

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5161798号
(P5161798)

(45) 発行日 平成25年3月13日 (2013. 3. 13)

(24) 登録日 平成24年12月21日 (2012. 12. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/02 Z N A

G O 1 N 33/50 (2006. 01)

G O 1 N 33/50 Z

G O 1 N 33/15 (2006. 01)

G O 1 N 33/15 Z

請求項の数 30 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2008-556852 (P2008-556852)
 (86) (22) 出願日 平成19年3月2日 (2007. 3. 2)
 (65) 公表番号 特表2009-528044 (P2009-528044A)
 (43) 公表日 平成21年8月6日 (2009. 8. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2007/000736
 (87) 国際公開番号 W02007/099341
 (87) 国際公開日 平成19年9月7日 (2007. 9. 7)
 審査請求日 平成22年2月3日 (2010. 2. 3)
 (31) 優先権主張番号 0604170.1
 (32) 優先日 平成18年3月2日 (2006. 3. 2)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0619374.2
 (32) 優先日 平成18年9月29日 (2006. 9. 29)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 507165486
 アンチトープ リミテッド
 イギリス ケンブリッジ, バブラハム, バ
 ブラハム インスティトゥート
 (74) 代理人 100096024
 弁理士 柏原 三枝子
 (74) 代理人 100125520
 弁理士 高橋 剛一
 (74) 代理人 100155310
 弁理士 柴田 雅仁
 (72) 発明者 ベーカー, マシュー
 イギリス ケンブリッジ シービー2 4
 エイティー, バブラハム, バブラハム イ
 ンスティトゥート, アンチトープ リミテ
 ッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

テスト物質に対するヘルパー T 細胞応答を測定する方法であって、
 (a) 組織から得たサンプルから抗原提示細胞 (A P C) および T 細胞を単離するステッ
 プと、
 (b) これらの単離した細胞から制御性 T 細胞を除去するステップと、
 (c) 前記 A P C およびステップ (b) で得られた制御性 T 細胞を除去した細胞をテスト
 物質とともに培養するステップと、
 (d) 前記テスト物質に対する T 細胞応答をアッセイするステップと、
 を具えることを特徴とする方法。

【請求項 2】

(a i) 他の細胞から抗原提示細胞 (A P C) を分離するステップをさらに具え、ステッ
 プ (c) は、制御性 T 細胞を除去した細胞を加える前に、分離した A P C と前記テスト物
 質を培養することを具えることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

A P C をテスト物質を付加する前にサイトカインで処理することを特徴とする請求項 2
 に記載の方法。

【請求項 4】

A P C および T 細胞が、末梢血液単核球細胞 (P B M C) 由来であることを特徴とする
 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

A P C および T 細胞がヒト由来であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記制御性 T 細胞が、C D 2 5 h i ⁺ T 細胞を除去することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 T 細胞が、C D 8 ⁺ T 細胞を除去することを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 T 細胞応答が、1 又はそれ以上の T 細胞増殖、サイトカイン放出、T 細胞転写変化、および / または T 細胞活性に関連する他のマーカーを測定することによってアッセイすることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

T 細胞応答が、トリチウム化チミジンの取り込みによって測定されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

サイトカイン放出が、I L - 2 および / または I F N γ によって測定されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

培養中に T 細胞応答を 1 又はそれ以上のタイムポイントでアッセイすることを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

A P C を前記 T 細胞を除去した細胞を加える前に、ある時間長以上でテスト物質を培養することを特徴とする請求項 2 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記テスト物質をある濃度以上でアッセイすることを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

最適化物質をアッセイして、テスト物質アッセイとしての最適時間および / または濃度を決定することを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記テスト物質はタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記テスト物質はペプチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記テスト物質は非タンパク質であることを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記テスト物質が、有機分子、脂質、炭化水素、あるいは、複合体、混合物および製剤を含む 2 又はそれ以上の部分からなる分子であることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記テスト物質は、T 細胞および / または A P C に対する免疫調節性または毒性があることを特徴とする請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

世界人口または研究対象において 80 % 以上の H L A アロタイプを発現するドナーの P B M C を使用することを特徴とする請求項 4 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

研究中の病気と関連した特定の H L A アロタイプを発現させるためにドナーの P B M C を使用することを特徴とする請求項 4 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

タンパク質配列中の T 細胞エピトープを同定するために、前記タンパク質配列の重複するペプチドを試験することを特徴とする請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

各々の一連の分子を相対的免疫原性を評価するために試験することを特徴とする請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

さらなる開発のためにリード医薬品を選択する基準として相対的 T 細胞応答を使用することを特徴とする請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

テスト物質を潜在的免疫原性を評価するために分析することを特徴とする請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

テスト物質の様々な製剤を分析して、相対的免疫原性を評価することを特徴とする請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

テスト物質の様々な製造バッチを分析して、潜在的免疫原性を評価することを特徴とする請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

T 細胞源として患者の血液を用いてテスト物質を分析して、前記テスト物質の免疫原性を評価することを特徴とする請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

タンパク質配列における T 細胞エピトープを同定することを特徴とする請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項 3 0】

テスト物質の免疫原性を評価することを特徴とする請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規な T 細胞アッセイ方法に関し、特に、テスト抗原に対する T 細胞応答は、制御性 T 細胞の除去によって増大することに関する。さらに、本発明は、抗原または他のサンプルとともに培養するタイミング（時間）を、T 細胞応答の検出を最適化するために変化させる。特に、本発明は、T 細胞増殖またはサイトカイン放出の複数の測定タイムポイントを用いて、T 細胞エピトープの最適な検出がなされる。さらに、本発明は、T 細胞アッセイに関し、抗原提示細胞（A P C）または T 細胞、もしくは A P C および T 細胞の両方と抗原とともに培養するタイミングを変化させ、T 細胞エピトープの検出を最適にすることができる。本発明は、特に、A P C、T 細胞、または A P C と T 細胞の両方に直接影響を与える免疫調節性サンプルまたは毒性サンプルを有する T 細胞アッセイに関する。本発明は、薬剤、アレルゲン、刺激源またはヒトに関わる他の物質に対するヒト T 細胞応答の測定に関する特別な用途である。

【背景技術】

【0 0 0 2】

T 細胞アッセイは、特にヒトにおいて、抗原および他のサンプルに対する T 細胞応答を測定するための有効な方法を提供する。このようなアッセイは、「エキソビボ（e x v i v o）」アッセイとしてみなされ、ここでは、血液サンプルをドナーから採って処置して、血液細胞の初期培養を T 細胞アッセイに直接使用する。ペプチドおよびタンパク質サ

10

20

30

40

50

ンプルに関して、*ex vivo* ヒト T 細胞アッセイは、ヒトのサンプルの潜在的な免疫原性を評価することを含むいくつかの目的に関して、ヒト T 細胞エピトープを検出するために使用されてきた (Jones et al., J. Interferon Cytokine Res., vol 204 (2004) p 560 - 572)。これにより、タンパク質配列内の T 細胞エピトープをワクチン内に封入し、また、タンパク質配列内の T 細胞エピトープを免疫原性を回避するために除去した (Jones et al., J. Interferon Cytokine Res., vol 24 (2004) p 560 - 572、および、Jones et al., J. Thromb. Haemost., vol 3 (2005) p 1 - 10)。従来の T 細胞アッセイ法は、T 細胞応答を測定する前に、ペプチドまたはタンパク質サンプルを APC と T 細胞の混合物と一緒に培養すること、または APC とともにペプチドまたはタンパク質サンプルを培養し、次に、T 細胞応答を測定する前に T 細胞を加えることを含む。両方のアッセイにおいて、複数の血液サンプルは、各々のペプチドまたはタンパク質サンプルの同時試験用に、それぞれ使用され、次いで、T 細胞応答を、通常、一つのタイムポイントで測定する。T 細胞応答は、通常、トリチウム化されたチミジン (3HTdR) など放射能標識パルスを増殖性 T 細胞に組み込むこと (「T 細胞増殖」) によるか、または、活性化 T 細胞から IL - 2 などのサイトカインの放出 (「サイトカイン放出」) によって測定される。

【0003】

従来の T 細胞エピトープを検出するための T 細胞アッセイ方法は、免疫調節性サンプルまたは毒性サンプルによる干渉の一方または双方によって制限され、前記干渉は、弱い感受性および/または APC、T 細胞、または APC および T 細胞の両方を阻害、刺激あるいは調節する。このように、従来の T 細胞アッセイ方法は、所定のペプチドサンプルおよびタンパク質サンプル中の T 細胞エピトープの一部または全てを検出するわけではなく、免疫調節性サンプルまたは毒性サンプルに対する T 細胞応答を測定するのに適してはならない。この免疫調製サンプルまたは毒性サンプルは、ペプチドサンプルおよびタンパク質サンプル、有機分子を含む非タンパク質サンプル、製剤自体が免疫調節性または毒性のあるタンパク質サンプルおよび非タンパク質サンプルを含む製剤、を含む。

【0004】

感受性に関し、エキソピボ T 細胞アッセイの弱感受性の主な原因は、アッセイ培養液内の細胞の種類や要素、を含むテスト抗原に対する T 細胞応答、またはテスト抗原あるいはテストサンプルそれ自体による T 細胞応答、を減少させるアッセイ混合物の要素に関連する。エキソピボ T 細胞アッセイの弱感受性の更なる原因は、ペプチドサンプルまたはタンパク質サンプル内の T 細胞エピトープに対する T 細胞応答の反応速度 (kinetics) に関連し、これによって、各々の T 細胞エピトープは、様々な時間で T 細胞応答を誘導する。一つのタイムポイントを用いる T 細胞増殖に関して、一方では、所定のサンプルを付加したときの T 細胞増殖は、開始時点で速く、次いで、大きな増殖反応が検出されないように放射能標識パルスが添加される時間で減少する。他方では、放射能標識パルスを添加した開始時点で、所定の他のサンプルを加えるときの T 細胞増殖が遅いと、大きな増殖反応は、例えその後の増殖反応が大きくても、検出されない。一つのタイムポイントを用いる場合のサイトカイン放出に関して、所定のサンプルを付加する際のサイトカイン生成は、一方で、開始時点で急速であるが、これらのサイトカインは、次いで、アッセイ混合物内の細胞によって消費され、一つのアッセイタイムポイントでは多くのサイトカインが検出されない。他方、サイトカイン放出は、開始時点で遅いと、例えその後でサイトカイン放出が大きくなっても、大きな増殖反応は、一つのアッセイタイムポイントでは検出されない。T 細胞増殖またはサイトカイン放出の反応速度は、以下の要素によって影響を受ける；アロタイプのばらつきなど要素の範囲、APC による取り込みおよび処理の効率および反応速度、APC 内のペプチドサンプルおよびタンパク質サンプルの効率および反応速度、ペプチドサンプルまたはタンパク質サンプル内の T 細胞ペプチドの強度および繰り返し頻度、T 細胞エピトープの特定の MHC クラス II のアロタイプへの結合親和力、T 細胞レセプタによるペプチド - MHC クラス II 複合体の認識効率、同時刺激性細胞表面

10

20

30

40

50

分子の頻度および濃度、 $CD8^+$ T細胞または抑制性T細胞などのアッセイ混合物中の他の細胞による刺激、記憶T細胞の存在、APCの表面に出現したMHCクラスII分子に直接負荷される小さなペプチドなどのサンプルの能力。

【0005】

免疫調節性サンプルまたは毒性サンプルによるT細胞アッセイ干渉に関して、このようなサンプルは、APC、T細胞、またはAPCとT細胞の両方によって、直接結合するか、吸収される。このようなサンプルは、APCおよび/またはT細胞の正常な免疫機能を下方制御または情報制御し、サンプルに対するT細胞エピトープまたはT細胞応答は検出されない。免疫調節性サンプルによるT細胞アッセイ干渉の他の原因は、APC、T細胞またはAPCおよびT細胞の両方に対する毒性である。免疫調節性サンプルによるT細胞アッセイ干渉の別の原因は、 $CD8^+$ 細胞または抑制性T細胞の上方制御など、APCやT細胞のサブセットを上方制御または下方制御することを含む。

10

【非特許文献1】Jones et al., J. Interferon Cytokine Res., vol 24 (2004) p 560 - 572

【非特許文献2】Jones et al., J. Thromb. Haemost., vol 3 (2005) p 1 - 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

特にヒト用製剤の応用範囲において、T細胞アッセイを有効に利用するために、T細胞エピトープを最適に検出するためのより感受性の高いT細胞アッセイ方法が必要とされ、また、免疫調節性サンプルまたは毒性サンプルを用いることができるT細胞アッセイも必要とされている。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、T細胞アッセイ混合物から制御性T細胞を除去することによって、テスト抗原に対するヘルパーT細胞応答が実質的に増加したという発見に一部基づいている。従って、本発明は、培養液から抑制性T細胞を除去することによって、テスト抗原に対するT細胞応答が増加するような、T細胞エピトープの検出を最適にする新規なT細胞アッセイ方法を提供する。さらに、本発明は、T細胞および/またはAPCを調節するタンパク質、あるいは、T細胞および/またはAPCに毒性を有するタンパク質の免疫原性を最適に検出する新規なT細胞アッセイ方法を提供する。本発明は、さらに、非タンパク質性化合物の検出にも応用可能であり、このような非タンパク質化合物は、直接T細胞レセプタを介して、タンパク質に共有結合的に結合することによって、MHCクラスII分子が結合したペプチドに直接結合することによって、あるいは、MHCクラスII分子に直接結合することによって、T細胞を刺激することができる。特に、本発明は、テスト抗原に対する応答を測定する前に、T細胞応答のエフェクタを通常下方制御する制御性T細胞を除去する方法を提供する。さらに、本発明は、抗原または他のサンプルとともに培養した後に、T細胞応答を検出するために複数のタイムポイントを最適化する、複数のタイムポイントで測定する方法を提供する。

30

40

【0008】

第1の態様においては、本発明は、テスト物質に対するヘルパーT細胞応答を測定するための方法を提供し、当該方法は、以下のステップ：

(a) 組織から得たサンプルから抗原提示細胞 (APC) およびT細胞を単離するステップと；

(b) 単離した細胞から制御性T細胞を除去するステップと；

(c) テスト物質とともに (b) で得られた前記APCおよび制御性T細胞を除去した細胞を培養するステップと、

(d) テスト物質に対するT細胞応答をアッセイするステップと、
を具える。

50

【 0 0 0 9 】

これらのAPCやT細胞は、通常、血液サンプルから得られる。しかしながら、扁桃腺、パイエル板(Peyer's Patch)、腫瘍および細胞株などの様々なソース(取得源)からのT細胞および/またはAPCを、本発明に使用することができる。好適な一実施例において、本発明の方法は、ヒト末梢血液単核球細胞(PBMC)を用いて実施することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 0 】

本明細書において用語「除去(depletion)」は、いくつかの制御性T細胞を除去することを意味する。これは、物理的に細胞を除去することによって、または、T細胞応答を阻害または調節することによってなされる。従って、標的のT細胞の活性は低減される。好ましくは、除去プロセスによって、標的のT細胞活性は、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%低減する。

【 0 0 1 1 】

当業者であれば、本発明の一部として、制御性T細胞を除去する方法または制御性T細胞をターゲティングする方法は、CD25^{hi}によって制御性T細胞を除去することに代替して用いられることが理解されるであろう。本発明は、T細胞アッセイにおいて制御性T細胞の効果を調節する方法を含む。除去またはターゲティングに関して、制御性T細胞の表面に提示された分子は、これらの細胞を除去するためのCD25と関連して、またはその代替として使用可能である。このような分子は、限定する趣旨ではないが、GITR、CTLA-4、CD103、CCケモカインレセプタ4、CD62LおよびCD45RAを含み、さらに、IL-10およびTGFβなど表面結合サイトカインまたは表面形状を含む。除去は、固相の上の制御性T細胞を吸着するために、もしくは、T細胞アッセイのために他のT細胞から制御性T細胞を分離するために、特定の抗体に結合することを含む方法によってなされる。調節に関して、制御性T細胞によって分泌された分子は、このような分泌を阻止されるか、または、分泌後に、ブロック/阻害/破壊される。上記分子は、IL-10、IL-4、IL-5およびTGFβなどサイトカインを含み、上記分子は、例えば、抗体または可溶レセプタなどの分子に結合する有機分子または無機分子を用いてブロックされ、siRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの阻害性核酸、もしくは、制御性T細胞内に輸送または誘導される他の核酸によって、ブロックされる。制御性T細胞活性の調節は、さらに、抑制機能を破壊するように、制御性T細胞のレセプタまたは他の表面分子をターゲティングすることによってなされ、前記制御性T細胞は、限定する趣旨ではないが、GITR、CTLA-4、CD103、CCケモカインレセプタ4、CD62LおよびCD45RAを含む。例えば、機能の阻害は、アゴニスト機能を有する特定抗原によって、または、制御性T細胞は除去されないが機能しなくなるようなリガンド-ターゲット相互作用をブロックする特定抗原によってなされる。

【 0 0 1 2 】

制御性T細胞活性の調節は、制御性T細胞が分泌する分子の標的レセプタの阻害によってなされるか、または、分泌された分子などを介して経路活性または下方制御のブロックによって、なされる。さらに調節に関して、制御性T細胞は、例えば、foxp3などの転写因子の阻害によって、または、制御性T細胞に関連した他の機能または経路によって直接阻害される。このような阻害またはブロックは、有機分子または無機分子によってなされるか、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどの阻害性核酸によってなされるか、または、制御性T細胞内に輸送または誘導される他の核酸によってなされる。有機分子、無機分子または核酸分子は、制御性T細胞の作用を阻害するか、または調節するために使用され、このような分子自体がT細胞アッセイを阻害するような全ての場合において、上記分子は、T細胞アッセイから除去されるか、またはT細胞アッセイを阻害しないように調節されることが好ましい。例えば、制御性T細胞によって分泌される分子を除去するために使用される特定抗体またはタンパク質は、T細胞アッセイと干渉しない。例えば、ヒトT細胞アッセイに関し、ヒトの場合の抗体またはタンパク質は、抗体またはタ

10

20

30

40

50

ンパク質自体に対する T 細胞応答を避けるために使用される。

【 0 0 1 3 】

T 細胞および / または A P C (通常、タンパク質またはペプチドであるが、非タンパク質化合物も含む) を調節しないテスト抗原を有する本発明の T 細胞アッセイにおいて、重要なステップは、以下の通りである ;

- (1) P B M C を、ヒト血液サンプルから単離し、
- (2) 選択的に C D 8 ⁺ T 細胞を取り除き、
- (3) C D 2 5 ^{h i} ⁺ T 細胞を除去し、
- (4) 培養液を 1 又はそれ以上の濃度でテスト抗原とともに培養し、T 細胞増殖および / またはサイトカイン放出に関して 1 又はそれ以上のタイムポイントで試験した。

10

【 0 0 1 4 】

テスト抗原が T 細胞および / または A P C を調節するような本発明の T 細胞アッセイにおける重要なステップは、以下の通りである ;

- (1) P B M C は、ヒト血液サンプルから単離され、
- (2) A P C は、通常、プラスチックに付着し、A P C はサイトカインを用いて分化され、テスト抗原を A P C に添加し、
- (3) C D 2 5 ^{h i} ⁺ T 細胞および選択的に C D 8 ⁺ T 細胞が先に除去された自家 P B M C を、A P C と混合し、
- (4) 培養液を、1 又はそれ以上の濃度のテスト抗原で培養し、T 細胞増殖および / またはサイトカイン放出に関する 1 又はそれ以上のタイムポイントで試験した。

20

【 0 0 1 5 】

テスト物質がペプチド、タンパク質サンプル、あるいは、A P C または T 細胞に対して免疫調節性あるいは毒性のある非タンパク質サンプルであるとき、血液は、C D 4 ⁺ T 細胞および A P C のソースとして (モノサイトおよび樹状細胞の形態で) 使用される。通常、ドナー集団 (c o h o r t) は、世界人口または研究対象において示される H L A - D R アロタイプの数および頻度を最もよく示すように選択される。この集団で示されるアロタイプは、通常、人口に示されるアロタイプの 8 0 % 以上であり、主な H L A - D R アリールの全てがよく示されている。代替としては、集団に示されるアロタイプを、過剰提示 (o v e r - r e p r e s e n t) するように、または、研究中の特定の疾患に関連すると考えられる H L A アロタイプを含むように選択する。本発明の好適な実施例において、P M B C は、密度勾配における分画によって血液サンプルから調製され、次いで、C D 8 ⁺ T 細胞および C D 2 5 ^{h i} T 細胞を除去し、残った P B M C は、主に C D 4 ⁺ T 細胞 (~ 7 0 %) および A P C (モノサイト 1 0 ~ 2 0 % および樹状細胞 1 ~ 3 %) を具える。このような C D 8 ⁺ C D 2 5 ^{h i} を除去した P B M C を細胞培養液中に作成し、1 又はそれ以上のペプチドサンプル、タンパク質サンプルまたは非タンパク質サンプルを添加し、この培養液を培養した。

30

【 0 0 1 6 】

次いで、T 細胞応答の測定を固定した 1 つのタイムポイントまたは複数のタイムポイントで行った。これらのタイムポイントは、類似のサンプルまたは最適化サンプルに対する T 細胞応答の反応速度を測定することで予め決定することができる。

40

【 0 0 1 7 】

アッセイ用の最適条件は、最適化物質を用いて決定できる。本明細書において用いられる「最適化物質」は、個々の免疫調節性ペプチド / 毒性ペプチド / 総タンパク質などの T 細胞応答を誘導することで周知な化合物であり、これらは、試験されるサンプルと同様の寸法および構造を有するか、またはテスト物質に対して同様の特性を有する。ペプチドサンプル、タンパク質サンプルまたは非タンパク質サンプルに関して、試験されるサンプルと同様の寸法および構造の 1 又はそれ以上のペプチド (通常では、長さが 9 ~ 4 0 アミノ酸)、総タンパク質または非タンパク質化合物を、最適化物質として使用することができる。この最適化物質をアッセイし、その結果を、典型的な T 細胞応答の反応速度を決定するために使用する。例えば、T 細胞応答を、1 又はそれ以上の様々な代替のアッセイを用

50

いて、サンプル添加後、通常、4～9日の間で、様々なタイムポイントで測定する。最適化物質に対するT細胞応答の反応速度が一度決定されると、サンプルを連続的に試験するためにアッセイタイムポイントのセットを決定することができる。このように、テストサンプルに対するT細胞応答は、1又はそれ以上の適宜なタイムポイントでアッセイすることができる。代替もしくは追加として、2またはそれ以上の濃度を最適化物質に対するT細胞応答の反応速度を決定するために使用でき、次いで、サンプルを上記濃度で試験できる。

【0018】

T細胞応答は、T細胞増殖など、数多くある各種アッセイを用いて測定可能であり、このようなアッセイは、3HTdR（またはT細胞が増殖することによって吸収される他の放射活性、蛍光、化学蛍光化合物）のパルスを組み込むこと、IL-2またはIFN γ などのサイトカインの放出、活性化マーカーmRNAの転写を増加させるmRNAの転写の変化、Ca²⁺流入、および、表現型のマーカー、特に活性化T細胞に対するマーカーの変化を利用することによって行われる。通常、ペプチドまたはタンパク質サンプルに関して、T細胞応答は、サンプル添加後5、6、7および8日で3HTdRのパルスを組み込むことによって測定されるか、サンプル添加後8日でサイトカイン（特にIL-2）の放出を測定することによって（もしくは、3HTdRの組み込みおよびサイトカイン放出測定の両方によって）行われる。代替としては、たくさん重なっている配列を有するペプチド（例えば、タンパク質配列中の15マーが12アミノ酸と重なっている場合）に関して、3HTdRのパルス組み込みおよび/または1つのタイムポイント（通常、テストペプチド添加後7日目）でのサイトカイン放出測定を使用することができる。隣接して重なっているペプチドは、T細胞エピトープ検出に関する感受性をともに促進するT細胞エピトープを含む可能性がある。

【0019】

ペプチドサンプルまたはタンパク質サンプルが、APCまたはT細胞に対して免疫調節性または毒性があるとき、組織から得られたサンプルを処理して、APCを他の細胞から分離させる。これは、通常、プラスチックに付着させることによって行われ、次いで、ペプチドまたはタンパク質サンプルをAPCとともに培養する。APCを、インターロイキン4、顆粒球-マクロファージコロニー刺激性因子、腫瘍壊死因子 α およびインターロイキン1 α などのサイトカインとともに培養して、成熟APC表現型を誘導することができる。予め分画したAPCを有する標準T細胞アッセイにおけるサンプルは、通常、最大48時間のAPC培養時間を必要とする。好ましくは、半成熟APCを、最大4日間インターロイキン4および顆粒球-マクロファージコロニー刺激性因子を含む増殖培地で培養することで得た。次いで、免疫調節性または毒性サンプルを含むサンプルを、半成熟APCに添加して短時間培養した。サンプルの毒性または免疫調節性機能に応じて、半成熟APCを有する培養時間は、3～10時間の範囲とすることができる。サンプルのAPCを培養した後、半成熟APCを繰り返し洗浄することによって外来性サンプルを除去した。次いで、成熟サンプルを適用（パルス）したAPCを、腫瘍壊死因子、インターロイキン1、CD40リガンドまたはリボポリサッカライドなど炎症促進性因子とともに培養して得る。自家（autologous）T細胞であって通常、PBMCから調節されたCD4⁺CD8⁻CD25^{hi}を除去したT細胞を、成熟サンプルを適用したAPCに加える。CD4⁺CD8⁻CD25^{hi}を除去したT細胞を、成熟サンプルを適用したAPCとともにさらなる培養タイムポイントの範囲で培養した。上述した最適化物質を、様々なAPC培養タイムポイントおよび/または様々なT細胞培養タイムポイントとともに応答の反応速度を決定するために使用することができる。最適化物質を用いたこれらの結果を、サンプルを連続的に試験するために、APC培養および/またはT細胞タイムポイントのセットを決定するために使用することができる。このように、テストサンプルに対するT細胞応答を1又はそれ以上のアッセイタイムポイントで検出する。代替として、2またはそれ以上の濃度を、最適化物質に対するT細胞応答の反応速度を確定するために使用し、次いで、サンプルをこれらの濃度で試験することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

試験するサンプルが非タンパク質のとき、上記の方法のいずれか（すなわち、免疫調節性または毒性特性を有する、もしくは有しないペプチドサンプルまたはタンパク質サンプルに対する方法）は、非タンパク質サンプルがAPCまたはT細胞、もしくはその両方に対して、免疫調節性があるか、または、毒性があるかに応じて使用することができる。

【 0 0 2 1 】

APCまたはT細胞、もしくはその両方に対して免疫調節性があるタンパク質または非タンパク質サンプルに関して、選択的な付加ステップは、例えば、T細胞活性またはAPC分化など、表現型マーカーを上方制御または下方制御するために直接試験することである。典型的なT細胞活性化マーカーは、CD69、CD25、CTLA4、GITRおよび細胞間C α^2 流入（flux）の発現の変化を含む。APCの分化を評価するために使用される一般的な表現型マーカーは、MHCクラスII、CD80およびCD86を含み、これら全ては成熟APCで高頻度で発現する。これらの付加的ステップは、テストサンプルに対するT細胞応答の反応速度の情報を提供することができ、これによって、テストサンプルに対するT細胞応答を最適に試験するためのアッセイタイムポイントを決定するのが支援される。

【 0 0 2 2 】

本発明の新規なエキゾビボT細胞アッセイ方法は、特にヒト用の薬剤に関する用途範囲を有する。薬剤として前向きに使用されるタンパク質に関して、本発明のT細胞アッセイは、タンパク質配列と重なっているペプチドを試験することによって、タンパク質配列内のT細胞エピトープを同定するために使用される。このようなT細胞エピトープの位置および強度は、次いで、ヒトにおいて、タンパク質の潜在的免疫原性を評価するために使用することができる。あるいは、ヒトに使用する前に、タンパク質内のT細胞エピトープをタンパク質配列の変異によって除去することができる。さらに、所定のタンパク質内のT細胞エピトープを本発明の方法によって同定することができ、次いで、タンパク質ワクチン内のT細胞エピトープ配列（またはその変異体）を含むこと、もしくは、ワクチンの一部として他の成分に付加されることによって、ワクチン内に組み込まれる。

【 0 0 2 3 】

本発明の新規なT細胞アッセイは、ペプチド、タンパク質および非タンパク質（有機分子、脂質、炭化水素、もしくは、複合体（conjugate）、混合物（mixture）および製剤を含む2又はそれ以上の様々な部分からなる分子、を含む分子タイプの潜在的免疫原性を評価するために使用できる。本発明のT細胞アッセイは、医薬品の調査（research）、開発、製造および臨床試験において広く応用できる。調査において、例えば、活性化分子の様々な類似体に対するT細胞応答は、ヒトにおける類似体の潜在的免疫原性を評価するために使用できる。このようなT細胞応答は、次いで、さらなる開発のために、前駆的な（リード）医薬品の選別に関する基準として使用することができる。開発において、例えば、同一分子の様々な製剤に対するT細胞応答は、ヒトにおける製剤の潜在的な免疫原性を評価するために決定することができる。このようなT細胞応答は、従って、臨床試験用の最適な製剤を選別するための基準として使用することができる。製造において、例えば、同一分子のバッチの製造に対応するT細胞応答は、バッチの潜在的免疫原性を評価し、さらに、バッチ間の分子におけるあらゆる変化を評価するために決定することができる。このようなT細胞応答は、製造用品質試験に使用することができる。臨床試験において、例えば、T細胞応答は臨床試験中の医薬品に対する免疫原性を評価するために、患者の血液を使用して決定することができる。さらに、本発明のT細胞アッセイは、医薬品に対するT細胞応答のあらゆるMHC制御を決定することができる。本発明の細胞アッセイは、製剤に対するT細胞応答のあらゆるMHC制御を決定するために使用することもできる。

【 0 0 2 4 】

T細胞エピトープを検出する際に使用することの代替例として、本発明のT細胞アッセイは、好ましくはヒト用に、医薬品に対する潜在的有害反応を評価するために使用するこ

10

20

30

40

50

とができる。これらの有害反応は、過敏症、アレルギー、刺激性、免疫抑制、過免疫刺激および注射部位反応を含む。本発明のT細胞アッセイ方法は、移植などの非医薬品治療、花粉アレルギーなどの環境因子、食料品、化粧品、ならびに、界面活性剤や酵素などの工業的に製造された試薬などに対する潜在的有害反応を評価するために使用することができる。

【0025】

なお、当業者であれば、本発明のT細胞アッセイ方法の変形を使用することができるが、例えば、T細胞応答の分析に複数のアッセイタイムポイントを使用することなど、これらの変形は、本発明の範囲内に入ることを理解されたい。例えば、本発明の範囲内には、T細胞応答に対する各々のステップを決定するMHC-ペプチド結合などの方法を含む、T細胞応答の分析として当分野で周知な様々な方法がある。上述したようなT細胞およびAPCの分画の代替として、他の細胞を、本発明のT細胞アッセイを使用して分画してもよい。T細胞アッセイは、ランゲルハンス細胞、様々なマクロファージサブセットあるいは様々なAPCサブセットが豊富なAPCを用いて実行可能であり、および/または、様々なT細胞サブセットを用いるか、または豊富にすることによって実行可能である。なお、サイトカインは、例えば、感受性を改良するために、あるいは、特定のAPCまたはT細胞を下方制御または上方制御するために、本発明のT細胞アッセイのアッセイ混合物に付加すること（またはアッセイ混合物から除去すること）ができる。T細胞がタンパク質またはペプチドのAPC提示によってプライム化され、次いで、同一のまたは関連するタンパク質あるいはペプチドによって再チャレンジされる、例えばリコールアッセイフォーマットなど本発明において、T細胞アッセイの様々なフォーマットを使用することができる。

【0026】

以下の実施例は、本発明を例示するために提供されるものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0027】

実施例1：T細胞応答のCD25⁺細胞除去の効果

末梢血液単核球細胞を、国立血液輸血サービス(Addenbrooke's hospital、ケンブリッジ、英国)から得られ、Addenbrooke's Hospital Local Research Ethics Committeeによって許可された(24時間内に採血した血液から)健康なコミュニティドナーの軟膜から単離される。PMBCをFicoll(GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK)密度遠心分離によって軟膜から単離し、CD8⁺T細胞をCD8⁺RosetteSepTM(StemCell Technologies, Vancouver, Canada)を用いて除去した。ドナーを、AllsetTM SSP-PCRに基づいた組織型キット(Dynal, Wirral, UK)を用いてHLA-DRはプロタイプを同定することによって特徴付け、ならびに、コントロール抗原であるKeyhole Limpet Haemocyanin(KLH)(Pierce, Cramlington, UK)、Tetanus Toxoid(Aventis Pasteur, Lyon, France)およびインフルエンザHA(C32、aa307~319)に対するT細胞応答を決定することによって特徴付けた。

【0028】

CD25^{hi}T細胞の除去は、供給者(サプライヤ)の標準プロトコルおよびマグネットを用いてMiltenyi Biotec(Guildford, UK)製の抗CD25マイクロビーズを用いて実施された。各ドナーの10バイアルを解凍し、細胞を30mlの2%不活性化ヒト血清/PBS(Autogen Bioclear, Calne, Wiltshire, UK)に再懸濁した。5×10⁷細胞を3×15mlチューブに移し、残りの細胞を総PBMCとして保持した。抗CD25マイクロビーズの希釈混合液を、300μlのビーズと4200μlの分離バッファ(0.5%ヒト血清/2mM EDTA/PBS)で作成される。この15mlのチューブを遠心分離し、500μlのマ

イクロビーズ希釈混合液に再懸濁した。次いで、チューブをコラムで分離する前に5、10または20分間4 で保持した。スタンド上に支持されたマグネットにコラムを配置することによってコラムをセットアップし、2 mlの分離バッファをコラムに加え、ドリップした。ビーズとともに培養した後、10 mlの分離バッファを加え、チューブを1500 rpmで7分間遠心分離した。次いで、細胞を500 µlの分離バッファに再懸濁し、カラムに加え、続いて、2 × 1 mlの分離バッファで洗浄した。カラムを通る流れを15 mlのチューブに回収し、これにはCD25^{hi}T細胞を除去したフラクションが含まれていた。これらの細胞を1500 rpmで7分間スピンドウンし、カウントする前に3 mlのAIMV培地 (Invitrogen, Paisley) に再懸濁した。

【0029】

10

細胞のCD4およびCD25を染色し、細胞数をFACSで検出した。各細胞集団の5 ~ 10 × 10⁵ 細胞を96ウェルのU字底プレート (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) の1ウェルに入れた。このプレートを1200 rpmで4分間スピンドウンした。上澄みを排除し、細胞を50 µlの抗体希釈液で再懸濁した。抗体希釈液は、FACSバッファ (1%ヒト血清 / 0.01%アジ化ナトリウム / PBS) 中のFITCラベルされた抗CD4抗体 (R&D System, Minneapolis, USA) の1 / 50希釈液、および、PEラベルされた抗CD25抗体 (R&D System, Minneapolis, USA) の1 / 25希釈液からなる。コントロール用ウェルは、未染色のまま、アイソタイプコントロールで染色、または、ラベル化された抗体で単一染色する。

20

【0030】

プレートを暗闇で30分間氷上で培養した。次いで、プレートを1200 rpmで4分間スピンドウンした。上澄みを排除し、細胞を200 µl FACSバッファに再懸濁した。これを2回繰り返し、次いで、細胞をFACSチューブに移す。細胞をFACS Calibur (Becton Dickinson, Oxford, UK) にかけて、データを集め、寸法、粒度および蛍光タグに基づいて分析した。

【0031】

増殖アッセイを、以下のように行った。CD8⁺T細胞を除去したPBMCおよびCD8⁺CD25^{hi}を除去したPBMCの全てを、100 µlのAIMV中に1ウェルあたり2 × 10⁵ 加えた。平底の96ウェルプレートを用いて、各試験条件に対して3回培養 (triplicate culture) を行った。各ペプチド100 µlを、細胞培養液に加え、終濃度を5 µMとした。各ウェルに1 mCi / mlの³H TdR (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) を18時間かけて適用する前に、細胞をペプチドとタンパク質抗原とともに7日間培養した。

30

【0032】

増殖アッセイに関し、2に等しいまたはそれ以上 (SIが2以上) の刺激指標 (stimulation index) の閾値を用い、それにより、この閾値より大きい増殖応答を含むペプチドを、陽性とみなした (点線)。全てのデータを分析し、1つの方法であるStudent's t検定を用いて、分散係数 (CV)、標準偏差 (SD) および有意差 (p < 0.05) を決定した。2以上のSIを示した反応の全ては、未処置の培地コントロールに対して有意差 (p < 0.05) があった。

40

【0033】

これらの結果は、図1に示されており、これは、一連のボーダーラインまたは弱いT細胞エピートプに対する (ペプチド1 (PGQTATITCSGHALG)、2 (GDKFVSWYQQGSGQS)、6 (IKPEAPGCDA SPEELNRY YASLRHY LNLVTRQRY)、9 (QSI SNWL N WYQQKPG)、13 (KGLEWLVVIWSDGSS)、17 (AASGFTFSSFGMSWV)、20 (DTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWQG - GTQV)、24 (HQS LVIKLMPNITLL)、および、一対の強いT細胞エピートプに対する (ペプチド25 (PKYRNMQPLNSLK IAT)、26 (TVFYNI PPMP L) およびKLH抗

50

原に対して、3人のヒトドナー（475、440および462）からのPBMC中のT細胞増殖反応を示している。これらの結果は、CD25^{hi}T細胞を除去した後、全てのペプチドに関してT細胞応答が上昇したことを示す。これらの結果は、ペプチド1および2などの例示的なペプチドにおいて、CD25^{hi}T細胞を除去した後のT細胞応答における強力な上昇を示しており、T細胞応答に関してボーダーラインまたは陰性とされたペプチドにおけるT細胞エピトープの検出を可能とする。

【0034】

実施例2

ワイルドタイプ（WT）、および、ヒトsTNFR1配列由来のT細胞エピトープを除去したペプチド（それぞれがHLRHCLSCSKCRKEMおよびHARHCLSCSKCRKCRKEM）を合成し（Pepscan System, Leystad, Netherlands）実施例1の方法を用いて試験し、この方法において、CD8⁺CD25^{hi}T細胞除去PBMCを用いて20人の健康なドナーからのT細胞応答を刺激する能力に対してsTNFR-1由来のペプチドを比較した。バルク培養液は、24ウェルプレートの各ウェルに対してAIMV培地中の2~4×10⁶/mlのCD8⁺CD25^{hi}T細胞を除去したPBMC1mlを加えることによって作成した（Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany）。各ドナーに対して、10μMのペプチド1mlを各バルク培養液（バルク培養液あたり2mlに関して終濃度は5μM）に加えることによって各ペプチドを別々に試験した。比較のために、さらなるバルク培養液を未処理のポジティブ（KHL）コントロール用に作成した。（Tブラストの複製サンプルを6~9日でバルク培養液から除去し、増殖を96丸底プレートで評価した。これらのデータを刺激後6、7、8および9日で、各ペプチドに対するT細胞応答の大きさおよび反応速度（kinetics）を評価するために使用した。さらに、時間経過的増殖アッセイに用いた20人の健康なドナーの同一サンプルを、TNFR1ペプチドとともに8日間培養した後、IL-2エリスポット（Elispot）アッセイを用いて、IL-2生成物を試験した。エリスポットプレートを、70%エタノールで予め湿らせ、次いで、4で一晩、IL-2捕捉抗体（R&D system, Minneapolis, USA）でコーティングした。これらのプレートを、2回PBS（Invitrogen, Paisley, UK）で洗浄し、次いで、室温で2時間、1%BSA/PBSでブロックした。CD8⁺CD25^{hi}T細胞を除去したPBMC（4×10⁵細胞/ウェル）を加える前に、これらのプレートをPBSで洗浄した。37/5%CO₂で7日経過後、プレートをディベロップした。まず水で洗浄した後、次に、PBSで洗浄し、PBS/1%BSA中のIL-2検出用抗体（R&D system, Minneapolis, USA）を、37で2時間加えた。PBSでさらに洗浄した後、ストレプトアビジン-AP（R&D system, Minneapolis, USA）を1.5時間加え、プレートを再度洗浄し、次いで、BCIP/NBT色素体（chromagen）（R&D system, Minneapolis, USA）を30分間加えた。これらのプレートを水で洗浄し、乾燥させ、次いで、Immunospot エリスポット分析器、ソフトウェアバージョン3（Cleveland, Ohio, USA）を用いてスポット数（カウント）を分析した。

【0035】

T細胞増殖およびIL-2エリスポットアッセイの両方に関して、SI閾値の2（点線）を超え、バックグラウンド（*）より有意差（p<0.05）のある反応を、陽性とみなした。図2に示されるこれらの結果は、WTペプチドは、3人の同一ヒトドナー（3、8および11）において、増殖アッセイと、IL-2エリスポットアッセイと、の双方で応答を生じさせたことを示しており、これは、このペプチドがT細胞エピトープを含むことを示唆する。この時間経過的増殖が示すことは、これらの3人のドナーに関し、ペプチドを加えてから7日後にピーク増殖応答を検出し、各々の場合において、WT（ワイルドタイプ）TNFR1ペプチドは、増殖応答をペプチド添加後8日または9日で測定した場合、T細胞エピトープとして陰性を記録した。これらの結果は、さらに、増殖によって測

定されるT細胞応答とIL-2エリスポットとの間の強い相関関係を示す。

【0036】

実施例3 - 時間経過による総タンパク質T細胞アッセイ

WO2004/113387において、エピトープを除去したタンパク質が変異I10Q、T20R、H23P、L56A、L108T、L110HおよびL149Dを有することともに記載されるように、ワイルドタイプ(WT)および変異T細胞エピトープを除去したヒトsTNFR1タンパク質を、ヒトFc融合タンパク質として調整した。1mlのsTNFR1タンパク質を終濃度10μg/mlに加えることを除いて、実施例2と同様に増殖およびIL-2エリスポットアッセイを実施した。図3に示されるこれらのデータは、増殖アッセイに関して、有意差のあるT細胞応答を、WTに関してドナー13および17に関して検出したが、T細胞エピトープ除去タンパク質に関しては検出しなかったことを示唆している。ピーク応答を8日および9日で観察し、ドナー13あるいは17のどちらにも6日での有意差のある応答は示されなかった。IL-2エリスポットアッセイに関し、ドナー13および17の双方は、WTに対するT細胞応答に関して陽性であるが、変異体エピトープ除去タンパク質に対しては陽性ではなかった。さらに、ドナー4は、このアッセイにおいてWTタンパク質に対して有意差のある応答を示した。実施例2にみられるように、さらに、これらの結果は、この場合の総タンパク質に対してT細胞応答を検出する時間経過的アッセイの有用性を示した。実施例2にみられるように、これらの結果は、増殖によって測定されたT細胞応答とIL-2エリスポットとの間の良い相関関係を示す。

【0037】

実施例4 - 時間経過による免疫調節性タンパク質T細胞アッセイ

この実施例は、HLA-G(Mitsdoerffer M et al J Neuroimmunol. 2005 159:155-64)およびB7-1H(Schreiner B et al J Neuroimmunol. 2004 155:172-82)などの樹状細胞の阻害分子を上方制御することで周知の免疫調節性タンパク質、ヒトインターフェロンβに対するT細胞応答を測定するために使用される。IFNβの配列中に生じるリニア型T細胞エピトープがインビトロでT細胞を刺激するかどうか試験するために、樹状細胞由来のモノサイト内に抗原を添加するための改良方法が開発され、この方法において、樹状細胞(DC)およびCD4⁺T細胞の両方におけるIFNβの生物学的効果は最小化された。

【0038】

組織培養プラスチック(>90%CD14⁺)に付着することでPBMCからモノサイトを単離し、1ウェルあたり1×10⁶(24ウェル)のおおよその密度で5%の熱不活化ヒトAB血清(Autogen Bioclear, Calne, Wiltshire, UK)(増殖培地)を伴うAIM-V培地中の24ウェルプレートで培養した。モノサイトをヒトIL-4含有増殖培地(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)およびGM-CSF(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)中で3日間培養した。3日目で、44μg/mlのベータフェロン(Schering AG, Berlin, Germany)を、3%熱不活性化ヒトAB血清および25mM(終濃度)のHEPES(pH8)を加えた0.5mlのテストバッファに、添加した。50μg/mlKLHを含むコントロールウェルまたは抗原を含まないコントロールウェル(未処置細胞)を、3%熱不活性化ヒトAB血清(標準バッファ)を加えた1mlのPBSと0.01%のTween20中で培養した。樹状細胞(DC)を抗原と6時間培養し、その後、DCを6回洗浄し外来性IFNβを取り除いた。次いで、細胞をTNFα(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)、GM-CSFおよびIL-4を含む増殖培地に一晚再懸濁した。

【0039】

4日目、自己のCD8⁺CD25^{hi}除去CD4⁺細胞を、PBMC(Dynal Human CD4⁺陰性単離キット、Wirral, UK)からネガティブセクション

によって単離し、次いで、増殖プレートおよびエリスポットプレートの双方に 1×10^5 / ウェルで DC に加えた。(実施例 2 のように) ディベロップする前にエリスポットプレートを 6 日間培養し、増殖を 3 H T d R (1μ C i / ウェルで 6 時間適用 (パルス)) を組み込むことによって測定する前に増殖プレートを 6 日間培養した。

【 0 0 4 0 】

実施例 2 と同様に、増殖およびエリスポットアッセイに関しては、刺激指数が 2 以上の実験上の閾値を選択し、この場合、前記閾値より上の応答を陽性とみなした。さらに、応答が未処理のコントロール (*) から有意差 ($p < 0.05$) があるかどうか統計分析を行った。アッセイ間のばらつきの度合を決定するためにさらなる分析は、分散係数 (C V) を含んだ。

10

【 0 0 4 1 】

図 4 に示されるようにこれらの結果は、増殖アッセイに対する 29 ドナー中の 4 ドナーと、I L - 2 エリスポットアッセイに対する 29 ドナー中の同一の 4 ドナーとで有意差があったことを示す。このデータは、T 細胞応答は、免疫原性タンパク質でも再現性を示すことを示唆している。

【 0 0 4 2 】

実施例 5 - 時間経過による低分子 T 細胞アッセイ

カルバマゼピン (Novartis Pharmaceuticals UK) および N - アセチルイミノスチルベン (カルバマゼピンの類似体、Yingra Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006 ; 118 : 223 - 241 にしたがって合成) を、健康なドナーの一団における T 細胞応答を刺激する能力と比較した。両方の化合物を、実施例 2 の方法に従って、各ドナーに対する個別のバルク培養液において 25μ g / ml で試験した。すなわち、バルク培養液を、24 ウェルプレートの各ウェルで $2 \sim 4 \times 10^6$ C D 8 ⁺ C D 25 ^{h i} T 細胞除去 P B M C を用いて作成した。(T プラストの) 複製サンプルを、5 ~ 8 日でバルク培養液から除去し、96 ウェルプレートで増殖を評価した。これらのデータを、各化合物に対する T 細胞応答の大きさおよび反応速度を評価するために用いた。

20

【 0 0 4 3 】

実施例 2 に関して、陽性反応の閾値として 2 以上の S I を用い、データをさらに分析し、パラメータ性および非パラメータ性統計分析を用いて、分散係数 (C V)、標準偏差 (S D) および有意差 ($p < 0.05$) を決定した。T 細胞応答が統計的有意差 ($p < 0.05$) で、S I が 2 以上の場合にのみ、化合物を免疫原性があるとみなした。

30

【 0 0 4 4 】

これらの結果は、時間経過による T 細胞アッセイ方法を用いてある濃度範囲で試験した場合、カルバマゼピン代謝物、N アセチルイミノスチルベンは、カルバマゼピン (患者のアレルギ反応を遅らせる潜在的誘導因子として周知である) よりも刺激されたドナーは少なかったことを示した。単一のタイムポイントを用いて、多数の T 細胞応答における T 細胞アッセイは、検出されない。実際、カルバマゼピンに対する T 細胞応答の大半は、5 日に誘導され、6 日および 7 日に一回だけさらなる応答が検出される。6、7 または 8 日で単一タイムポイント T 細胞アッセイを用いて、N アセチルおよびカルバマゼピンに対し

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 5 】

【 図 1 】 図 1 は、各ペプチドに対するドナーの T 細胞増殖応答を示す。

【 図 2 】 図 2 は、3 人の同一ヒトドナー (3、8 および 11) において、増殖アッセイおよび I L - 2 エリスポットアッセイの双方で W T ペプチドが応答を生じさせたことを示す。

【 図 3 】 図 3 は、増殖アッセイに関して、W T に関してドナー 13 および 17 に関して有意差のある T 細胞応答を検出したが、T 細胞エピトープ除去タンパク質に関して T 細胞応

50

答は検出しなかったことを示す。

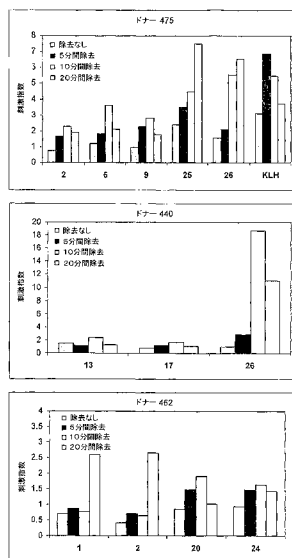
【図4】図4は、増殖アッセイに対する29ドナー中の4ドナーと、IL-2エリスポットアッセイに対する29ドナー中の同一の4ドナーと、で有意差があったことを示す。

【図5-1】図5-1は、健康なドナーのT細胞応答を刺激する能力に対してカルバマゼピンとN-アセチルイミノスチルベンとを比較した結果を示す。

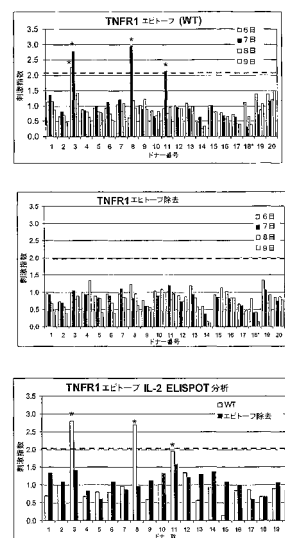
【図5-2】図5-2は、健康なドナーのT細胞応答を刺激する能力に対してカルバマゼピンとN-アセチルイミノスチルベンとを比較した結果を示す。

【図5-3】図5-3は、健康なドナーのT細胞応答を刺激する能力に対してカルバマゼピンとN-アセチルイミノスチルベンとを比較した結果を示す。

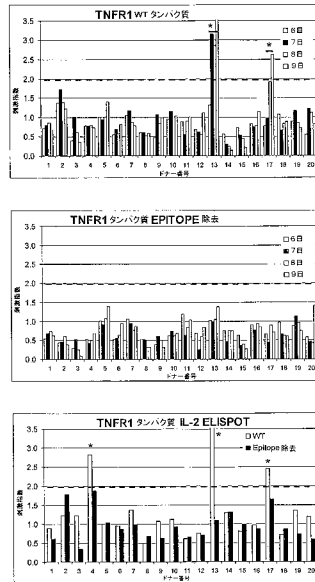
【図1】



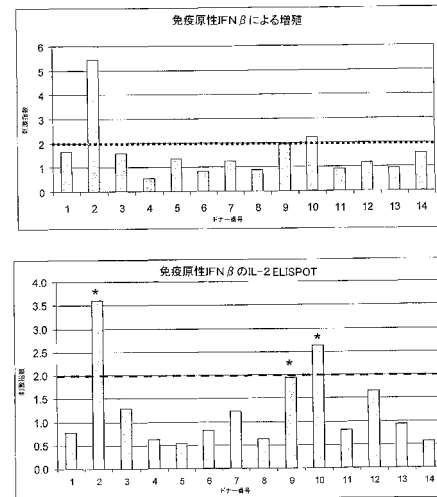
【図2】



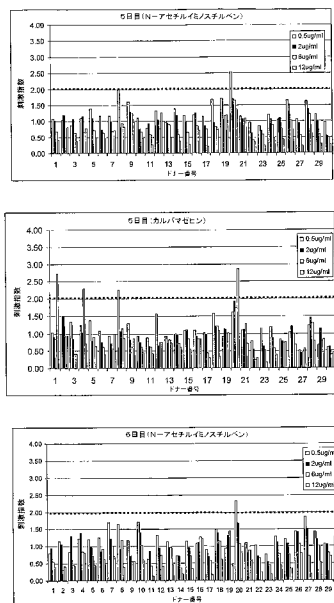
【図 3】



【図 4】



【図 5 - 1】



【図 5 - 2】

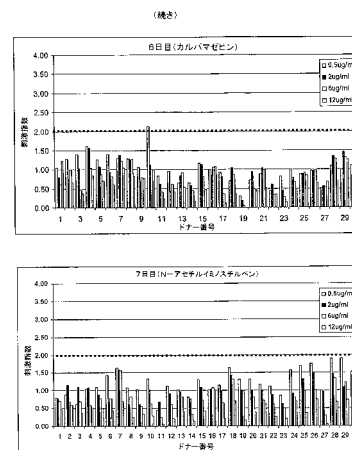
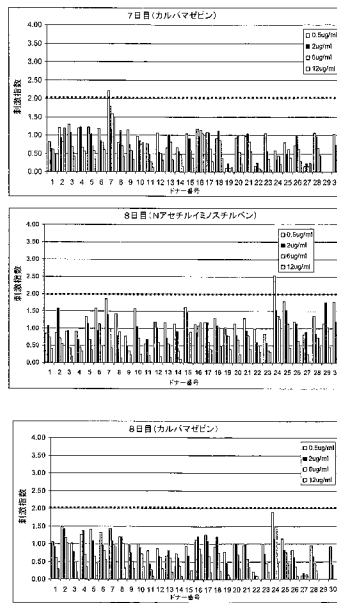


図5は次頁につづ

図5は次頁につづ

【図5 - 3】

(続き)



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 0620123.0

(32)優先日 平成18年10月11日(2006.10.11)

(33)優先権主張国 英国(GB)

(72)発明者 カー, フランシス, ジェイ.

イギリス アバディーン エイビー 2 3 8 ダブリュユー, バルメディエ, ザ ホールディングス
, パーチリー

(72)発明者 ルスト, アリソン

イギリス サフォーク シービー 8 0 ジーアール, ニューマーケット, ヒースマンクローズ 3
1

(72)発明者 デービス, ローラ

イギリス ケンブリッジ シービー 3 6 エイチダブリュ, グレイト ケンボーン, フォックスホ
ロウ 6

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 6 (WO, A 1)

欧州特許出願公開第 0 1 2 4 1 2 4 9 (EP, A 1)

国際公開第 1 9 9 9 / 0 1 9 4 8 4 (WO, A 1)

国際公開第 1 9 9 7 / 0 3 9 7 2 1 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/02

G01N 33/15

G01N 33/50

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)