

(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2019-500604
(P2019-500604A)

(43) 公表日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(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 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	
	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2018-531398 (P2018-531398)
 (86) (22) 出願日 平成28年12月15日 (2016.12.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月3日 (2018.7.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/081141
 (87) 国際公開番号 W02017/102921
 (87) 国際公開日 平成29年6月22日 (2017.6.22)
 (31) 優先権主張番号 15200619.3
 (32) 優先日 平成27年12月16日 (2015.12.16)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 1650493-8
 (32) 優先日 平成28年4月12日 (2016.4.12)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

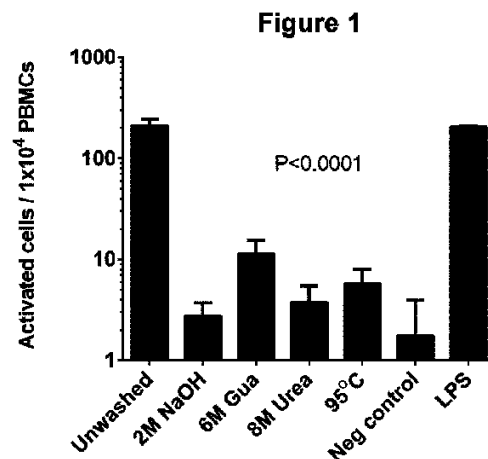
(71) 出願人 518207959
 テーセーエーエル アーバー
 スウェーデン国 111 24 ストック
 ホルム、ヴェストマンナガータン 10、
 アドバイス フェレタグサッシスタンス
 イー ストックホルム、アーバー
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 グレンルド、ハンス
 スウェーデン国、リーディング、ラースベ
 ルグスヴェーゲン 55
 Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QQ08 QR48 QR77
 QS33 QX02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞反応性プラットフォーム

(57) 【要約】

抗原特異性T細胞活性化を *in vitro* でアッセイするための方法であって、(a) 候補抗原ポリペプチドが密に会合した、貪食可能な粒子を与え、会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、後の工程を妨害しないほど十分に低くする工程と；(b) 可変抗原提示細胞を与える工程と；(c) 抗原提示細胞によって粒子の貪食作用が可能になる条件で、洗浄された粒子と、抗原提示細胞とを接触させる工程と；(d) 可変T細胞を含む、アッセイされるT細胞サンプルを与える工程と；(e) 抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的なT細胞活性化が可能になる条件で、T細胞サンプルと、粒子と接触した抗原提示細胞とを接触させる工程と；(f) T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定する工程とを含む、方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原特異性 T 細胞活性化をアッセイするための方法であって、

a . 候補抗原ポリペプチドが密に会合した、貪食可能な粒子を与え、会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、後の工程を妨害しないほど十分に低くする工程と；

b . 可変抗原提示細胞を与える工程と；

c . 前記抗原提示細胞によって前記粒子の貪食作用が可能になる条件で、前記洗浄された粒子と、前記抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と；

d . 可変 T 細胞を含む、アッセイされる T 細胞サンプルを与える工程と；

e . 抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的な T 細胞活性化が可能になる条件で、前記 T 細胞サンプルと、前記粒子と接触した前記抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と；

f . 前記 T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定する工程と

を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記方法が、(a ') 貪食可能な粒子に候補ポリペプチドを密に会合させる工程、および/または(a ") 粒子に会合した候補抗原に対して変性洗浄を行う工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

抗原特異性 T 細胞活性化をアッセイするための方法であって、

a . 貪食可能な粒子を与える工程と；

b . 前記粒子に候補抗原ポリペプチドを密に会合させる工程と；

c . 前記会合したポリペプチドを含む前記粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、後の工程を妨害しないほど十分に低くする工程と；

d . 可変抗原提示細胞を与える工程と；

e . 前記抗原提示細胞によって前記粒子の貪食作用が可能になる条件で、前記洗浄された粒子と、前記抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と；

f . 可変 T 細胞を含む、アッセイされる T 細胞サンプルを与える工程と；

g . 抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的な T 細胞活性化が可能になる条件で、前記 T 細胞サンプルと、前記粒子と接触した前記抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と；

h . 前記 T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定する工程と

を含む、方法。

20

30

【請求項 4】

前記 T 細胞活性化度を、関連するリファレンスと比較する工程をさらに含み、リファレンスと比較して、前記サンプルにおける T 細胞活性化度が高いことが、前記候補抗原が、前記サンプルにおける抗原特異性 T 細胞活性化を引き起こすという結果の指標である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記 T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定することが、前記サンプル中の活性化された T 細胞の割合を決定することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 6】

いくつかの候補抗原を同じ T 細胞サンプルに対してアッセイする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 10 の候補抗原を同じ T 細胞サンプルに対してアッセイする、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記粒子は、最大寸法が 5 . 6 μ m 未満、好ましくは 4 μ m 未満、より好ましくは 3 μ

50

m未満、さらにより好ましくは0.5～2 μmの区間、または最も好ましくは約1 μmである、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記粒子は、実質的に球状である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記変性洗浄が、前記会合したポリペプチドを含む粒子を高いpH、例えば、少なくともpH13、より好ましくは少なくともpH14、最も好ましくは少なくともpH14.3にすることを、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

前記変性洗浄が、前記会合したポリペプチドを含む粒子を低いpHにすることを、請求項1～10のいずれかに記載の方法。

10

【請求項12】

前記変性洗浄が、前記会合したポリペプチドを含む粒子を高温、例えば、少なくとも90℃、より好ましくは少なくとも92℃、最も好ましくは少なくとも95℃にすることを、請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記変性洗浄が、前記会合したポリペプチドを含む粒子を、十分な濃度、例えば、少なくとも5 M、6 M、7 Mまたは8 Mで、変性剤、例えば、尿素または塩酸グアニジンにさらすことを、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

前記変性洗浄によって、抗原中のエンドトキシンの量が、T細胞活性化アッセイにおいて、エンドトキシンの最終的な濃度が100 pg/ml未満、好ましくは50 pg/ml未満、より好ましくは25 pg/ml未満、最も好ましくは10 pg/ml未満になるような量になる、請求項1～13のいずれかに記載の方法。

20

【請求項15】

前記粒子が、常磁性特性を有する、請求項1～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

前記候補抗原ポリペプチドが、前記粒子に共有結合している、請求項1～15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

前記候補抗原ポリペプチドが、金属キレートを介し、前記粒子に結合している、請求項1～16のいずれかに記載の方法。

30

【請求項18】

前記抗原提示細胞と前記T細胞サンプルが、同じ個体に由来する、請求項1～17のいずれかに記載の方法。

【請求項19】

前記抗原提示細胞と前記T細胞サンプルが、同じ血液サンプルに由来する、請求項1～18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】

前記抗原提示細胞と前記T細胞サンプルが、同じ個体由来のPBMCサンプルに由来する、請求項1～19のいずれかに記載の方法。

40

【請求項21】

前記PBMCサンプルが、新鮮であるか、または凍結されている、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記T細胞サンプルが、腫瘍、好ましくは、腫瘍中のリンパ管に由来する、請求項1～18のいずれかに記載の方法。

【請求項23】

前記T細胞サンプルが、腹水に由来する、請求項1～18のいずれかに記載の方法。

【請求項24】

50

前記 T 細胞サンプルが、CD4 + 細胞および / または CD8 + T 細胞を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

前記洗浄された粒子、前記抗原提示細胞および前記 T 細胞サンプルを同時に接触させる、請求項 1 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定することは、IFN - 、IL - 17、IL - 22、またはこれらの組合せの分泌によって反応する抗原提示細胞と接触した T 細胞の割合を決定することを含む、請求項 1 ~ 25 のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

前記方法が、多発性硬化症を診断するためのものであるか、または多発性硬化症の経過を追跡するためのものであり、T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定することを含み、T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定することは、IL - 17 および / または IL - 22 の分泌によって反応する抗原提示細胞と接触した T 細胞の割合を決定することを含む、請求項 1 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

前記 T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定することが、ELISpot または Fluorospot 技術を用いて行われる、請求項 1 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

前記候補抗原ポリペプチドが、少なくとも 50 個のアミノ酸、好ましくは少なくとも 75 個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも 100 個のアミノ酸を含む、請求項 1 ~ 28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

前記候補抗原ポリペプチドが、タンパク質エピトープシグネチャグ (PREST) の形態である、請求項 1 ~ 29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

前記 T 細胞サンプルがヒト由来であり、前記候補抗原ポリペプチド配列がヒト由来である、請求項 1 ~ 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

前記候補抗原ポリペプチドが、疾患に関わりがあることが知られている抗原、または疾患に関わりがあることが疑われる抗原に由来する、請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

前記候補抗原ポリペプチドが、以下のポリペプチド：

- a . 自己免疫疾患に罹患した組織または細胞の中で高度に発現することが知られているポリペプチド；
 - b . 新生物疾患に関わりがあることが知られているポリペプチド；
 - c . 自己免疫疾患に関わりがあることが知られているポリペプチド；
 - d . 感染症に関わりがあることが知られているポリペプチド；または
 - e . アレルギーまたは同様の過敏症に関わりがあることが知られているポリペプチド
- に由来する、請求項 1 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

試験被験体において自己反応性を診断するための請求項 1 ~ 33 のいずれかに記載の方法であって、

- a . 候補ペプチド自己抗原が密に会合した、貪食可能な粒子を与え、前記会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、後の工程を妨害しないほど十分に低くする工程と；
- b . 前記試験被験体から、生存能力のある T 細胞と生存能力のある抗原提示細胞とを含む末梢血単核細胞 (PBMC) サンプルを与える工程と；
- c . 抗原提示細胞によって前記粒子の貪食作用が可能になり、抗原提示細胞によって提

10

20

30

40

50

示される抗原に反応して特異的なT細胞活性化が可能になる条件で、前記P B M Cサンプルと、前記粒子とを *in vitro* で接触させる工程と；

d . 前記接触したP B M C細胞において、活性化したT細胞の割合を定量する工程と；

e . 定量された前記割合と、健康な被験体に由来する相当する定量された割合とを比較する工程であって、それによって、試験被験体において活性化したT細胞の割合が大きいことは、前記試験被験体において前記候補自己抗原に対する自己反応性の指標となる工程と

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、抗原特異性T細胞活性化の決定を含む、診断方法および分析方法の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

適応免疫系は、免疫系の一部を構成し、より一般的な様式で応答する自然免疫系とは対照的に、生物が遭遇する様々な病原体または細胞に損傷を与える攻撃に特異的に適応し、応答することが可能である。適応系は、体液性免疫（すなわち、B細胞によって分泌される抗体）と、T細胞媒介性免疫の両方を含む。適応免疫系の特異性は、B細胞およびT細胞で発現するB細胞受容体およびT細胞受容体にある。遺伝子断片を混合する複雑な系によって、身体は、ほぼ無限の多様なB細胞およびT細胞を生成し、それぞれの細胞が、特定のタンパク質またはペプチドに特異的な受容体を発現する。

20

【0003】

T細胞は、適応免疫系の主要な部分を形成するリンパ球であり、T細胞は、細胞媒介性免疫において中心的な役割を果たす。これを特徴付けるT細胞受容体（TCR）は、細胞表面で発現し、それぞれの受容体が、MHC（主要組織適合性複合体）分子との関係において提示される抗原由来ペプチドを認識する。数種類のT細胞が存在し、それぞれ、細胞免疫反応において固有の機能を有する。

【0004】

簡潔に言うと、異なる機能を有する2種類の主なT細胞が存在する。CD8陽性細胞傷害性T細胞は、細胞表面のMHCクラスI受容体（ヒトでは、ヒト白血球抗原（HLA）クラスIと呼ばれる）上に提示されるペプチドに結合する。全ての有核細胞は、HLAクラスIを発現する。提示されたペプチドが、外来のもの（ウイルス感染の兆候であることが最も多い）であると考えられる場合、細胞傷害性T細胞は、グランザイムBまたはパーフォリンのいずれかのタンパク質によって細胞を死滅させる。ヘルパーT細胞（Th）は、表面マーカーCD4を発現し、死滅させるのではなく、細胞間の炎症誘発シグナル、時には阻害シグナルの両方を増強するサイトカインの分泌によって免疫反応を指揮する。Tヘルパー細胞の別の重要な機能は、B細胞のクラススイッチ、例えば、IgMを分泌するB細胞からIgGを分泌する細胞へのクラススイッチを誘発することであり、抗原に対する体液性免疫反応が高まるだろう。

30

40

【0005】

Tヘルパー細胞は、そのTCRによって、いわゆる抗原提示細胞（APC）または内皮細胞の表面で特異的に発現する受容体であるMHC-I I（ヒトでは、HLAクラスIIと呼ばれる）表面に提示された対応するペプチドに結合する。T細胞活性化は、Th-APC相互作用が起こる微小環境と、APC表面で発現するいわゆる共刺激分子の種類に依存する。Tヘルパー細胞は、異なるThサブセット（例えば、炎症誘発性のTh1、Th2、Th17細胞）または制御T細胞（Treg）と呼ばれる阻害Tヘルパー細胞型に分化することができる。制御されない免疫系は有害であり、組織の損傷および自己免疫を引き起こす場合があるため、後者のサブセットは、免疫反応を制御するために非常に重要である。

50

【0006】

ELISpot、Fluorospot、フローサイトメトリーを用いたサイトカインの細胞内染色、FASCI A、増殖アッセイ（例えば、チミジン取り込み、CFSEまたはBrdU染色）、MHC-IまたはIIのテトラマーを用いた特異的なTCR検出および分泌したサイトカインのELISA分析またはLuminesx分析を含め、抗原特異性T細胞活性化を決定するのに適したいくつかの方法が存在する。

【0007】

ELISpot技術を用い、刺激に反応した細胞による特異的なサイトカインの放出を直接検出する。細胞を膜に播種し、サイトカインを分泌する細胞の数を測定する。どのサイトカインを測定するかに応じて、マクロファージまたはT細胞活性化などの様々な変数を測定することができる。Fluorospotは、ELISpot技術に基づいて構築され、数種類の異なる分泌したサイトカインの同時読み取りを可能にする。これにより、細胞活性化のより正確で微妙な差の概算が可能になる。これらの両方法は、T細胞活性化を迅速かつ容易に測定する方法を与える。

10

【0008】

近年、組換え発現された大量のタンパク質、すなわちクローニング技術および細菌または哺乳動物の発現系を用いて作製されたタンパク質が、Human Atlas Projectのような大規模な研究によって生産されている。本発明者らは、特異的にT細胞を活性化する抗原について、このようなポリペプチドの集合をスクリーニングすることができるが、重要な科学的かつ実際的な関心事であることを認識するようになった。例えば、自己免疫疾患、新生物疾患、アレルギーまたはポリペプチドライブラリーに対する感染症を罹患した患者に由来するT細胞サンプルをスクリーニングし、どのエピトープが患者のT細胞と反応するかを決定することが目的となり得るだろう。現行の方法は、一般的に、どのエピトープが、患者の免疫系が（すなわち体液性反応）に対して抗体を生成するのかを決定することに集中しており、適応免疫系の主要な部分であるT細胞媒介性免疫に対する関連情報は提供されない。したがって、患者または患者群においてT細胞活性化を引き起こす抗原を大スケールで決定することができれば、疾患のために新規バイオマーカーの新しいプールを利用し、より良い診断を可能にし、患者の疾患進行のモニタリングを補助し、治療標的を同定するなどに役立つ。

20

【0009】

現実的な理由から、今日存在する大きなポリペプチドの集合は、通常、E. coliが発現したタンパク質で構成されており、したがって、宿主細胞の外側の膜に由来するかなりの量のエンドトキシンを含む。環境汚染に起因して、真核宿主で調製されたポリペプチドの集合、または非生物ペプチド合成によって調製されたポリペプチドの集合でさえ、実際にはかなりのレベルのエンドトキシンを含む。エンドトキシンは、タンパク質と結合する傾向があり、一旦ポリペプチドサンプルに混入してしまうと、除去するのは困難なことが多いため、大きな集合を調製する際に、エンドトキシンを検出限界未満のレベルまで除外するプロセスを確立することは現実的ではない。

30

【0010】

残念ながら、T細胞活性化を決定するアッセイに共通する問題は、T細胞に接触する低レベルのエンドトキシンでさえ、通常は非常に低レベルである抗原特異性活性化を覆い隠す活性化を引き起こすことである。試験されるT細胞の集合のほんの一部のみが、抗原特異性の様式で所与の抗原と反応し（抗原に最近遭遇した被験体由来の血液の1/10000の程度で）、一方、細胞の大部分がエンドトキシンに反応し、高レベルのバックグラウンドを生じる。遍在するエンドトキシンの混入を考慮すると、現行のポリペプチドの集合を用い、上に概説したスクリーニングを行うことは実現不可能である。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

したがって、当該技術分野で、候補抗原調製においてエンドトキシンの混入に耐えるこ

50

とができ、大きなポリペプチドの集合をスクリーニングすることができる、抗原特異性T細胞活性化をアッセイするための方法が依然として必要である。本発明の目的は、抗原特異性T細胞活性化をアッセイするための改良された方法および手段を提供することである。

【0012】

定義

エンドトキシン、例えば、リポ多糖(LPS)は、グラム陰性菌、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)の外側の細胞壁に見出される共有結合した脂質と多糖サブユニットを含む。

【0013】

CD4⁺ T細胞またはTヘルパー細胞は、サイトカイン分泌を介して免疫応答を調整する細胞である。これらの細胞は、他の免疫細胞を抑制するか、または増強することができる、例えば、B細胞の抗体クラススイッチ、細胞傷害性T細胞の増殖を刺激するか、または食細胞を増強することができる。これらは、APC上のMHCクラスIIを介する抗原提示によって達成され、これらは、特定の抗原内の約15アミノ酸の伸長(いわゆるT細胞エピトープ)に特異的なT細胞受容体(TCR)を発現する。

【0014】

CD8⁺ T細胞または細胞傷害性T細胞は、腫瘍細胞、感染細胞またはそれ以外の損傷した細胞を死滅させる細胞である。CD4⁺ T細胞とは異なり、これらの細胞は、活性化のためにAPCを必要としない。これらのT細胞受容体は、全ての有核細胞表面で発現するタンパク質であるMHCクラスIによって提示される抗原由来ペプチド(約9~11アミノ酸長)を認識する。

【0015】

抗原特異性T細胞活性化は、共刺激と組み合わせて、TCRと、MHC(HLA)分子表面に提示される所定のペプチドとの相互作用を必要とするプロセスである。

【0016】

タンパク質エピトープシグネチャタグ(PreEST):組換え産生されたペプチド。宿主(例えばヒト)由来のタンパク質のフラグメントであり、このペプチドから誘導されるタンパク質の固有のペプチド配列を表している(Lindskog M、Rockberg J、Uhlen M、Sterky F、Selection of protein epitopes for antibody production. Biotechniques. 2005; 38(5): 723-7を参照)。

【0017】

抗原提示細胞(APC)は、典型的には、細胞外の生物またはタンパク質(すなわち、抗原)を貪食するか、または内在化し、処理後に、MHCクラスII表面の抗原由来ペプチドをCD4⁺ T細胞に提示する、樹状細胞(DC)、B細胞またはマクロファージ、細胞である。血液中では、単球が最も豊富に含まれる抗原提示細胞である。

【0018】

貪食可能な粒子は、免疫系の細胞、特に単球によって貪食され得る粒子であると定義される。

【0019】

末梢血単核細胞PBMCは、全血の密度勾配遠心分離によって調製されたヒト血液の画分である。PBMC画分は、主にリンパ球(70~90%)と単球(10~30%)からなっており、赤血球、顆粒球および血漿は除去されている。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明は、以下の項目に関する。以下の項目に開示される特定事項は、その特定事項が特許請求の範囲に開示されているのと同じ様式で開示されているとみなすべきである。

【0021】

1. 抗原特異性T細胞活性化をアッセイするための方法であって、

10

20

30

40

50

a . 候補抗原ポリペプチドが密に会合した、貪食可能な粒子を与え、会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、後の工程を妨害しないほど十分に低くする工程と；

b . 可変抗原提示細胞を与える工程と；

c . 抗原提示細胞によって粒子の貪食作用が可能になる条件で、洗浄された粒子と、抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と；

【0022】

d . 可変T細胞を含む、アッセイされるT細胞サンプルを与える工程と；

e . 抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的なT細胞活性化が可能になる条件で、T細胞サンプルと、粒子と接触した抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と；

f . T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定する工程とを含む、方法。

【0023】

2 . 方法が、(a ') 貪食可能な粒子に候補ポリペプチドを密に会合させる工程、および/または(a ") 粒子に会合した候補抗原に対して変性洗浄を行う工程をさらに含む、項目1に記載の方法。

【0024】

3 . 抗原特異性T細胞活性化をアッセイするための方法であって、

a . 貪食可能な粒子を与える工程と；

b . 粒子に候補抗原ポリペプチドを密に会合させる工程と；

c . 会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、後の工程を妨害しないほど十分に低くする工程と；

d . 可変抗原提示細胞を与える工程と；

e . 抗原提示細胞によって粒子の貪食作用が可能になる条件で、洗浄された粒子と、抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と；

f . 可変T細胞を含む、アッセイされるT細胞サンプルを与える工程と；

g . 抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的なT細胞活性化が可能になる条件で、T細胞サンプルと、粒子と接触した抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と；

h . T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定する工程とを含む、方法。

【0025】

4 . T細胞活性化度を、関連するリファレンスと比較する工程をさらに含み、リファレンスと比較して、サンプルにおけるT細胞活性化度が高いことが、その候補抗原が、そのサンプルにおける抗原特異性T細胞活性化を引き起こすという結果の指標である、項目1～3のいずれかに記載の方法。

【0026】

5 . T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定することが、サンプル中の活性化されたT細胞の割合を決定することを含む、項目1～4のいずれかに記載の方法。

【0027】

6 . いくつかの候補抗原を同じT細胞サンプルに対してアッセイする、項目1～5のいずれかに記載の方法。

【0028】

7 . 少なくとも10の候補抗原を同じT細胞サンプルに対してアッセイする、項目1～6のいずれかに記載の方法。

【0029】

8 . 粒子は、最大寸法が5 . 6 μm 未満、好ましくは4 μm 未満、より好ましくは3 μm 未満、さらにより好ましくは0 . 5 ~ 2 μm の区間、または最も好ましくは約1 μm である、項目1～7のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0030】

9. 粒子は、実質的に球状である、項目8に記載の方法。

【0031】

10. 変性洗浄が、会合したポリペプチドを含む粒子を高いpH、例えば、少なくともpH13、より好ましくは少なくともpH14、最も好ましくは少なくともpH14.3にすることを含む、項目1~9のいずれかに記載の方法。

【0032】

11. 変性洗浄が、会合したポリペプチドを含む粒子を低いpHにすることを含む、項目1~10のいずれかに記載の方法。

【0033】

12. 変性洗浄が、会合したポリペプチドを含む粒子を高温、例えば、少なくとも90、より好ましくは少なくとも92、最も好ましくは少なくとも95にすることを含む、項目1~11のいずれかに記載の方法。

【0034】

13. 変性洗浄が、会合したポリペプチドを含む粒子を、十分な濃度、例えば、少なくとも5M、6M、7Mまたは8Mで、変性剤、例えば、尿素または塩酸ゲアニジンにさらすことを含む、項目1~12のいずれかに記載の方法。

【0035】

14. 変性洗浄によって、抗原中のエンドトキシンの量が、T細胞活性化アッセイにおいて、エンドトキシンの最終的な濃度が100pg/ml未満、好ましくは50pg/ml未満、より好ましくは25pg/ml未満、最も好ましくは10pg/ml未満になるような量になる、項目1~13のいずれかに記載の方法。

【0036】

15. 粒子が、常磁性特性を有する、項目1~14のいずれかに記載の方法。

【0037】

16. 候補抗原ポリペプチドが、粒子に共有結合している、項目1~15のいずれかに記載の方法。

【0038】

17. 候補抗原ポリペプチドが、金属キレートを介し、粒子に結合している、項目1~16のいずれかに記載の方法。

【0039】

18. 抗原提示細胞とT細胞サンプルが、同じ個体に由来する、項目1~17のいずれかに記載の方法。

【0040】

19. 抗原提示細胞とT細胞サンプルが、同じ血液サンプルに由来する、項目1~18のいずれかに記載の方法。

【0041】

20. 抗原提示細胞とT細胞サンプルが、同じ個体由来のPBMCサンプルに由来する、項目1~19のいずれかに記載の方法。

【0042】

21. PBMCサンプルが、新鮮であるか、または凍結されている、項目20に記載の方法。

【0043】

22. T細胞サンプルが、腫瘍、好ましくは、腫瘍中のリンパ管に由来する、項目1~18のいずれかに記載の方法。

【0044】

23. T細胞サンプルが、腹水に由来する、項目1~18のいずれかに記載の方法。

【0045】

24. T細胞サンプルが、CD4+細胞および/またはCD8+T細胞を含む、項目1~23のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0046】

25. 洗浄された粒子、抗原提示細胞およびT細胞サンプルを同時に接触させる、項目1~24のいずれかに記載の方法。

【0047】

26. T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定することは、IFN-、IL-17、IL-22、またはこれらの組合せの分泌によって反応する抗原提示細胞と接触したT細胞の割合を決定することを含む、項目1~25のいずれかに記載の方法。

【0048】

27. 方法が、多発性硬化症を診断するためのものであるか、または多発性硬化症の経過を追跡するためのものであり、T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定することを含み、T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定することは、IL-17および/またはIL-22の分泌によって反応する抗原提示細胞と接触したT細胞の割合を決定することを含む、項目1~26のいずれかに記載の方法。

10

【0049】

28. T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定することが、ELISpotまたはFluoroSpot技術を用いて行われる、項目1~27のいずれかに記載の方法。

【0050】

29. 候補抗原ポリペプチドが、少なくとも50個のアミノ酸、好ましくは少なくとも75個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも100個のアミノ酸を含む、項目1~28のいずれかに記載の方法。

20

【0051】

30. 候補抗原ポリペプチドが、タンパク質エピトープシグネチャグ(PREST)の形態である、項目1~29のいずれかに記載の方法。

【0052】

31. T細胞サンプルがヒト由来であり、候補抗原ポリペプチド配列がヒト由来である、項目1~30のいずれかに記載の方法。

【0053】

32. 候補抗原ポリペプチドが、疾患に関わりがあることが知られている抗原、または疾患に関わりがあることが疑われる抗原に由来する、項目1~31のいずれかに記載の方法。

30

【0054】

33. 候補抗原ポリペプチドが、以下のポリペプチド：

- a. 自己免疫疾患に罹患した組織または細胞の中で高度に発現することが知られているポリペプチド；
- b. 新生物疾患に関わりがあることが知られているポリペプチド；
- c. 自己免疫疾患に関わりがあることが知られているポリペプチド；
- d. 感染症に関わりがあることが知られているポリペプチド；または
- e. アレルギーまたは同様の過敏症に関わりがあることが知られているポリペプチドに由来する、項目1~32のいずれかに記載の方法。

【0055】

34. 試験被験体において自己反応性を診断するための項目1~33のいずれかに記載の方法であって、

a. 候補ペプチド自己抗原が密に会合した、貪食可能な粒子を与え、会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、後の工程を妨害しないほど十分に低くする工程と；

b. 試験被験体から、生存能力のあるT細胞と生存能力のある抗原提示細胞とを含む末梢血単核細胞(PBMC)サンプルを与える工程と；

c. 抗原提示細胞によって粒子の貪食作用が可能になり、抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的なT細胞活性化が可能になる条件で、PBMCサンプルと、粒子とを*in vitro*で接触させる工程と；

40

50

d . 接触した P B M C 細胞において、活性化した T 細胞の割合を定量する工程と ;
 e . 定量された割合と、健康な被験体に由来する相当する定量された割合とを比較する工程であって、それによって、試験被験体において活性化した T 細胞の割合が大きいことは、この試験被験体において候補自己抗原に対する自己反応性の指標となる工程とを含む、方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 6 】

【図 1】エンドトキシン除去のための様々な洗浄の比較。様々な変性洗浄の有効性を未洗浄ビーズと比較して、様々な洗浄を行ったタンパク質に接続したビーズに応答した単球活性を評価した。活性化が低い方が望ましい。一元配置 A N O V A を用いて P 値を決定した。ひげ線は、S D を意味する。

【図 2】細胞増殖アッセイを用いた T 細胞活性化の測定。オボアルブミン感作マウス由来の脾細胞を用いたチミジン取り込みアッセイ。オボアルブミンが接続したビーズ、ウシ血清アルブミンが接続したビーズ、培地の比較。スチューデントの T 検定で P 値が決定され、 $p < 0.05$ が見出されたときに示された。ひげ線は S D を示す。

【図 3】M S の疑わしい自己抗原を用いて刺激したときの、多発性硬化症 (M S) 患者および健康なコントロールにおける T 細胞活性化を比較する I F N γ / I L - 2 2 / I L - 1 7 F l u o r o s p o t アッセイ。P 値は、M a n n - W h i t n e y - U 検定を用いて決定され、見出されたときに記載されている。ひげ線は、平均の C I 9 5 % を示す。

【図 4】125 種類のタンパク質のライブラリーに対する、多発性硬化症患者における自己抗原スクリーニング。M S 患者由来の P B M C から、健康なコントロール由来の P B M C までの T 細胞活性化の比較。パネル A、I L 2 2 - F l u o r o S p o t による活性化の決定。パネル B、I L 1 7 - F l u o r o S p o t による活性化の決定。パネル C、I F N γ - F l u o r o S p o t による活性化の決定。患者の T 細胞は、ライブラリー中の特定のタンパク質とさらに有意に反応する。白四角および黒丸は、それぞれ患者およびコントロールの P B M C の平均活性化を示し、ひげ線は、平均の C I 9 5 % を示す。P 値は、二元配置 A N O V A を用いて決定した。アスタリスクは、P 値を示す。

【図 5】ビーズの大きさが T 細胞活性化に及ぼす影響。オボアルブミン感作マウス由来の脾細胞を用いた増殖アッセイ (チミジン取り込みによる)。直径 5 . 6 μ m、1 μ m および 0 . 2 μ m の異なる大きさのビーズに接続したオボアルブミンの比較。スチューデントの T 検定を用いて P 値が決定され、 $p < 0.05$ が見出されたときに記載された。ひげ線は S D を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 7 】

本発明は、以下により詳細に開示する抗原特異性 T 細胞活性化をアッセイするための方法および手段を提供する。抗原特異性 T 細胞活性化に対するアッセイにおいて、エンドトキシンが混入したポリペプチドを用いることに関連する問題を解決することによって、本方法および本手段によって、バイオマーカーの発見、診断、患者における疾患進行のモニタリング、治療標的の同定などのための新しいポリペプチドの集合および既存のポリペプチドの集合の大規模スクリーニングを可能にし、容易にする。

【 0 0 5 8 】

抗原特異性 T 細胞活性化をアッセイするための方法

第 1 の態様において、本発明は、抗原特異性 T 細胞活性化をアッセイするための *i n v i t r o* 方法であって、

a . 候補抗原ポリペプチドが密に会合した、貪食可能な粒子を与え、会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、本方法の後のいずれかの工程 (b ~ f) を妨害しないほど十分に低くする工程と ;

b . 可変抗原提示細胞 (A P C) を与える工程と ;

c . 抗原提示細胞によって粒子の貪食作用が可能になる条件で、洗浄された粒子と、粒子と接触した抗原提示細胞とを *i n v i t r o* で接触させる工程と ;

10

20

30

40

50

- d . 可変 T 細胞を含む、アッセイされる T 細胞サンプルを与える工程と ;
- e . 抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的な T 細胞活性化が可能になる条件で、T 細胞サンプルと、抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と ;
- f . T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定する工程とを含む、方法を提供する。

この方法は、(a ') 貪食可能な粒子に候補ポリペプチドを密に会合させる工程、および/または (a ") 粒子に会合した候補抗原に対して変性洗浄を行う工程をさらに含んでいてもよい。したがって、第 1 の態様の方法は、

- a . 貪食可能な粒子を与える工程と ;
- b . 粒子に候補抗原ポリペプチドを密に会合させる工程と ;
- c . 会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、本方法の後の任意の工程 (d ~ h) を妨害しないほど十分に低くする工程と ;
- d . 可変抗原提示細胞を与える工程と ;
- e . 抗原提示細胞によって粒子の貪食作用が可能になる条件で、洗浄された粒子と、抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と ;
- f . 可変 T 細胞を含む、アッセイされる T 細胞サンプルを与える工程と ;
- g . 抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的な T 細胞活性化が可能になる条件で、T 細胞サンプルと、粒子と接触した抗原提示細胞とを *in vitro* で接触させる工程と ;
- h . T 細胞サンプルにおける T 細胞活性化度を決定する工程とを含む、方法を提供する。

10

20

【 0 0 5 9 】

洗浄された粒子、抗原提示細胞および T 細胞サンプルを、同じ容器内で同時に接触させてもよい。抗原特異性の細胞活性化が可能になる条件のために、T 細胞サンプルと、粒子と接触させた抗原提示細胞とを接触させる工程における条件は、抗原特異性ではない T 細胞活性化からのバックグラウンドが、このアッセイを妨害しないほど十分に低いような条件でなければならない。

【 0 0 6 0 】

候補抗原ポリペプチド

候補抗原ポリペプチドは、好ましくは少なくとも 50 個のアミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも 75 個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも 100 個のアミノ酸を含む。候補抗原ポリペプチドは、Protein Epitope Signature Tag (PREST) の形態であってもよい。PREST からなる大きなタンパク質ライブラリー、例えば、Human Atlas Project の中で作製されたライブラリーが既に存在する (Uhlen M、Fagerberg L、Hallstrom B M、Lindskog C、Oksvold P、Mardinoglu A ら、Proteomics . Tissue - based map of the human proteome . Science . 2015 ; 347 (6220) : 1260419) 。PREST は、対応する全長タンパク質に固有のアミノ酸配列を含み、ほとんどのヒトタンパク質に対する抗体を作成するための大規模 Human Atlas Project で使用されてきた。同じヒトタンパク質のためにいくつかの PREST を使用すると、関連する T 細胞エピトープを発見する機会が増える。APC による抗原の分解は均一なプロセスではないため、APC によって提示されるフラグメントより大きな抗原ポリペプチドは、各抗原の多種多様なエピトープが提示されることも確実にする。言い換えると、特定の大きさを有するポリペプチド抗原の使用は、APC の貪食経路を利用することによって可能になり、細胞処理を行わずに直接的に MCH 受容体に結合することができる短いペプチド中の抗原を提示することと比較すると、より少ない抗原ポリペプチドを使用し、優れた抗原の検出が可能になる。

30

40

【 0 0 6 1 】

候補抗原ポリペプチドは、疾患に関わりがあることが知られている抗原、または疾患に

50

関わりがあることが疑われる抗原に由来していてもよい。例えば、候補抗原ポリペプチドは、以下のポリペプチドに由来する。

a．自己免疫疾患に罹患した組織または細胞の中で高度に発現することが知られているポリペプチド。例は、プロインスリン、ミエリン関連タンパク質である。

b．新生物疾患に関わりがあることが知られているポリペプチド。例は、エストロゲン受容体、上皮成長因子受容体、サイクリン依存性キナーゼ1である。

c．自己免疫疾患に関わりがあることが知られているポリペプチド。例：ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質、ミエリン塩基性タンパク質、トランスアルドラーゼ。

d．感染症に関わりがあることが知られているポリペプチド。例：ウイルスキャプシド抗原、細菌エンテロトキシン。

e．アレルギーまたは同様の過敏症に関わりがあることが知られているポリペプチド。例：Can f 1、Equ c 1、Fel d 1。

f．既知の腫瘍抗原；例えば、p53、ERBB2 (Erb - B 2 受容体チロシンキナーゼ2)、PIK3CA (ホスファチジルイノシトール - 4 , 5 - ビスホスフェート 3 - キナーゼ) における共通の変異によって作られるネオアンチゲン。

g．既知の改変タンパク質、例えば、シトルリン化されたバリエーションまたはリン酸化タンパク質。

【0062】

T細胞サンプルと候補抗原ポリペプチドは、同じ種または異なる種に由来する。例えば、自己免疫または新生物疾患を研究するために、T細胞サンプルと候補抗原ポリペプチドは、好ましくは、同じ種に由来する。感染症を研究するために、T細胞サンプルは宿主に由来し、候補抗原ポリペプチドは、目的の病原体に由来する。アレルギーまたは類似の過敏症を研究するために、T細胞サンプルは、目的の被験体に由来し、候補抗原ポリペプチドは、この被験体においてアレルギーまたは他の過敏症反応を誘発することが知られているか、または誘発することが疑われる異なる種に由来する。

【0063】

T細胞サンプルは、ヒト由来であってもよく、候補抗原ポリペプチド配列は、ヒト由来であってもよい。

【0064】

粒子の特性

粒子は、抗原提示細胞 (APC、以下に論じる) によって貪食可能である。APCは、多くの異なる材料および形状の粒子を貪食することができる。これとは対照的に、粒子の大きさは、貪食作用のために限定される。大きさが小さすぎると、抗原提示細胞は、粒子を貪食するように誘発されないだろう。大きさが大きすぎると、抗原提示細胞に適合しないため、粒子を貪食することができないだろう。

【0065】

粒子は、最大寸法が5.6 μm未満、好ましくは4 μm未満、より好ましくは3 μm未満、さらにより好ましくは0.5 ~ 2 μmの間隔、または最も好ましくは約1 μmであってもよい。粒子は、実質的に球状であってもよく、この場合、寸法とは、直径を指す。

【0066】

細菌の大きさと似た大きさであれば、APCによる完全な貪食作用が容易になる。これにより、抗原がAPCによって分解され、その後、MHC IIを介してT細胞に確実に提示される。最適な大きさは、特定のAPCの種類に依存し、通常の実験によって決定することができる (実施例5、図5を参照) 。

【0067】

粒子は、常磁性特性を有していてもよく、粒子を回収することができ、および/または磁石によって所定の位置に保持することができることによって、以下に記載する変性洗浄が容易になる。しかし、他の手段によって、例えば、粒子をカラムに保持することによって、または粒子を重力または遠心分離処理によって沈降させることによって、洗浄を行うことも可能である。

10

20

30

40

50

【0068】

抗原ポリペプチドと粒子との会合

抗原ポリペプチドは、粒子が抗原から解離することなく、以下に記載する変性洗浄を行うことができる様式で、粒子に会合する。

【0069】

ポリペプチドを粒子に会合させる1つの可能な方法を実施例1に示す。しかし、会合の正確な様式は、本発明の方法にとって重大ではない。好ましくは、候補抗原ポリペプチドは、粒子に共有結合している。または、候補抗原ポリペプチドは、金属キレートを通じて粒子に接続していてもよい。

【0070】

例えば、イミノジ酢酸などの金属キレート配位子と結合した粒子は、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} または Fe^{3+} などの金属イオンと結合することができる。これらの金属キレートは、その後、例えば、ヒスチジンまたはシステインを含むタンパク質およびペプチドに、大きな強度で結合することができる。したがって、金属キレートを含む粒子は、結合したペプチド/タンパク質中のLPSおよび他の汚染成分の量を減らすためのストリンジентな洗浄が可能な様式で、ペプチド/タンパク質に非共有結合的に吸着することができる。

【0071】

変性洗浄

変性洗浄は、候補抗原ポリペプチド中のエンドトキシンのレベルを、抗原特異性T細胞活性化度を決定する後の工程を妨害しないレベルまで下げるために行われる。

【0072】

エンドトキシンは、ポリペプチドと密に会合するため、その二次構造および三次構造を少なくとも一時的に破壊する定義による変性洗浄を行うことは、非常に有利であり、多くの場合に、エンドトキシンをポリペプチドから解離することが不可欠である。本用途において、非常に少量のエンドトキシンでさえ、妨害となる。

【0073】

抗原提示細胞は、取り込まれた後に、抗原ポリペプチドを小さなフラグメントに分解し、したがって、一時的な変性および不可逆的な変性(3D構造の破壊)の両方に耐えることができる。本発明によって開示される粒子との会合によって、そうしなければ不溶性になるか、または凝集し得る変性タンパク質の取り扱いが可能になる。

【0074】

実施例2および図1に示すように、変性洗浄の特定の様式は、本発明の文脈において重要ではない。例えば、変性洗浄は、会合しているポリペプチドを高pH、低pH、高温にするか、変性剤にさらすか、またはこれらの組合せを行うことを含んでもよい。好ましくは、変性洗浄は、会合しているポリペプチドを高pHにすること、または強い変性剤、例えば、8M尿素または6Mグアニジン-HClにさらすことを含む。最も好ましくは、変性洗浄は、会合しているポリペプチドを少なくとも13.0、より好ましくは少なくとも14.0、最も好ましくは少なくとも14.3の高pHに付すことを含む。変性は、会合しているポリペプチドに対し、1~5M、好ましくは1~3M、より好ましくは1.5~2.5M、最も好ましくは2Mの強アルカリ、例えばNaOHまたはKOH、好ましくはNaOHを用いた洗浄を行うことを含んでもよい。

【0075】

変性洗浄の特に有利な点は、粒子と、会合しているポリペプチドとを用いた調製物が滅菌されるように条件を選択可能であることである。調製物が生きた微生物で汚染されている場合、細胞培養におけるその後の工程は、損なわれる可能性がある。特に、高pH洗浄(例えば、 $pH > 14$)では、簡便に同時にかつ迅速に調製物を滅菌し、エンドトキシンを除去するのに有効な変性洗浄を達成することができる。

【0076】

好都合なことに、変性洗浄は、エンドトキシンを洗い流すことに加えて、エンドトキシ

10

20

30

40

50

ンを分解するか、または不活性化するような洗浄である。高 pH 洗浄（例えば、 $pH > 14$ ）は、エンドトキシンに対して不活性化する作用を有する。

【0077】

洗浄は、1回の洗浄であってもよく、または数回の繰り返しの洗浄、例えば2回、3回、4回または5回の洗浄を含んでいてもよい。

【0078】

変性洗浄は、本明細書に開示する抗原特異性T細胞活性化をアッセイするための方法に適合する候補抗原ポリペプチド中のエンドトキシンレベルを生じなければならず、その結果、エンドトキシンは、抗原特異性T細胞活性化が十分に検出されるために、高すぎる妨害を引き起こさない。残留エンドトキシンのレベルは、簡便には、本明細書で実施例2に記載される通り、単球活性化アッセイ（IL-1 / IL-6 FluoroSpot）を用いて試験されてもよい。エンドトキシンの許容レベルは、状況、特に抗原の濃度に依存する。しかし、抗原中のエンドトキシンの量は、T細胞活性化アッセイにおいて、エンドトキシンの最終的な濃度が100 pg/ml未満（すなわち、0~100 pg/ml）、好ましくは50 pg/ml未満、より好ましくは25 pg/ml未満、最も好ましくは10 pg/ml未満になるような量である。サンプル中のエンドトキシンを測定するための方法、例えばLALアッセイが知られている。

10

【0079】

抗原提示細胞（APC）およびT細胞サンプル

本発明の文脈において、APCは、専門的な抗原提示細胞、例えば、単球/マクロファージまたは樹状細胞である。APCは、初代細胞であってもよく、または不死化細胞であってもよい。

20

【0080】

APCは、T細胞サンプルのT細胞と適合していなければならず、その結果、T細胞が反応することができる抗原特異性の内容物（MHC制限されている）において、T細胞に対して抗原を提示することができる。APCおよびT細胞サンプルは、好ましくは、同じ種から得られ、MHC受容体に関して受容体が適合している。しかし、異なる種に由来する遺伝子操作されたAPCの使用も想定される。

【0081】

抗原提示細胞とT細胞サンプルが同じ個体に由来する場合、APCとT細胞との間のミスマッチの可能性は回避される。

30

【0082】

抗原提示細胞とT細胞サンプルは、同じ血液サンプルに由来してもよく、実用的な観点から有利である。抗原提示細胞とT細胞サンプルは、同じ個体由来のPBMCサンプルに由来していてもよい。末梢血サンプルからPBMCを得ることは、通常のプロトコルであり、同時に、同じ個体からAPCとT細胞の両方の便利な供給源を与える。

【0083】

PBMCサンプルは、新鮮なものを使用してもよく、または凍結させてもよい。凍結した細胞を使用することができる可能性は、物流の観点から大きな実用上の利点である。

【0084】

T細胞サンプルは、腫瘍、好ましくは、腫瘍中のリンパ管に由来してもよい。

40

【0085】

また、T細胞サンプルは、腹水に由来していてもよい。

【0086】

T細胞サンプルは、CD4+T細胞およびCD8+T細胞を両方とも含む全PBMC、精製されたT細胞の集合、または特定のT細胞の集合を欠いたPBMCを含んでいてもよい。

【0087】

T細胞活性化度の決定

本方法は、T細胞活性化度を、関連するリファレンスと比較する工程をさらに含んでい

50

てもよく、リファレンスと比較して、サンプルにおけるT細胞活性化度が高いことが、その候補抗原が、そのサンプルにおける抗原特異性T細胞活性化を引き起こすという結果の指標である。リファレンスは、「活性化」を定義するために重要であるため、活性化度は、好ましくは、リファレンスサンプルと比較して定義される。リファレンスサンプルは、例えば、患者サンプルを分析するときは正常な健康な個体に由来するサンプル、腫瘍または腫瘍を排出するリンパ節サンプルを分析するときは正常な組織由来のサンプル、治療後の効果をフォローアップするときには治療前のサンプルであってもよい。リファレンスサンプルを使用し、診断/予後判定のための閾値を設定し、抗原特異的な陽性(すなわち、活性化)または陰性(すなわち、下方制御)を決定する。

【0088】

T細胞サンプル中のT細胞活性化度を決定することは、サンプル中の活性化したT細胞の割合、すなわち、サンプル中の全T細胞に対する活性化したT細胞の数を決定することを伴っていてもよい。リファレンスサンプル中の活性化した細胞の割合に対する、活性化した細胞の割合は、特異的な抗原に対するT細胞活性化の大きさの指標を与えるだろう。好ましくは、各分析において、個々のサンプルにおける自然発生的な活性化レベル(「バックグラウンド活性化レベル」)は、抗原を含まずにインキュベートされたサンプル(すなわち、ネガティブコントロール)で決定される。バックグラウンド活性化は、分析中に相殺されてもよい。言い換えると、活性化の割合は、活性化の割合からネガティブコントロールの値を引き算した正味の値で計算されてもよい。

【0089】

実施例3に示すように、T細胞サンプル中のT細胞活性化度の決定は、ELISpot/Fluorospot技術または増殖アッセイ(すなわちチミジン取り込み)を用いて行われてもよい。しかし、その目的に適した他のアッセイおよび技術も公知であり、これを使用してもよい。T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定することは、例えば、ELISpot/Fluorospotアッセイによって、インターフェロンガンマ(IFN- γ)、インターロイキン17(IL-17)、インターロイキン22(IL-22)、またはこれらの組合せの分泌によって反応する抗原提示細胞と接触したT細胞の割合を決定することを含んでいてもよい。特定の疾患または状態を分析するために、他の関連する検体(サイトカインの組合せ)を使用することができる。例えば、アレルギー患者を分析する場合、Th1/Th17サイトカインではなくTh2サイトカインを分析してもよい。T-regサイトカインは、癌、アレルギーおよびワクチン処置後に関心事となり得る。したがって、Fluorospot技術は、様々な条件下で様々な候補抗原ペプチドに対する関連する活性化プロファイルの分析を可能にする。これにより、例えば患者間の異質性、疾患の重篤度および進行に関する情報が加わる。

【0090】

実施例3に見られるように、IL-17および/またはIL-22分泌の決定は、MS患者を健康なコントロールと区別するために、IFN- γ よりも驚くほど良好である。したがって、T細胞サンプルにおけるT細胞活性化度を決定することは、好ましくは、IL-17および/またはIL-22の分泌によって反応する抗原提示細胞と接触したT細胞の割合を決定することを含み、この方法は、多発性硬化症を診断するためのものであるか、または多発性硬化症の経過をフォローアップするためのものである。言い換えると、MSを有するか、またはMSを有することが疑われる被験体に由来するT細胞サンプルは、好ましくは、候補抗原に応答するIL-17および/またはIL-22分泌について分析される。

【0091】

多重分析

実施例4に示すように、いくつかの候補抗原を同じT細胞サンプルに対してアッセイしてもよい。好ましくは、少なくとも10の候補抗原を同じT細胞サンプルに対してアッセイする。本発明の方法を用いると、追加のサンプルが必ずしも実験室の作業を大幅に増加させるとは限らない。本発明の方法の強みは、多くの労力を要することなく多数の抗原を

10

20

30

40

50

スクリーニングすることが容易なことである。このことの利点は、例えば、可能性がある自己抗原の大きなスクリーニングを行うことができ、真の自己抗原を発見する機会が増えることである。

【0092】

自己反応性の診断

本方法の第1の態様は、試験被験体において自己反応性を診断するための方法であって、

a. 候補ペプチド自己抗原が密に会合した、貪食可能な粒子を与え、会合したポリペプチドを含む粒子に対して変性洗浄を行い、エンドトキシンのレベルを、後の工程を妨害しないほど十分に低くする工程と；

b. 試験被験体から、可変T細胞と可変抗原提示細胞とを含む末梢血単核細胞（PBMC）サンプルを与える工程と；

c. 抗原提示細胞によって粒子の貪食作用が可能になり、抗原提示細胞によって提示される抗原に反応して特異的なT細胞活性化が可能になる条件で、PBMCサンプルと、粒子とを *in vitro* で接触させる工程と；

d. 接触したPBMC細胞において、活性化したT細胞の割合を定量する工程と；

e. 定量された割合と、健康な被験体に由来する相当する定量された割合とを比較することによって、試験被験体において活性化したT細胞の割合が大きいことは、この試験被験体において候補自己抗原に対する自己反応性の指標となる工程と

を含む、方法であってよい。

【0093】

実施例4に示すように、本発明は、多種多様な自己抗原を同時に、迅速にスクリーニングする強力なツールを提供し、これはMSに限定されない。スクリーニング可能なタンパク質の候補ライブラリーは、疾患および患者に応じて、容易に設計することができる。

【0094】

抗原特異性T細胞が、疾患の特徴であり、抗原ライブラリーが、問題となっている疾患に適合する限り、自己免疫状態に加え、他の炎症性疾患に、この方法を使用することができる。

【0095】

「含む (comprising)」という用語は、「含む (including)」と同じであると解釈すべきであるが、これに限定されない。全ての参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本開示を、見出しおよび副見出しを有する章に配置しているのは、単に見やすさを改善するためのものであり、いかなる様式にも限定するものと解釈すべきではなく、その分割は、異なる見出しおよび副見出しでの特徴を互いに組み合わせることを除外せず、または限定しない。

【実施例】

【0096】

[実施例1]

ビーズへのポリペプチド接続

遊離カルボン酸基を含むビーズに共有結合したポリペプチド。この実施例では、Dyna beads (登録商標) MyOne (商標) Carboxylic Acid (ThermoFisher Scientific) を使用した (直径が1 μ mの球)。ピシニコニン酸、BCA、タンパク質アッセイを用いて、首尾良い接続を確保するために、接続の前後でタンパク質濃度を測定した。数種類のポリペプチドを試験し、1mgのビーズあたり平均で48.7 μ g (平均: 48.7、SD: 20.5、N=10) が接続した。製造者の指示に従うと、ビーズ1mgあたり50 μ gのポリペプチドを接続させることができ、この実施例で行われた接続の効率が高かったことを示している。

【0097】

[実施例2]

変性洗浄によるエンドトキシンの除去

異なる種類の変性洗浄を用いたエンドトキシン除去を試験するために、4種類の様々な変性洗浄条件を使用した。(a)高pH(2M NaOH pH14.3)、(b)加熱(95℃)および変性剤((c)8M尿素、(d)6M塩酸グアニジン)。単球の活性は、エンドトキシンによって強く増加し、したがって、単球の活性化を残留LPSをモニタリングするために使用することができるため、単球活性化アッセイ(IL-1/IL-6 FluoroSpot)を用い、残留するエンドトキシンのレベルを試験した。

【0098】

試験した全ての種類の変性洗浄は、未洗浄のビーズと比較して、単球活性化の量を有意に下げないように管理した(図1を参照)(全ての洗浄について $P < 0.0001$)。変性洗浄は、非常に効果的であり、洗浄されたビーズは、ネガティブコントロールに匹敵する程度まで細胞を刺激した。2MのNaOHを用いて洗浄すると、最も少ない量のエンドトキシンが得られ、これに続き、8Mの尿素が近かった。

10

【0099】

[実施例3]

T細胞活性化アッセイ

FluoroSpot

16人の多発性硬化症患者および9人の健康なコントロールに由来するサンプルを用い、FluoroSpotアッセイを行った。患者およびコントロールに由来するPBMCを、FluoroSpotプレート中、疑わしい自己抗原と共にインキュベートした。図3に見られるように、MS患者の何人かは、有意に多い数の活性化された細胞を示した(パネルa)。MS患者は、平均数が37.4(95%CIで13.0~52.9)のIL-22を分泌する活性化された細胞を有し、一方、健康なコントロールは、平均数が3.3(95%CIで0.97~5.6)の活性化された細胞を有していた。差のP値=0.0062。IL-17を分泌する活性化された細胞について、0.28(CI95%が-1.4~2.0)に対し、患者における数は14.7(CI95%で5.3~24.1)であり、差のP値は < 0.0007 である(パネルb)。しかし、IFN γ を分泌する細胞について、その差は、統計的に有意ではなく、コントロールでは33(CI95%で7.1~59.0)であるのに対し、患者では平均数が80.0(CI95%で22.3~138)であり、 $P = 0.495$ である(パネルc)。有意性は、Mann-Whitney-U検定を用いて計算した。

20

30

【0100】

これらの結果は、FluoroSpotアッセイを用い、ビーズに接続した抗原を用いたT細胞の活性化を測定することができ、患者と健康なコントロールの比較を行うことができることを示す。驚くべきことに、T細胞活性化の古典的マーカーであるIFN γ は、患者とコントロールの比較において、最も弱い差を示した。しかし、IL-17およびIL-22は、両方とも患者とコントロールの比較において、強い有意な差を示し、このことは、MSにおいて自己抗原を探すときに分析するために、これらがさらに適したサイトカインであり得ることを示している。

【0101】

増殖アッセイ

チミジン取り込みを用いた増殖アッセイ。オボアルブミン(OVA)免疫化マウスに由来する脾細胞を、OVAまたはBSAが接続したビーズと共にインキュベートし、抗原特異性増殖を測定した。ビーズと共にインキュベートした細胞の増殖は、刺激指数(SI)として表された。(図2に見られるように、OVA-ビーズと共にインキュベートした細胞は、増殖が増加し、SIは2.69であった(95%CIで1.6~3.78、 $P < 0.005$)。BSAと共にインキュベートした細胞は、増殖が増加せず、SIは0.9であった(95%CIで0.7~1.1、 $P = 0.37$)。

40

【0102】

これらの結果は、ビーズに接続した抗原を用いた免疫細胞(この実施例では脾細胞)の活性化を、増殖アッセイによって測定可能であることを示す。また、OVAが接続したビ

50

ーズは増殖を刺激したが、BSAが接続したビーズは増殖を全く誘発することができなかつたため、観察された増殖は、抗原特異性であることも示している。この実験は、抗原特異性T細胞増殖の*in vitro*刺激のために、ビーズに接続した抗原を使用可能であることを示している。チミジン取り込みは、増殖を測定するための1つの方法にすぎず、したがって、増殖を測定するための他の方法、例えば、CFSA希釈およびBrdU取り込みアッセイも適用可能である。

【0103】

[実施例4]

125種類のタンパク質のライブラリーに対するMSの自己抗原スクリーニング

多発性硬化症における自己抗原の同定：T細胞活性化のアッセイとして、IFN γ /IL-22/IL-17A FluoroSpotを用いる、ビーズに接続した多数のPRESTに対するT細胞活性化の測定。このようなスクリーニングは、MS患者由来のPBMCにおいて、健康なコントロールと比較して高いT細胞応答を刺激する抗原を検出することによって、可能性のある自己抗原を同定し、どの抗原をさらに分析するかを決定するのに役立つ。

10

【0104】

図4に見られるように、16人の患者と9人の健康なコントロールのスクリーニングにおいて、二元配置ANOVAを用いて分析したとき、患者の活性化された細胞の平均数と、コントロールの活性化された細胞の平均数との統計的に有意な差を見ることができた。IL-22を分泌する活性化されたT細胞の場合、抗原6番($P < 0.0001$)、抗原18番($P < 0.0001$)、抗原23番($P < 0.0001$)、抗原29番($P < 0.0001$)および抗原33番($P < 0.05$)の5種類の抗原について、差が見られた(パネルa)。IL-17を分泌する活性化されたT細胞の場合、抗原6番($P < 0.05$)、抗原18番($P < 0.0001$)、抗原23番($P < 0.01$)、抗原29番($P < 0.0001$)および抗原33番($P < 0.05$)の5種類の抗原について、患者とコントロールとで差が見られた(パネルb)。IFN γ については、抗原18番($p < 0.0001$)のみ差が見られた(パネルc)。

20

【0105】

これらの結果は、自己抗原スクリーニングとして、MSにおいて可能な新しい自己抗原を同定するツールとして、本発明の方法を使用可能であることを示す。

30

【0106】

[実施例5]

貪食可能なビーズの適切なビーズの大きさの特定

チミジン取り込みを用いた増殖アッセイを使用し、抗原特異性T細胞活性化に対するビーズの大きさの影響を試験した。オボアルブミン(OVA)免疫化マウスに由来する脾細胞を、異なる大きさのOVAが接続したビーズを用いて刺激し、抗原特異性増殖を測定した。図5に見られるように、直径が $0.2\mu\text{m}$ のOVA-ビーズと共にインキュベートした細胞は、増殖が増加し、平均SIは4.1であった(95%CIで2.4~5.8、 $P = 0.007$)。直径が $1\mu\text{m}$ のOVA-ビーズと共にインキュベートした細胞は、増殖が増加し、平均SIは8.4であった(95%CIで6.1~10.6、 $P < 0.005$)。直径が $5.6\mu\text{m}$ のOVA-ビーズと共にインキュベートした細胞は、増殖を増加させることができず、平均SIは1.1であった(95%CIで0.4~2.7、 $P = 0.876$)。

40

【0107】

これらの結果は、異なる大きさのビーズに接続した抗原が、細胞増殖を刺激し得ることを示す。直径が約 $1\mu\text{m}$ のビーズは、細胞刺激という観点で最も効果的なようであるが、大きさが $0.2\mu\text{m}$ より小さいビーズも機能する。直径が $1\mu\text{m}$ より大きいビーズも機能するが、直径が $5.6\mu\text{m}$ に近づくにつれて、ビーズは、細胞を全く刺激することができなくなることを予想することは合理的である。この大きさは、細菌の大きさに似ているので、 $1\mu\text{m}$ が最適な大きさであることを推定することは合理的である。我々の免疫系は、

50

この大きさの微生物 / 粒子を貪食し、反応するように進化してきた。正常な抗原提示細胞は、10 ~ 15 μm の範囲の大きさを有する。

材料および方法

【0108】

[実施例1]

遊離カルボン酸基を含む常磁性ビーズへのタンパク質の共有結合。

この実施例では、直径が1 μm のDynabeads (登録商標) MyOne (商標) Carboxylic Acid (ThermoFischer Scientific) を使用し、製造業者のプロトコルに従ってカップリング手順を実施した (NHS (N-ヒドロキシコハク酸イミド) およびEDC (エチルカルボジイミド) を用いた2工程の手順))。 10

【0109】

MESバッファ (25 mM MES (2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸、pH 6) を用い、ビーズを2回洗浄した。次いで、MESバッファ中50 mg/mlのNHS (N - ヒドロキシコハク酸イミド) および50 mg/mlのEDC (N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N' - エチルカルボジイミド) をビーズに加え、室温で30分間インキュベートすることによって、カルボン酸基を活性化させた。磁石を用いてビーズを回収し、上清を除去し、ビーズをMESバッファで2回洗浄した。タンパク質をMESバッファで濃度が1 mg/ml、合計100 μg になるまで希釈し、これをビーズに加え、室温で1時間インキュベートした。磁石を用いてビーズを回収し、上清を除去し、タンパク質濃度測定のために保存した。未反応の活性化カルボン酸基を50 mM Tris (pH 7.4) を用い、15分間クエンチした。次いでビーズをPBS (pH 7.4) で洗浄し、その後、-80 で保存した。 20

【0110】

ビーズに接続したタンパク質の量を測定するために、BCAタンパク質アッセイキット (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFischer Scientific) を用い、接続前のタンパク質および接続後の上清中のタンパク質濃度を測定した。BCAアッセイは、製造業者のプロトコルに従って用いた。

【0111】

[実施例2]

変性洗浄によるエンドトキシンの除去。

ビーズを、E. coliで産生された組換えタンパク質と接続させた。タンパク質が接続したビーズを、いくつかの異なる変性条件で洗浄し、エンドトキシンの除去を確実にした。残留するエンドトキシンは、単球反応性アッセイ (IL1B / IL6 FluoroSpot - assay, MABTECH, Sweden) を用いて測定した。

【0112】

エンドトキシン除去のために、ビーズを2 M NaOH pH 14.3、8 M 尿素または6 M グアニジン (グアニジン - HCl) の3種類の異なる洗浄バッファ (全てRTで滅菌水) の1つで洗浄したか、またはPBS中、95 でインキュベートした。ビーズを緩衝液に懸濁させ、4分間振とうし、磁石で回収し、上清を除去した。これを3回繰り返した。熱処理したビーズをPBS pH 7.4に入れ、95 で5分間、加熱ブロックに入れ、磁石で回収し、上清を除去した。これを3回繰り返した。次いでビーズを滅菌PBSで3回洗浄し、残りの洗浄緩衝液を除去した。 40

【0113】

エンドトキシンレベルを測定するために、単球反応性アッセイを使用した (IL - 1 / IL - 6 FluoroSpotアッセイ、MABTECH、スウェーデン)。Ficoll - Paque (GE Healthcare、ウプサラ、スウェーデン) の勾配遠心分離によって、末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。細胞をcRPMI (10% ウシ胎児血清、1% L - グルタミンおよび1% ペニシリン - ストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地) に懸濁した。3,000,000個のビーズを、FluoroSpot 50

tプレート中の各ウェルに、それぞれの種類のビーズおよび洗浄液についてウェル4個ずつに、添加した。未洗浄のビーズ、LPSおよび培地をコントロールとして使用した。ウェルあたり200 μ lのcRPMI細胞（各細胞濃度およびそれぞれの種類のビーズを2ウェル）中、10,000個および5,000個細胞の濃度でFluoroSpotプレートに細胞を添加した。プレートを37 $^{\circ}$ Cおよび5%CO₂の加湿環境下で18時間インキュベートした。次いで、プレートを製造元のプロトコルに従って発色させ、FluoroSpotリーダーで読み取った。

【0114】

[実施例3]

FluoroSpot

10

MS中の患者対コントロールのT細胞活性化対懸濁した自己抗原を分析するためのFluoroSpotアッセイを、IFN γ /IL17/IL22 FluoroSpot (MABTECH)を用いて行った。このプロトコルは、実際には実施例4に記載した通りであったが、125種類のタンパク質の全ライブラリーの代わりに1個の抗原に対する反応だけを分析した。

【0115】

増殖アッセイ

オボアルブミン感作マウス由来の脾細胞を用いたチミジン取り込みによる増殖アッセイ。刺激として、ビーズ(Dynabeads(登録商標)MyOne(商標)Carboxylic Acid)に接続したオボアルブミン(SigmaAldrich)およびBSA(SigmaAldrich)を使用した。

20

【0116】

水酸化アルミニウムに吸着させた100 μ gのオボアルブミン(Sigma)を毎月注射することによって、マウスに免疫を与えた。最初の注射から3ヶ月後、マウスを殺し、脾臓を採取した。脾細胞は、Thunbergら、2009、Allergy 64:919に記載される通り、標準的な手順によって調製した。

【0117】

細胞を、cRPMI中、オボアルブミンが接続したビーズまたはBSAが接続したビーズ（細胞あたり10個のビーズ）と共に5日間インキュベートした。全ての細胞を、6%CO₂の加湿雰囲気下、37 $^{\circ}$ Cで6日間インキュベートした。インキュベートの最後の18時間に、1 μ Ci/ウェル[³H]のチミジンを細胞培養物に加えた。刺激を受けた3個組から得た、1分あたりの平均計測数(cpm)を、刺激を受けていない細胞から得た平均cpm値で割り算し、刺激指数(SI)として表した。SI値2.0は、一般に陽性とみなされる。

30

【0118】

[実施例4]

タンパク質に接続したビーズ(Dynabeads(登録商標)MyOne(商標)Carboxylic Acid(ThermoFischer Scientific))を刺激として用い、T細胞活性化を測定するためのアッセイとして刺激FluoroSpot(IFN γ /IL17/IL22 FluoroSpot、MABTECH)を用いた、多発性硬化症の125種類のタンパク質のライブラリーに対する自己抗原スクリーニング。

40

【0119】

全18人の多発性硬化症患者と、9人の健康なコントロールに由来する末梢血単核細胞(PBMC)を使用した。125種類の異なるタンパク質は、Human Atlas Projectからの多種多様なヒトに特異的なPRESTからなっていた。PRESTを製造業者のプロトコルに従って、ビーズに接続させた(実施例1に記載した通り)。

【0120】

PBMCを静脈血サンプル(BD Vacutainer EDTA管に採取した)から、標準的なプロトコルに従ったFicoll-Paque(GE Healthcare)

50

e、ウブサラ、スウェーデン)によって単離した。細胞を凍結培地(45% FCS、45% RPMI、10% DMSO)中で凍結させ、-150 で保存した。

【0121】

FluoroSpotの96ウェルフォーマットに合うように、125種類の異なるPRESTを45種類の異なるプールに入れて保存し、その後、2M NaOHで洗浄し、エンドキシンを除去した(実施例2に記載した通り)。3,000,000個のビーズをFluoroSpotプレートの各ウェルに添加し、それぞれ異なるプールを2個組で行った。抗CD3をポジティブコントロールとして使用し、培地のみ、裸のビーズを含む培地をネガティブコントロールとして使用した。

【0122】

PBMCを37 の水中で解凍し、cRPMI(RPMI 1640、10% FCS、1% L-glutおよび1% ペニシリン-ストレプトアビジン)で洗浄した。200 μ lのcRPMI中の250,000個の細胞を各ウェルに添加し、次いでプレートを37、5%CO₂の加湿環境下で44時間インキュベートした。インキュベート後、プレートを製造元(Mabtech)のプロトコルに従って発色させ、FluoroSpotリーダーで読み取った。

【0123】

[実施例5]

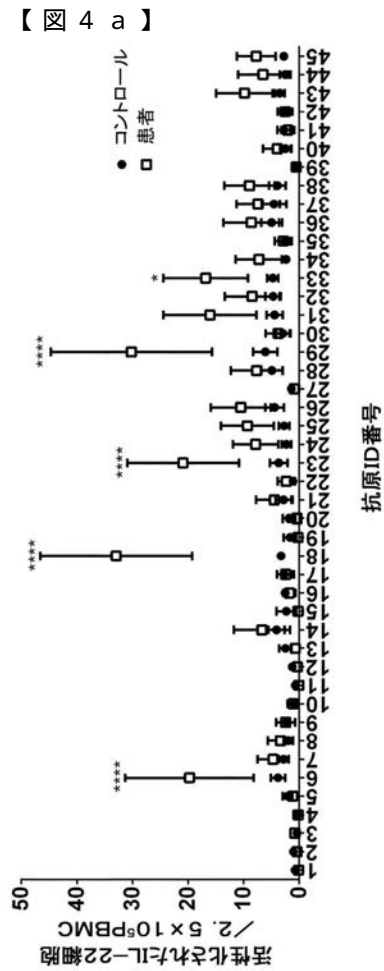
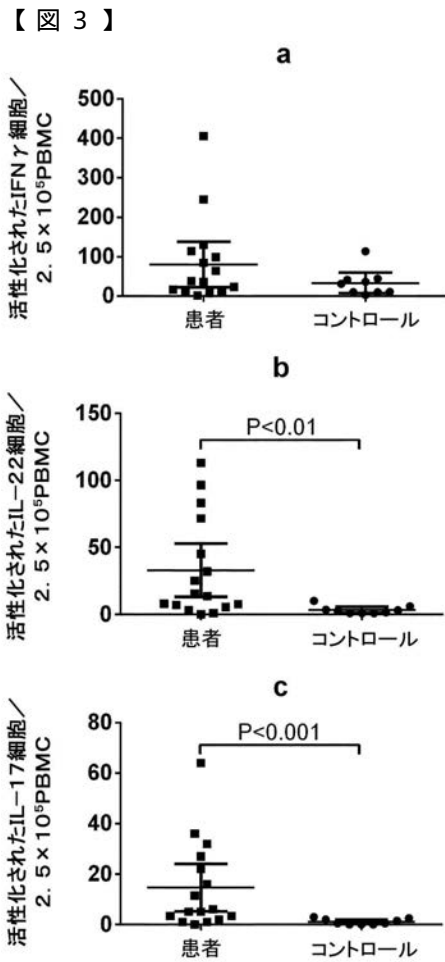
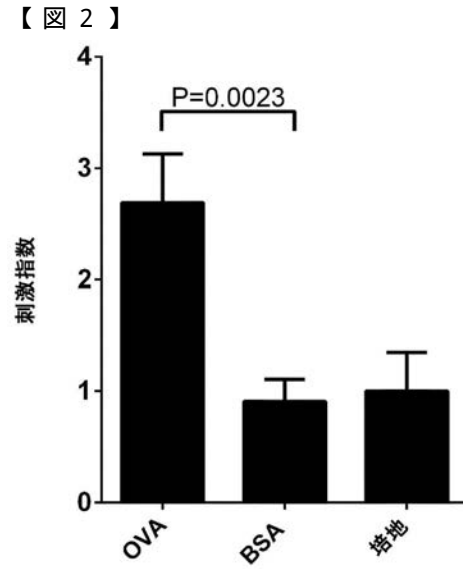
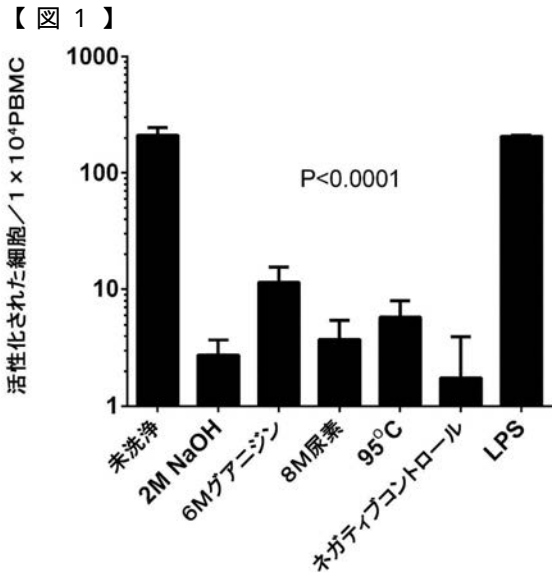
オボアルブミン感作マウス由来の脾細胞およびオボアルブミンに接続したビーズを用い、異なる大きさのビーズの有効性を評価した。表面にカルボン酸を含み、直径が5.6 μ m、1 μ m、0.2 μ mの常磁性ビーズを、実施例1のプロトコルに従って、オボアルブミンまたはウシ血清アルブミンと接続した。

【0124】

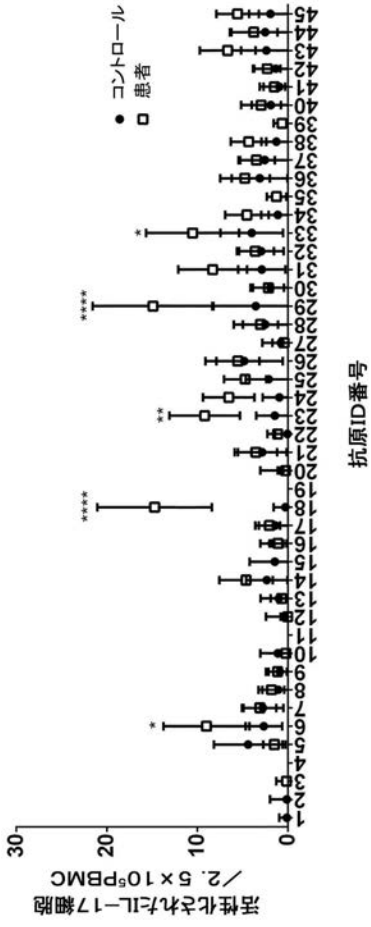
抗原特異性T細胞活性化を刺激するためのビーズの有効性を試験するために、増殖アッセイ(³Hチミジン取り込み)を使用した。ビーズの濃度は、細胞濃度に対し、5.6 μ mのビーズでは1:1、1 μ mのビーズでは10:1、0.2 μ mのビーズでは500:1であった。細胞と共にインキュベートしている間の全タンパク質濃度は、それぞれ5.6 μ m、1 μ m、0.2 μ mの場合に125ng/ml、160ng/ml、160ng/mlであった。増殖アッセイを実施例3と同じ様式で行った。

10

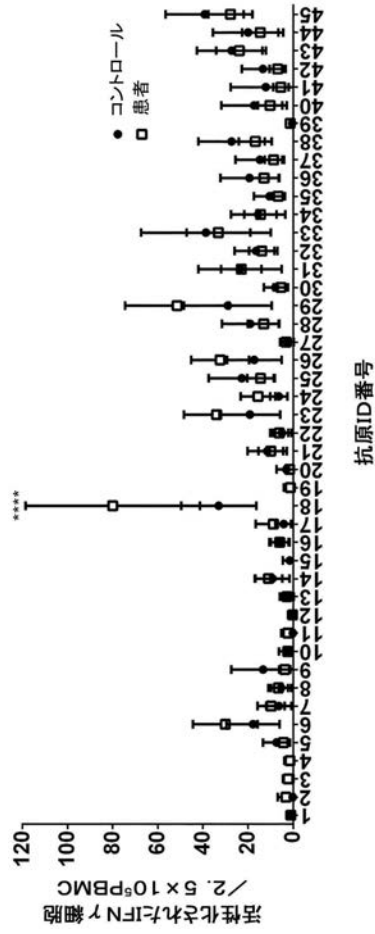
20



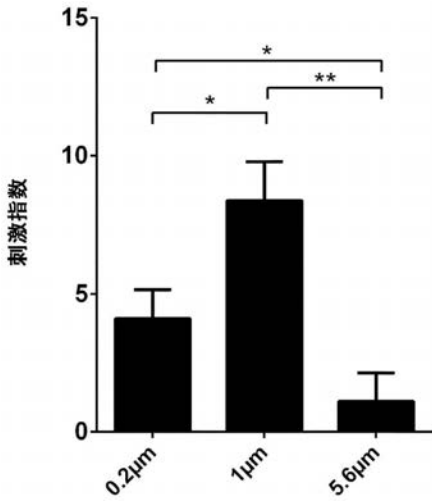
【 図 4 b 】



【 図 4 c 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference NP0220WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2016/081141	International filing date (<i>day/month/year</i>) 15 December 2016 (15-12-2016)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 16 December 2015 (16-12-2015)
Applicant TGER AB		
<p>This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.</p> <p>This international search report consists of a total of <u>5</u> sheets.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.</p>		
<p>1. Basis of the report</p> <p>a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> the international application in the language in which it was filed</p> <p><input type="checkbox"/> a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))</p> <p>b. <input type="checkbox"/> This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6<i>bis</i>(a)).</p> <p>c. <input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Unity of invention is lacking (see Box No III)</p> <p>4. With regard to the title,</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> the text is approved as submitted by the applicant</p> <p><input type="checkbox"/> the text has been established by this Authority to read as follows:</p> <p>5. With regard to the abstract,</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> the text is approved as submitted by the applicant</p> <p><input type="checkbox"/> the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority</p> <p>6. With regard to the drawings,</p> <p>a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. <u>1</u></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> as suggested by the applicant</p> <p><input type="checkbox"/> as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure</p> <p><input type="checkbox"/> as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention</p> <p>b. <input type="checkbox"/> none of the figures is to be published with the abstract</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/081141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/53 G01N33/564 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, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Recombinant allergens for diagnosis and treatment" In: Hans Grönlund: "Diagnosis and treatment of IgE-mediated allergy: New approaches using recombinant allergens.", 6 May 2005 (2005-05-06), Intellecta Docucys, Nacka, Sweden, XP055258062, ISBN: 91-7140-373-6 see abstract 3rd paragraph, page 14 "adjuvant preparation"; page 26 - page 29; figure 5 ----- -/--	1-34
<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
7 February 2017		17/02/2017
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
		Gonçalves Mauger, M

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/081141

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. THUNBERG ET AL: "Prolonged antigen-exposure with carbohydrate particle based vaccination prevents allergic immune responses in sensitized mice", ALLERGY, vol. 64, no. 6, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 919-926, XP055258276, United Kingdom ISSN: 0105-4538, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01905.x page 919 - page 921; figures -----	1-34
A	US 6 218 132 B1 (SPACK EDWARD G [US] ET AL) 17 April 2001 (2001-04-17) claims; figures -----	1-34
A	WO 2005/010026 A2 (BECKMAN COULTER INC [US]; CHANG JENNIE CHYAN CHUU [US]; KASEY SUHA [US]) 3 February 2005 (2005-02-03) abstract; claims; figures -----	1-34
X	HANS GRÖNLUND ET AL: "Carbohydrate-based particles: a new adjuvant for allergen-specific immunotherapy", IMMUNOLOGY, vol. 107, no. 4, 9 December 2002 (2002-12-09), pages 523-529, XP055258332, DOI: DOI: 10.1046/j.1365-2567.2002.01535. page 523 - page 525; figures -----	1-34
X	THERESA N ANDERSSON ET AL: "A novel adjuvant-allergen complex, CBP-rFel d 1, induces up-regulation of CD86 expression and enhances cytokine release by human dendritic cells in vitro", IMMUNOLOGY, vol. 113, no. 2, 23 August 2004 (2004-08-23), pages 253-259, XP055258364, DOI: 10.1046/j.1365-2567.2004.01943.x page 253 - page 256; figures -----	1-34
X	T. NEIMERT-ANDERSSON ET AL: "Carbohydrate-based particles reduce allergic inflammation in a mouse model for cat allergy", ALLERGY, vol. 63, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 518-526, XP055258374, United Kingdom ISSN: 0105-4538, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01644.x page 519 - page 521; figures -----	1-34
	----- -/--	

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/081141

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 356 826 A1 (BIOMAY PROD & HANDEL [AT]) 29 October 2003 (2003-10-29) paragraph [0009] - paragraph [0011]; claims; examples -----	1-34

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/081141

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 6218132	B1	17-04-2001	AU 718527 B2	13-04-2000
			CA 2256693 A1	04-12-1997
			EP 0912895 A1	06-05-1999
			JP 2000512008 A	12-09-2000
			US 5750356 A	12-05-1998
			US 6218132 B1	17-04-2001
			WO 9745735 A1	04-12-1997

WO 2005010026	A2	03-02-2005	AT 488767 T	15-12-2010
			EP 1648919 A2	26-04-2006
			WO 2005010026 A2	03-02-2005

EP 1356826	A1	29-10-2003	AT 419874 T	15-01-2009
			AU 2003224104 A1	03-11-2003
			CA 2482973 A1	30-10-2003
			CN 1646173 A	27-07-2005
			EP 1356826 A1	29-10-2003
			EP 1496942 A1	19-01-2005
			ES 2318124 T3	01-05-2009
			JP 4814490 B2	16-11-2011
			JP 2005529880 A	06-10-2005
			RU 2329830 C2	27-07-2008
			US 2005095298 A1	05-05-2005
			WO 03089009 A1	30-10-2003

フロントページの続き

(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

专利名称(译)	T细胞反应平台		
公开(公告)号	JP2019500604A	公开(公告)日	2019-01-10
申请号	JP2018531398	申请日	2016-12-15
[标]发明人	グレンルドハンス		
发明人	グレンルド、ハンス		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/564		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/53.K C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX02		
优先权	2015200619 2015-12-16 EP 1650493 2016-04-12 SE		
其他公开文献	JP2019500604A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于体外测定抗原特异性T细胞活化的方法，包括：(a) 向候选抗原多肽的颗粒提供紧密相关的，可吞噬的候选抗原多肽颗粒。变性洗涤以将内毒素水平降低至足够低以不干扰后续步骤；(b) 提供可变的抗原呈递细胞；(c) 允许抗原呈递细胞吞噬颗粒。在一定条件下使洗涤后的颗粒与抗原呈递细胞接触；(d) 提供待分析的含有可变T细胞的T细胞样品；(e) 由抗原呈递细胞呈递使T细胞样品与已与颗粒接触的抗原呈递细胞接触的步骤，该条件在允许特定T细胞响应抗原而活化的条件下进行；(f) T细胞样品中的T细胞活化度 并确定步骤。

