期の検出、および関連した免疫応答のタイプの決定をさせる。

抗原特異的エフェクターTリンパ球の検出は、例えばワクチンの開発の関係において、種々の研究所で用いられており、免疫エピトープを探索し、免疫原性応答の強度およびタイプを評価する。

20

【0012】

抗原に対する細胞性免疫を評価するのにますます一般に用いられているアプローチは、該抗原の既知のTエピトープを構成するペプチドを提供し、そしてこれらのペプチドに対するTリンパ球反応性を分析することである。

このアプローチは、細胞媒介性応答を産生する病理を診断または監視するために、理論的には用いることができる。しかしながら、抗原/抗体複合体の形成を実証することによりインビトロで迅速に検出することができる体液性免疫とは異なり、細胞性免疫の検出は、常用の試験の関係において用いることが困難な、面倒な技術の使用を含む。

30

実際に：

- 1) TcRによる、試験されるエピトープの認識と、リンパ球の活性化を許容する条件下において、リンパ球に該エピトープを提示し；
- 2) 活性化されたエフェクターリンパ球を検出することが必要である。

【0013】

最近開発された方法のいくつかは、エフェクター細胞の検出を簡略化することを可能にする。例として、VERSTEEGENら(J. Immunol. Methods、111、25~29、1988)により最初に記載されたELISPOT法は、末梢血細胞のうち存在するエピトープ特異的エフェクターTリンパ球を検出し、特徴づけすることを可能にするが、これはTエピトープに相当するペプチドでの再刺激後に該リンパ球により分泌される因子を検出することによる。

40

【0014】

例えばこの技術は、インフルエンザウイルスのエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>エフェクターTリンパ球を同定する(LALVANIら、J. Exp. Med. 186、859~865、1997)；ワクチン中に用いられている種々のHIV1エピトープに相当するペプチドに対するCD8<sup>+</sup>T応答を分析する(GAHERY-SEGARDら、J. Virol.、74、1694~1703、2000)；ESAT-6抗原のエピトープに特異的なエフェクターTリンパ球を検出することによりマイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mycobacterium tuberculosis)感染の存在を検出する(LALVANIら、Am. J. Respir. Crit. Care Med.、163、824~828、2001)のに用いられている。

【0015】

50

上記の出版物に記載されたアッセイは、試験されるペプチドのそれぞれの溶液を、末梢血単核細胞(PBMC)のフィコール勾配での分離により得られる懸濁物に添加することにより行われた；これらの条件下では、これらのペプチドが、MHC分子により直接載せられ、リンパ球に提示されることが、実際に知られている。

【0016】

今回、本発明者らは驚くべきことに、個体のTリンパ球を、該Tリンパ球により認識されるエピトープを構成し、固体担体に付着したペプチドと接触させることが、該エピトープに特異的なエフェクターTリンパ球の活性化となることを知った。

【0017】

本発明の主題は、インビトロで抗原に対する細胞性免疫を検出および/または特徴づけるための、該抗原のTエピトープを構成する少なくとも1つのペプチドが付着した固体担体の使用である。

10

【0018】

詳細には、本発明の主題は、ペプチドが固体担体に付着していることを特徴とする、個体の末梢血単核細胞(PBMC)中に存在するCD4<sup>+</sup> Tリンパ球および/またはCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を含む生体試料を、該個体のMHC分子により提示され得る抗原の1つもしくは複数のTエピトープを構成する1つ以上の該ペプチドと接触させ、この接触により活性化されたエフェクターTリンパ球を検出することにより、該抗原に対する該個体の細胞性免疫応答をインビトロで検出および/または特徴づけるための方法である。

【0019】

20

生体試料は、精製CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> Tリンパ球の調製物からなることができる。また、上記個体からの血液試料より得られたPBMCの調製物からなることもできる；有利には、全血を用いることができる。

【0020】

本発明による方法の好ましい実施形態によると、その少なくとも1つが個体のMHC分子により提示されることが可能であり、上記抗原の2つの異なるTエピトープを構成する少なくとも2つのペプチドが、上記固体担体に付着している。

この実施形態の有利な構成によると、上記ペプチドの混合物が上記固体担体に付着している。

この実施形態の他の有利な構成によると、上記固体担体は、上記ペプチドがマイクロタイトレーションプレートの少なくとも2つの異なるウェルに付着している該プレートからなり、生体試料は少なくとも2つのアリコートに分割され、その各々を該ペプチドの1つと接触させる。

30

【0021】

ペプチドの混合物の使用は、関係する抗原に対する細胞媒介性免疫応答の存在を迅速に検出することを可能にする。種々のペプチドの別々の使用は、この応答の構成要素のよりよい分析を行うことを可能にする。

全ての場合において、用いられるペプチドは、1つもしくは複数のCD4<sup>+</sup> Tエピトープ、または1つもしくは複数のCD8<sup>+</sup> Tエピトープを構成する。1つもしくは複数のCD4<sup>+</sup> Tエピトープ、または1つもしくは複数のCD8<sup>+</sup> Tエピトープを、別々にまたは混合物として、同時に用いることも可能である。

40

【0022】

本発明による方法の他の実施形態は、従来技術で既知の細胞性免疫応答のインビトロでの検出の方法において用いられるものと同じであることが可能である。

例えば、固体担体に付着したペプチドと試験される生体試料は、ペプチドが液相に存在する従来技術の方法と同じ条件下で接触させる。一般には、この接触は、5%のCO<sub>2</sub>の存在下での37 °Cにおける5~20時間のインキュベーションにより行われる。

【0023】

同様に、活性化されたエフェクターTリンパ球の検出は、通常の方法により行うことができる。

50

有利には、これらのリンパ球により分泌される可溶性因子(サイトカインまたは溶解因子)を分析する。例えばIL-2または $\gamma$ -IFNを分析することは、Th1またはT1応答の特徴づけを可能にし、IL-4、IL-5、IL-6またはIL-10を分析することは、Th2またはT2応答の特徴づけを可能にする。実質的にCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を特徴づける、ケモカイン(RANTES)のような他の可溶性因子、または溶解機能をもつ分子(パーフォリン/グランザイム)も分析できる。

#### 【0024】

本発明の関係において任意に用いることができる、活性化されたTリンパ球を検出するための他の方法は、例えばサイトカインの細胞内ラベリングである。

試験されるペプチドを細胞懸濁物に添加する、従来技術で既知の細胞性免疫の検出のための方法に比べて、本発明による方法は、特に種々のペプチドの並行した使用を含む分析の場合に、マイクロタイトレーションプレートのウェルまたはチューブの列において通常行われるアッセイ手順を、かなり簡略化することを可能にする。

#### 【0025】

詳しくは、従来技術の方法は、プレートの各ウェル中、もしくは列の各チューブ中で、規定されたペプチドまたはペプチドの規定された混合物の試験される細胞への添加を必要とするが、本発明の実行の意味においては、プレートのウェルの各々またはチューブの各々が所望のペプチドまたはペプチドの混合物でコートされた、予め準備したプレートまたはチューブを用いることが可能である。このことは、必要な操作をかなり減少させることを可能にし、よってアッセイを行うのに必要な時間の合計を減少させ、そして誤差の原因を制限することによりその再現性を増大させる。

#### 【0026】

さらに、固体担体へのペプチドの付着は、上記ペプチドを安定化し、液状媒体中で迅速に起こる分解からそれらを保護することを可能にする。実例として、ポリスチレンマイクロタイトレーションプレートのウェルへの吸着により付着したペプチドの場合、ペプチドは、20 $\mu$ mにおいて少なくとも24時間、4 $\mu$ mにおいて少なくとも1週間、-80 $^{\circ}$ Cのフリーザーにおいて少なくとも15日間、Tリンパ球の特異的活性化のそれらの特性を維持するが、同じペプチドの溶液は、37 $^{\circ}$ Cにおいて数時間でそれらの特性を失う。

#### 【0027】

さらに、本発明は用いられるペプチドの濃度をかなり減少させるという利点を有し、よって費用の大幅な減少を許容する。

#### 【0028】

本発明の主題は、固体担体に付着し、それぞれが抗原のTエピトープを構成する、同じ抗原に由来するペプチドの組を含む、本発明に従って方法を行うためのキットでもある。

本発明に従ってキットを製造するために、特に抗原/抗体分析キットに通常用いられるものと同じタイプの固体担体および該担体にペプチドを付着させる方法を用いることができる。

例えば、ポリスチレン、ポリエチレンまたはポリビニルクロライドのようなプラスチック材料からつくられた担体、ニトロセルロースからつくられた担体、ガラスのようなシリカベースの材料でつくられた担体などを用いることができる。

#### 【0029】

ペプチドの付着は、それ自体が公知の方法により行うことができる；最も適切な技術の選択は、関係する担体および選択されるペプチドの物理化学的特性に依存する。

例えば、ペプチドを担体上で直接合成すること、または該担体に、予め合成したペプチドを付着させることが可能である。

例えば、ペプチドの付着は、吸着により行うことができる。担体および付着の条件は、もちろん、試験される生体試料の添加および該試料とのインキュベーションの間におけるペプチドの脱着を回避するように選択される。

#### 【0030】

有利には、ペプチドは、直接またはスパーサーアームを介して、共有結合により担体に付着する。この場合、担体の表面はカルボジイミド誘導体、N-ヒドロキシスクシンイミド

10

20

30

40

50

誘導体、スルホスクシンイミド誘導体などのような剤により活性化することができる。

アビジンでコートした担体に付着したビオチン化ペプチドも、用いることができる。

【0031】

担体は、チューブもしくはチューブの組、マイクロタイトレーションプレート、1つ以上の細片、ビーズなどの形態にあることができる。

【0032】

抗原は、特に、感染性微生物(ウイルス、原生動物、細菌)、腫瘍抗原、自己免疫抗原またはアレルゲンであることができる。微生物である場合、組を構成するペプチドは、この生物の種々の抗原性タンパク質に由来することができる。

組を構成するペプチドの選択は、関係する抗原、およびキットを用いようとするその使用にもちろん依存する。これらは、関係する抗原のCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> Tエピトープを構成するとして以前に同定されたペプチドである。

【0033】

有利には、この組は、異なるMHC対立遺伝子により提示され得るペプチドを含む。これは、CD4<sup>+</sup> Tエピトープを構成するペプチド、CD8<sup>+</sup> Tエピトープを構成するペプチドまたはこれらの2つのタイプのエピトープの混合物からなることが可能である。

該組を構成するペプチドは、混合され、混合物の形態で固体担体に付着され得る。固体担体がマイクロタイトレーションプレートまたはチューブの組である場合、マイクロタイトレーションプレートのウェルのうちの1つの内部、またはチューブのうちの1つの内部に付着されている、種々のペプチドまたはペプチドの組み合わせを別々に付着させることができる。

【0034】

本発明によるキットは、活性化されたエフェクターTリンパ球を検出するための手段を含むこともできる。これらの手段は、上記リンパ球により産生される可溶性因子を分析するための試薬からなることが可能である。

【0035】

本発明は、例えば：

- 細胞性免疫応答を産生する、種々の病原性の剤での感染の進展をスクリーニングし、そして監視する関係において、ヒトまたは動物の衛生に用いることができる。例として、HIV (ヒト免疫不全ウイルス) 1および2、FIV (ネコ免疫不全ウイルス)、HTLV-1 (ヒトTリンパ球ウイルスタイプI)、種々のタイプの肝炎のウイルスなどのようなウイルス；トキソプラズマ(*Toxoplasma*)またはプラスモディウム(*Plasmodium*)のような寄生生物；プリオンなどが挙げられる。

- 腫瘍起源の病理の進展をスクリーニングし、そして監視する関係において、ヒトまたは動物の衛生に用いることができる。例としては、黒色腫、乳癌、骨髄性白血病、ヒトパピローマウイルスに関連する子宮頸癌のような、ウイルス感染に関連する癌などが挙げられる。

【0036】

- 自己免疫疾患の進展をスクリーニングし、そして監視する関係において、ヒトまたは動物の衛生に用いることができる。例として、1型糖尿病、多発硬化症などが挙げられる。

- アレルギータイプの疾患の進展をスクリーニングし、そして監視する関係において、ヒトまたは動物の衛生に用いることができる。例として、草、花粉、ある種の医薬製品のようなアレルゲンが挙げられる。

【0037】

関係する使用に関わらず、本発明は、細胞媒介性の免疫の検出により、臨床上の徴候の発現前に、また体液性応答の発現前に、病理の発現または進展の非常に初期の診断を許容する。このことは、よりよい治療上の戦略を選択し、患者にとっての治療の成功のよりよい機会を与える、より迅速な医療上の決定を行うことを可能にする。

【0038】

本発明は、種々のウイルス病原体に対する特異的な細胞性免疫の特徴づけのためのその

10

20

30

40

50

実行を説明する、限定しない実施例に言及する以下のさらなる記載により、より明確に理解されるであろう。

【 0 0 3 9 】

実施例1：Tエпитープを構成するペプチドの固体担体への付着

3つの異なるウイルス：HIV-1ウイルス(ヒト免疫不全ウイルス)、CMV (サイトメガロウイルス)およびEBVウイルス(エプスタイン - バーウイルス)の既知のCD8<sup>+</sup>エピトープを構成する種々のペプチドを合成した。

【 0 0 4 0 】

これらのペプチドは次のごとくである：

HIV-1ウイルス：

gag 77 ~ 85 (SLYNTVATL、HLA A2)

GAG 260 ~ 268 (EIKRWIIL、HLA A2)

Nef 82 ~ 91 (KAALDLSHFL、HLA A2)

CMVウイルス：

GB 619 ~ 628 (FIAGNSAYEYV、HLA A2)

IEI 378 ~ 389 (SDEEEAIVAYTL、HLA B18)

EBVウイルス：

EBNA 3A 379 ~ 387 (RPPIFIRRL、HLA B7)

EBNA 3C 163 ~ 171 (EGGVGWRHV、HLA B44)。

【 0 0 4 1 】

これらのペプチドを、次のプロトコルを用いてポリスチレンプレートのウェルの底に付着させた。

カーボネートバッファー中のペプチド10 μgを、96ウェルのマイクロタイトレーションプレート (ポリスチレンプレート、NUNC MAXISORB)に沈着させた。ペプチドの付着は、周囲温度で2時間の吸着により行う。付着しなかったペプチドをPBS で2回洗浄することにより除去する。

【 0 0 4 2 】

実施例2：HIV-1に対する細胞性免疫の特徴づけ

HIV-1に対して血清陽性の患者(HLA-A2)の血液から精製したPBMCを、次のようにして試験した：

1) リンパ球の活性化：

通常培地(RPMI、10%のBSA)中の細胞懸濁物200 μl (10<sup>5</sup>細胞)を、上記の実施例1に記載のようにしてHIV-1ペプチドが付着した各ウェル中で沈着させる。

ポジティブコントロールとして、通常のELISPOT法によりアッセイを行った：同じ患者からのPBMCの懸濁物200 μl (10<sup>5</sup>細胞)を、NUNC 96ウェルプレート(ペプチドが付着したものと同一)のウェル中に沈着させ、通常培地の溶液中のgag 77 ~ 85、GAG 260 ~ 268またはNef 82 ~ 91ペプチド10 μgと混合する。

【 0 0 4 3 】

2つのアッセイにおいて、コントロールとして、ペプチドなしのウェル中にPBMCを沈着させた。

プレートを5%のCO<sub>2</sub>存在下のインキュベーター中で37 °Cにおいて一晩インキュベートする。

【 0 0 4 4 】

2) 活性化されたCD8<sup>+</sup> Tリンパ球の選択：

次の日、活性化されたCD8<sup>+</sup>細胞の存在を、次のプロトコルに従って明らかにする：

96ウェルのニトロセルロースプレート(MILLIPORE)を、カーボネートバッファー中に1 μg/ml に希釈した抗 IFN-γ抗体(MABTECH、1-D1K) 100 μl/ウェルを用いて、37 °Cにおいて2時間コートした。

次いでプレートをPBS中に洗浄し、100 μl/ウェルの割合でRPMI、10% FCSを用いて、37 °Cにおいて2時間飽和させた。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 5 】

上記の1)に記載のようにして活性化した細胞懸濁物200  $\mu$ lを、このプレートに沈着させる。インキュベーションを37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>で5時間行う。

1  $\times$  PBS中での1回の洗浄、および0.05% TWEENを含むPBS中での5回の洗浄の後、100  $\mu$ l/ウェルの抗-  $\gamma$ -IFNビオチン抗体(MABTECH、7-B6-1-ビオチン)を1  $\mu$ g/mlで添加し、インキュベーションを周囲温度にて2時間行う。

## 【 0 0 4 6 】

プレートをPBS-0.05% TWEEN中に5回洗浄する。

PBS-0.05% TWEEN、1% BSA中に1/5000まで希釈したエクストラアビジン-AKP (SIGMA、No. 2636) 100  $\mu$ l/ウェルを添加する。インキュベーションを、周囲温度にて1時間行う。プレートを再びPBS-0.05% TWEEN中に5回洗浄する。

検出を、BIORADキット(No. 170-6432)を用いて行う。

半時間~1時間後、プレートを水で洗浄することにより反応を停止する。プレートを空気乾燥させる。

## 【 0 0 4 7 】

結果を図1に示す。

A: 通常のELISPOTアッセイ;

B: 固体担体に付着したペプチドを用いて行ったアッセイ。

両方の場合において、gag 77~85ペプチドだけが  $\gamma$ -IFNを分泌するCD8<sup>+</sup>エフェクターTリンパ球の活性化を誘導する。これらの結果は、固体担体に付着したペプチドの使用が、液相に提示されたペプチドのものと少なくとも同程度に、エフェクター細胞の活性化の誘導について効果的であることを示す。

## 【 0 0 4 8 】

実施例3: CMVに対する細胞性免疫の特徴づけ

患者(HLA-A2、B18)の血液から精製したPBMCを、次のようにして試験した。

通常培地の懸濁物中の2  $\times$  10<sup>5</sup>細胞を、上記の実施例1に記載のようにして、CMV ペプチドが付着した各ウェル中に沈着させた。

ポジティブコントロールとして、通常のELISPOT法によりアッセイを行った: 同じ患者からのPBMCの懸濁物の2  $\times$  10<sup>5</sup>細胞を、96ウェルプレート(NUNC) (ペプチドが付着したものと同じ)のウェルに沈着させ、GB 619~628またはIEI 378~389ペプチド10  $\mu$ gと混合する。

## 【 0 0 4 9 】

2つのアッセイにおいて、コントロールとして、PBMCをペプチドなしのウェル中に沈着させた。

上記の実施例2に記載のようにしてプレートのインキュベーションと検出を行う。

結果を図2に示す。

A: 通常のELISPOTアッセイ;

B: 固体担体に付着したペプチドを用いて行ったアッセイ。

両方の場合において、GB 619~628ペプチドだけが  $\gamma$ -IFNを分泌するCD8<sup>+</sup>エフェクターTリンパ球の活性化を誘導する。これらの結果は、HIV-1ペプチドの場合に観察されたことを確かにする。

## 【 0 0 5 0 】

実施例4: 固体担体に付着したペプチドの保存

上記の実施例1に記載のようにしてウェルにEBVペプチドが付着したプレートを:

A) 20  $^{\circ}$ Cで24時間;

B) 4  $^{\circ}$ Cで7日間;

C) -80  $^{\circ}$ Cで15日間

保存した。

通常培地の懸濁液中に患者(HLA B7/B44)の血液から精製したPBMC 2  $\times$  10<sup>5</sup>を、これらのプレートの各ウェル中に沈着させ、上記の実施例3に記載のようにして試験する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 1 】

結果を図3に示す。

A : 20 ℃ で24時間の保存 ;

B : 4 ℃ で7日間の保存 ;

C : - 80 ℃ で15日間の保存。

これらの結果は、保存条件が、固体担体に付着したペプチドのエフェクター細胞 - 活性化特性を変更しないことを示す。

## 【 0 0 5 2 】

実施例5 : 固体担体に付着したペプチドの混合物を用いた、EBVに対する細胞性免疫の検出  
EBVの公知のCD8<sup>+</sup> Tエピトープを構成する次のペプチド :

EBNA 3C 163 ~ 171 (EGVGWRHV、B44)、

EBNA 3A 603 ~ 611 (RLRAEAGVK、A3)、

EBNA 4 416 ~ 424 (IVTDFSVIK、A11)、

EBNA 3C 881 ~ 891 (QPRAPIRPIPT、B7)

EBNA 3A 379 ~ 387 (RPPIFIRRL、B7)、および

EBNA 6 290 ~ 299 (EENLLDFVRF、B44)、

の混合物を、次のプロトコルに従って、ポリスチレンチューブの内壁に付着させた :

カーボネートバッファー中に希釈した各ペプチド10 μgを、ポリスチレンチューブ(15 ml  
チューブ、CORNING)中に沈着させた。ペプチドの付着は、周囲温度にて2時間の吸着によ  
り行う。付着しなかったペプチドは、PBS中に2回洗浄することにより除去する。

## 【 0 0 5 3 】

患者(HLA : A3 ~ A11、B7/B44)からの全血2 mlを、このようにして得たチューブ内に5時  
間インキュベートした。



このインキュベーション後、全血を1500 rpmで10分間遠心分離し、血液からの上清(血  
漿)を移した。血漿(100、50および12.50 μl)を、抗- γ -IFN抗体で予めインキュベートし  
た96ウェルプレート上に、20 ℃ の温度において2時間、重複して沈着させた。洗浄後、ピ  
オチン化抗- γ -IFN 2次抗体を、20 ℃ の温度において1時間添加した。次いでエクストラア  
ピジン-APを20 ℃ の温度において1時間添加し、MUP 基質(アルカリホスファターゼの基質)  
100 μlが反応の現像を可能にした。読み取りを30分後に行った。

## 【 0 0 5 4 】

結果を図4に示す。

図4の凡例 :

## 【表 1】

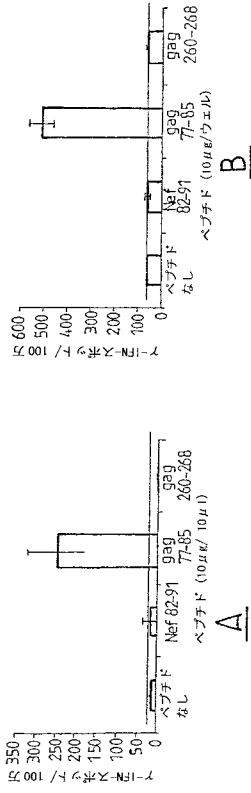
	: ペプチドなし
	: ペプチド 10 μg

これらの結果は、患者の全血を用いて、ウイルスに特異的な細胞性応答の存在の検出(こ  
こではEBVウイルスの検出)が可能であることを示す。この細胞性応答は、ウイルスに特  
異的であり、γ -IFNの産生が、血漿の種々の希釈において検出された。全血のみ(ネガテ  
ィブコントロール)またはEBVウイルスペプチドとインキュベートした全血から得られた  
γ -IFNの産生の間差は、有意であった。患者1056の血液中に存在する細胞は、活性化さ  
れ、そしてEBVウイルス由来CD8<sup>+</sup>ペプチドの存在下の特定の 방법으로 γ -IFNを産生した。

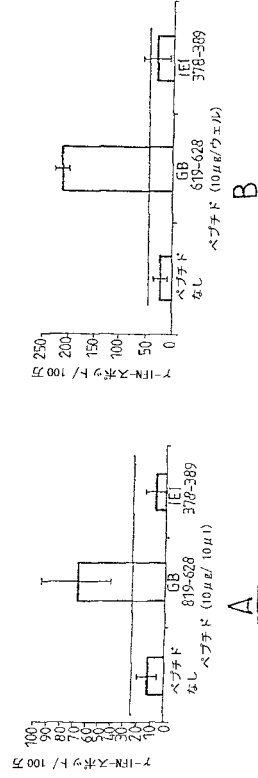
## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 5 5 】

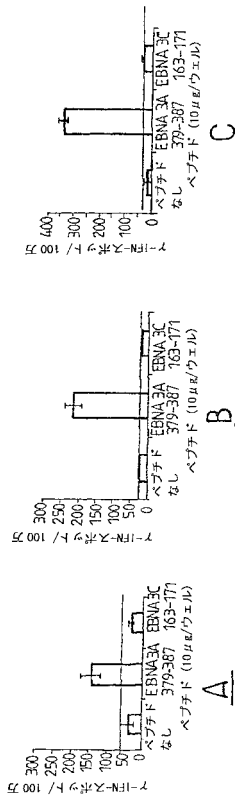
【 図 1 】



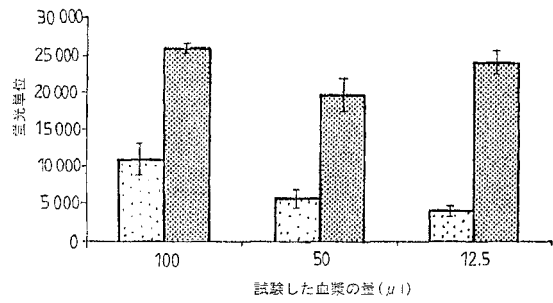
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

0004550414000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 ギャエリー - セガール, アンネ

フランス、エフ - 7 5 0 1 4 パリ、リュ サーレット、1 4

(72)発明者 グイレット, ジャン - ジェラル

フランス、エフ - 7 5 0 0 9 パリ、リュ ジェオフロイ マリー、9 ビス

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 3 7 3 1 3 ( W O , A 1 )

特表平 0 8 - 5 0 6 4 2 1 ( J P , A )

特表平 0 8 - 5 0 1 2 8 2 ( J P , A )

国際公開第 0 0 / 0 7 3 4 6 4 ( W O , A 1 )

国際公開第 0 0 / 0 7 3 7 9 0 ( W O , A 1 )

国際公開第 0 0 / 0 7 3 3 3 5 ( W O , A 1 )

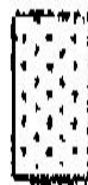
(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48-98

专利名称(译)	使用固定在固体支持物上的肽进行细胞免疫试验		
公开(公告)号	<a href="#">JP4550414B2</a>	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	JP2003524010	申请日	2002-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	国立研究所多拉城主Edora雅倩鲁沙医疗安瑟伦 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉城主等德拉Rushurushe医疗 (安瑟伦)		
当前申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉城主等德拉Rushurushe医疗 (安瑟伦)		
[标]发明人	ギャエリーセガールアンネ グイレットジャンジェラール		
发明人	ギャエリーセガール,アンネ グイレット,ジャン-ジェラール		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 C12Q1/02 C07K7/04 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/505 C07K14/005 C12N2710/16122 C12N2740/16122 C12N2740/16222 C12N2740/16322 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.K G01N33/531.Z C12Q1/02 C07K7/04		
优先权	2001011136 2001-08-27 FR		
其他公开文献	JP2005501257A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及使用固体支持物检测细胞免疫 (用于抗原) 的方法, 在所述固体支持物上固定构成待测抗原的T细胞表位的一组肽, 实施该方法的方法它涉及到的试剂盒。



: ペプチドなし



: ペプチド 10 μg