

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月12日(12.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/253141 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/6806 (2018.01) C12M 1/00 (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01) C12Q 1/686 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/020613

(22) 国際出願日: 2024年6月6日(06.06.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-094650 2023年6月8日(08.06.2023) JP
特願 2023-180350 2023年10月19日(19.10.2023) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人国立がん研究センター(NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 Tokyo (JP). ミナリスメディカル株式会社(MINARIS MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1046004 東京都中央区晴海一丁目8番10号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 中面 哲也 (NAKATSURA Tetsuya); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁目5番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 齊藤 太郎(SAITO Taro); 〒1046004 東京都中央区晴海一丁目8番10号 ミナリスメディカル株式会社内 Tokyo (JP). 片山 有基(KATAYAMA Yuki); 〒1046004 東京都中央区晴海一丁目8番10号 ミナリスメディカル株式会社内 Tokyo (JP).

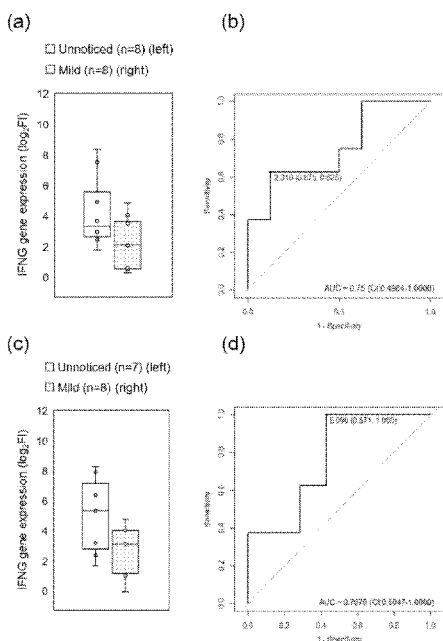
(74) 代理人: 三好 秀和, 外 (MIYOSHI Hidekazu et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目2番8号 虎ノ門琴平タワー Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,

(54) Title: PREDICTION OF SARSr-COV BREAKTHROUGH INFECTION SYMPTOMS

(54) 発明の名称: SARSr-CoVブレイクスルー感染症状の予測

[図2]



(57) Abstract: Provided is a method for collecting data for predicting symptoms of a breakthrough infection in a subject who received a SARSr-CoV vaccine, the method comprising: a step for preparing a leukocyte-containing specimen collected from the subject; a step for adding a plurality of peptides to the specimen; and a step for measuring the level of expression of mRNA of any one of T cell function-related markers selected from the group consisting of IFN γ , CXCL9, CXCL10, and IL-1A. The plurality of peptides correspond to a plurality of fragments of the amino acid sequence of a spike protein, and cover 40% or more of the total length of the amino acid sequence of the spike protein. If the level of expression of the mRNA of the T-cell function-related marker is equal to or higher than a predicted reference level, the subject is predicted to be asymptomatic in a case where a breakthrough infection occurs in the subject. If the expression level of the mRNA of the T-cell function-related marker is less than the predicted reference level, the subject is predicted to be symptomatic in case where a breakthrough infection occurs in the subject.

[続葉有]

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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: SARS r-CoVのワクチン接種を受けた被験者においてブレイクスルー感染における症状を予測するためのデータを収集する方法であって、被験者から採取された、白血球を含む検体を準備する工程と、検体に複数のペプチドを添加する工程と、IFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1Aから成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定する工程とを含む方法が提供される。複数のペプチドは、スパイクタンパク質のアミノ酸配列の複数の断片に相当する複数のペプチドであり、スパイクタンパク質のアミノ酸配列全長の40%以上をカバーする。該T細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルが予測参照レベル以上である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に無症状となると予測され、予測参照レベル未満である場合には、ブレイクスルー感染した場合に症状が出ると予測される。

明 細 書

発明の名称 : SARS r-CoVブレイクスルー感染症状の予測

技術分野

[0001] 本開示は、SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) 関連コロナウイルスのワクチン接種に関する。より具体的には本開示は、SARS関連コロナウイルスのワクチン接種者における、接種後の感染の症状を予測することに有用となるアッセイに関する。

背景技術

[0002] SARS関連コロナウイルス (SARS-related coronavirus; 以下、SARS r-CoVという略称を用いる) は、ベータコロナウイルス属に分類されるコロナウイルスの種 (species) である (国際ウイルス分類委員会; https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=20181868)。SARS r-CoVにはSARS-CoV-1及びSARS-CoV-2が含まれ、これらは同じSARS r-CoV種であるが異なる年に突発した別系統であるという関係にあり、いずれも約30000塩基からなる一本鎖・プラス鎖RNAゲノムを持ち、ヒトのアングiotensin変換酵素2 (ACE2) を受容体として利用してヒト細胞に感染でき、ヒトにおいて重篤な呼吸器疾患を引き起こすことを含め、同種のウイルスとして共通した特性を有している。SARS r-CoVが社会に及ぼす負の影響は甚大となり得、例えばSARS-CoV-2は、2019年の突発後から数年に亘ってパンデミックを引き起こし、本願出願時でもなお感染者を出し続けている。

[0003] SARS r-CoVは、4つの主要な構造タンパク質、具体的にはスパイク (S) タンパク質と、エンベロープ (E) タンパク質と、膜 (M) タンパク質と、ヌクレオカプシド (N) タンパク質とを有するコロナウイルスである。スパイクタンパク質は、S1及びS2と呼ばれる2つの領域からなる大きなI型膜貫通型タンパク質であり、S1には主に、細胞表面の受容体を認識する受容体結合ドメインが、S2には膜融合に必要な要素が含まれている。

- [0004] SARS r-CoVに対する生体の防御機能として、抗体が中心的役割を果たす液性免疫のほか、細胞性免疫がある。細胞性免疫は、体内に侵入した病原体等の異物を認識し、抗原提示細胞を介してCD4⁺ T細胞及び／又はCD8⁺ T細胞を活性化することで異物（あるいは異物を含む細胞、例えば感染細胞）の排除をもたらす、免疫応答系である。異なる個体は、例えば目的の病原体若しくはそれに構造的に関連する病原体についての感染履歴若しくはワクチン接種歴、又は詳細が未解明である生物学的若しくは環境的な個体差に応じて、異なる細胞性免疫応答能力を有し得る。
- [0005] 細胞性免疫応答活性の測定は、被験者に由来する末梢血単核細胞（PBMC）を含む試料に、病原体等由来の抗原を添加することでPBMCに含まれるT細胞等の白血球を刺激した後、刺激された白血球によって産生されるサイトカイン（例えばインターフェロン γ ）などのエフェクター分子を検出するか、又は、エフェクター分子を発現している白血球を検出することで行うことができる。SARS r-CoVに対する被験者の細胞性免疫応答の活性を測定する方法としては、ELISpot技術を用いる方法（非特許文献1）、ELISA法を用いる方法（非特許文献2）、フローサイトメトリー技術を用いる方法（非特許文献3）が報告されている。これらはいずれも、特異的抗体を用いてタンパク質産物としてのエフェクター分子を検出するものである。
- [0006] SARS-CoV-2感染症（COVID-19）のようなSARS r-CoV感染症の患者は、人によって、一般的な風邪に似た症状である軽症から、重症（肺炎に起因する重度の呼吸障害を含み、致死の可能性も含む）に至るまで、幅のある症状を示し得る。しかし、無症状である感染者、またそれゆえ感染の事実について無自覚のままとなる感染者も多い。
- [0007] SARS r-CoVのワクチン接種は、当然ながら感染の予防を目的として提供されるものである。しかしながらワクチン接種したにも関わらず接種後に感染することがあり、これをブレイクスルー感染という。しかし、ワクチン接種後は、仮にブレイクスルー感染になった場合にも、ワクチン非接種の場合の感染と比べてその症状がより穏やかで済む可能性がある。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1: International Journal of Infectious Diseases, Vol 1

13. pp 155-162, 2021

非特許文献2: International Journal of Infectious Diseases, Vol 1

06. pp 338-347, 2021

非特許文献3: medRxiv 2020 Nov 3;2020.10.30.20223099.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] SARS r-C o Vのワクチン接種を受けた人にとって、その後にSARS r-C o V感染症の不快な症状で苦しむ可能性がどれほどあるかを知ることに関心事項である。また、無症状及び無自覚の感染者が自己隔離せず通常の社会生活を送り続けることにより感染が拡大するという問題がある。従って、ブレイクスルー感染の際の症状の有無を予測しておくことには意義がある。しかしながら従来、SARS r-C o Vのブレイクスルー感染における症状を感染前に予測するための具体的な手段が知られていなかった。

課題を解決するための手段

[0010] 本開示は、SARS r-C o Vのブレイクスルー感染における症状を予測するためのデータを収集する方法を提供する。本開示は以下の実施形態を含む。

[1]

SARS r-C o Vのワクチン接種を受けた被験者において、前記ワクチン接種後のブレイクスルー感染における症状を予測するためのデータを収集する方法であって、

(1) 前記被験者から採取された、白血球を含む検体を準備する工程と、

(2) 前記検体に複数のペプチドを添加し、水性媒体中で、前記検体と前記複数のペプチドとをインキュベートする工程と、

(3) 工程(2)の後、前記白血球における、インターフェロン γ (IFN γ)、CXCモチーフケモカインリガンド9 (CXCL9)、CXCモチーフケモカインリガンド10 (CXCL10) 及びインターロイキン-1A (IL-1A) から成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定する工程とを含み、

前記複数のペプチドは、SARS-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列の複数の断片に相当する複数のペプチドであり、かつ、前記スパイクタンパク質のアミノ酸配列全長の40%以上をカバーしており、

前記T細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルが、予測参照レベル以上である場合には、前記被験者はブレイクスルー感染した場合に無症状となると予測され、予測参照レベル未満である場合には、前記被験者はブレイクスルー感染した場合に症状が出ると予測される、方法。

[2]

前記複数のペプチドが、前記スパイクタンパク質のアミノ酸配列の15～20アミノ酸長の断片に相当する複数のペプチドである、[1]に記載の方法。

[3]

前記複数のペプチドは、前記スパイクタンパク質のアミノ酸配列に沿って隣接するペプチドが互いに10～14アミノ酸オーバーラップしている、[1]又は[2]に記載の方法。

[4]

前記検体は全血である、[1]～[3]のいずれか一項に記載の方法。

[5]

前記工程(3)において、前記T細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定する方法が、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法である、[1]～[4]のいずれか一項に記載の方法。

[6]

[1] ～ [5] のいずれか一項に記載の方法を実行するためのキットであって、

(1) 前記複数のペプチドを含むペプチドセット；

(2) $IFN\gamma$ 、 $CXCL9$ 、 $CXCL10$ 及び $IL-1A$ から成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定するための測定試薬；及び

(3) 測定される前記T細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルが、予測参照レベル以上である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に無症状となると予測され、予測参照レベル未満である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に症状が出ると予測されることを説明する、説明書を含む、キット。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、検体を刺激するために用いられるペプチドプールのスパイクタンパク質カバー率と、インターフェロン γ mRNA発現レベル測定による細胞性免疫応答活性アッセイの感度との関係を示す。

[図2]図2は、本開示の実施形態の方法に従い、異なる症状のブレイクスルー感染者の検体を異なるペプチドプールで刺激して測定した、インターフェロン γ mRNA発現レベルの比較(a, c)、及びその測定結果に基づくROC曲線分析(b, d)を示す。

[図3]図3は、異なる症状のブレイクスルー感染者の検体を異なるペプチドプールで刺激して、従来型の細胞性免疫アッセイであるELISpotにより測定した、インターフェロン γ タンパク質分泌量の比較(a, c)、及びその測定結果に基づくROC曲線分析(b, d)を示す。

[図4]図4は、異なる症状のブレイクスルー感染者の検体において抗スパイクタンパク質抗体価を測定して比較した結果(a)、及びその測定結果に基づくROC曲線分析(b)を示す。

規則 91,
14.06.2024

[図5]図5は、本開示の実施形態の方法に従い、異なる症状のブレイクスルー感染者の検体を、SARS-CoV-2標準株のスパイクタンパク質に対応するペプチドプール（Peptide Pool）で刺激して測定した、インターフェロン γ のmRNA発現レベルの比較（a）、CXCR4モチーフケモカインリガンド9のmRNA発現レベルの比較（c）、CXCR4モチーフケモカインリガンド10のmRNA発現レベルの比較（e）及びインターロイキン-1AのmRNA発現レベルの比較（g）、並びに、それぞれの測定結果に基づくROC曲線分析（インターフェロン γ （b）、CXCR4モチーフケモカインリガンド9（d）、CXCR4モチーフケモカインリガンド10（f）、インターロイキン-1A（h））。を示す。

[図6]図6は、本開示の実施形態の方法に従い、異なる症状のブレイクスルー感染者の検体を、SARS-CoV-2オミクロン株のスパイクタンパク質に対応するペプチドプール（Peptide Pool）で刺激して測定した、インターフェロン γ のmRNA発現レベルの比較（a）及びCXCR4モチーフケモカインリガンド9のmRNA発現レベルの比較（c）、並びに、それぞれの測定結果に基づくROC曲線分析（インターフェロン γ （b）、CXCR4モチーフケモカインリガンド9（d））。を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 一側面において本開示は、SARS-CoVのワクチン接種を受けた被験者において、該ワクチン接種後のブレイクスルー感染における症状を予測するためのデータを収集する方法を提供する。本明細書において、SARS-CoVのワクチン接種を受けた被験者を単に「ワクチン接種者」ともいう。

[0013] SARS-CoVの構造のうち、スパイク（S）タンパク質は、ヒト細胞への感染の開始を担うタンパク質であり、SARS-CoVのワクチンは典型的にはスパイクタンパク質に対する免疫応答を誘導するものである。従ってSARS-CoVのワクチンは、通常、スパイクタンパク質若しくはその一部又はそれらをコードする遺伝子物質（例えばmRNA）を含む。スパイクタンパク質に対する免疫応答を誘導できる限り、ワクチン中のこれらのタンパク

質若しくはその一部又はそのコード遺伝子物質の配列は、本物のウイルスと比べて改変が加えられたものが含まれ得ることが当業者に理解される。

[0014] 本実施形態におけるワクチン接種者は、ワクチン接種を1回、2回、3回、又は4回以上受けた接種者であり得る。検体は、いずれかの回のワクチン接種後例えば3年以内、2年以内、1年以内、6カ月以内、または3カ月以内に採取され得る。

[0015] SARS r-CoVは、例えばSARS-CoV-1であり得る。SARS-CoV-1感染症は、2004年より後には実質的に報告されていないが、再発生の可能性は排除できず、また、過去に凍結保存された検体を使用して本開示の方法を行って何らかの検証を行う実施形態も企図され得る。SARS r-CoVは、例えばSARS-CoV-2であってもよく、その場合のSARS r-CoV感染症はCOVID-19と呼ばれ得る。

[0016] 本実施形態の方法は、

(1) 前記被験者から採取された、白血球を含む検体を準備する工程と、

(2) 前記検体に複数のペプチドを添加し、水性媒体中で、前記検体と前記複数のペプチドとをインキュベートする工程と、

(3) 工程(2)の後、前記白血球における、インターフェロン γ （以下、IFN γ 又はIFNGという）、CXCモチーフケモカインリガンド9（以下、CXCL9という）、CXCモチーフケモカインリガンド10（以下、CXCL10という）及びインターロイキン-1A（以下、IL-1Aという）から成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定する工程と

を含む。すなわち本方法は、被験者に由来する検体を使用して*ex vivo*で実施されるものである。本開示における被験者は哺乳類動物であり、好ましくは霊長目であり、特に好ましくはヒトである。上記マーカー（IFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1A）はヒトにおける名称で表示しているが、動物種によっては、又は文脈によっては、同じマーカーが別の名称で呼ばれることもあり得る。

- [0017] 白血球を含む検体は、例えば血液から分離された末梢血単核細胞（P B M C）、あるいはさらに精製された白血球そのものであってもよいが、本実施形態では有利なことに、P B M Cを分離する手間と時間を排除して、全血を検体として利用することができる。当業者に理解されるように、全血である検体は、ヘパリン等の抗凝固剤を含み得る。「被験者から採取された」検体とは、被験者に由来する検体を意味し、例えば抗凝固処理やP B M C分離等を経た後のものも「被験者から採取された」検体である。被験者から採取された全血等の検体は、通常、採血管に保存される。採血管としては、例えばE D T A採血管、及びヘパリンナトリウム採血管が挙げられる。E D T Aはリンパ球の細胞活性に影響を及ぼす可能性があるため、ヘパリンナトリウム採血管がより好ましい。
- [0018] 工程（１）の「検体を準備する工程」とは、工程（２）以降の実施のために使用可能な検体を取得又は調製する段階を表す。被験者の身体から検体を直接採取（例えば採血）する事前工程はこの工程（１）には含まれず、その事前工程を行った人物が、本実施形態の方法の実施者であったか否かは問わない。
- [0019] 本開示において、白血球としては、例えばリンパ球、好中球、好酸球、好塩基球、及び単球が挙げられる。単球はマクロファージ又は樹状細胞へ分化するため、マクロファージ及び樹状細胞は白血球に属する。リンパ球としては、例えばT細胞、B細胞、及びナチュラルキラー細胞が挙げられる。また、本開示の白血球を含む検体、例えば全血、P B M C等は、B細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞を含み得る。また、検体中のT細胞には、C D 4 ⁺ T細胞及びC D 8 ⁺ T細胞が含まれ得る。
- [0020] 本開示において、「複数のペプチド」とは、互いにアミノ酸配列が異なるという意味において複数種類のペプチドが含まれている、8～30アミノ酸長のペプチドの集団を表す。例えば2つのペプチドが同じ配列を部分的に共有していても、第一のペプチドにはない1つ以上のアミノ酸残基が第二のペプチドの末端に追加されていたら、これら2つのペプチドは「互いにアミノ酸配列が異なる」と言える。本実施形態で使用される複数のペプチドは、S A R S r - C

○Vスパイクタンパク質のアミノ酸配列の複数の断片に相当する複数のペプチドである。すなわち、当該複数のペプチドに含まれるペプチドのそれぞれが、SARS r-CoVウイルスを構成するスパイクタンパク質のアミノ酸配列の部分配列からなるペプチドである。これらのペプチドがスパイクタンパク質から断片化処理して得られる断片であることは要せず、実際、本実施形態のペプチドは典型的には化学合成されたペプチドであり得る。

[0021] 本実施形態で使用される複数のペプチドは、ペプチドの集団として、SARS r-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列全長の40%以上をカバーするものである。このことが、後述するmRNA発現レベル測定を通じたブレイクスルー感染症状予測の信頼性をより高め得る。複数のペプチドが「SARS r-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列全長の40%以上をカバーする」とは、当該複数のペプチド中の全ペプチドをスパイクタンパク質の全長アミノ酸配列上の対応位置に宛てがって並べていった場合に、全長アミノ酸配列中にあるアミノ酸残基位置（SARS-CoV2 Wuhan-Hu-1株では全部で1273残基）の40%以上が覆われることを意味する。本開示では、複数のペプチドに含まれる全ペプチドを、対応する目的タンパク質（例えばSARS r-CoVスパイクタンパク質）の全長アミノ酸配列の対応位置に宛てがって並べたときに、その全長アミノ酸配列の全アミノ酸残基のうちのどれだけがペプチドによってカバーされるかを表す百分率を「カバー率」と呼ぶ。従来、アミノ酸配列全長の40%に満たないカバー率のペプチド（例えば既知のMHCクラスI又はII拘束性ペプチドのセットや、ペプチドベースのワクチン又はワクチン候補等）を用いてリンパ球を刺激してT細胞活性化を測定することも行われてきたが、mRNAレベルに基づくブレイクスルー感染症状予測の系においては、このカバー率は好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上又は80%以上でもあり得、90%以上とすると極めて信頼性の高い予測が可能となる。カバー率を100%とすることは特に好ましい。

- [0022] SARS r-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列全長の40%以上をカバーする複数のペプチドは、SARS r-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列の15～20アミノ酸長の断片に相当する複数のペプチドであることが好ましい。換言すると、本実施形態における「複数のペプチド」中のペプチドは15～20アミノ酸長であることが好ましく、より好ましくは15～18アミノ酸長、さらに好ましくは15アミノ酸長である。SARS r-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列全長の40%以上をカバーしており上記アミノ酸長範囲内である複数のペプチドが、検体に添加され又は検体とインキュベートされる際に、上記アミノ酸長の範囲外の長さの追加的ペプチドが共存していてもよい。
- [0023] 抗原提示細胞表面に発現しているMHC分子は非常に多様性に富んでおり、結合できるペプチドの配列及び長さは個体間での差が非常に大きい。そのため、MHC分子上に直接結合できるClass I又はClass IIペプチドを含む14アミノ酸以下のペプチド鎖を使用するよりも、15アミノ酸以上のペプチド鎖を使用することが好ましい。15アミノ酸以上のペプチド鎖を、検体中に含まれる抗原提示細胞と混ぜることにより、抗原提示細胞に取り込まれ、細胞内でClass I又はClass IIペプチドまで分解され、抗原として細胞表面に提示され、同じ検体内に含まれる抗原特異的なT細胞にて認識可能な状態になると考えられる。
- [0024] 好ましくは、当該複数のペプチドは、SARS r-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列上のそれぞれの対応位置に並べられた場合に、スパイクタンパク質のアミノ酸配列に沿って隣接するペプチドが互いに10～14アミノ酸オーバーラップする。これはすなわち、SARS r-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列上で、 n 番目のペプチドのN末端残基が、隣接する $n+1$ 番目のペプチドのN末端残基よりも上流に位置するが、 $n+1$ 番目のペプチドのN末端残基以降の10～14残基の配列は両ペプチドに共通することを意味し得る。このオーバーラップは例えば10～11アミノ酸であってもよく、11アミノ酸のオーバーラップは特に好適な一例である。あるペプチドを基準とし

て、それに「隣接するペプチド」とは、その基準となるペプチドのC末端側と配列上重なるN末端側を有するペプチドのうち直近のもの（すなわち最短のN末端－N末端距離を与えるもの）、又は、その基準となるペプチドのN末端側と配列上重なるC末端側を有するペプチドのうち直近のもの（すなわち最短のC末端－C末端距離を与えるもの）を意味し得る。SARS r-COVスパイクタンパク質のアミノ酸配列全長の40%以上をカバーしており上記オーバーラップ条件を満たす複数のペプチドが、検体に添加され又は検体とインキュベートされる際に、上記オーバーラップ条件を満たさない追加的ペプチドが共存していてもよい。

[0025] 「検体に複数のペプチドを添加する」とは、検体とその複数のペプチドとを組み合わせることを意味し、「複数のペプチドに検体を添加する」と同義である。検体とインキュベートされたこれらのペプチドは、検体中の抗原提示細胞に取り込まれ、場合によってはさらに短く分解され、抗原としてMHCクラスⅠ又はクラスⅡ分子と共に細胞表面に提示され、それがT細胞によって認識され得る。このように、当該複数のペプチドは、CD4⁺リンパ球によって認識されるアミノ酸配列を含むペプチド、及びCD8⁺リンパ球によって認識されるアミノ酸配列を含むペプチドを含み得る。CD4⁺リンパ球によって認識されるアミノ酸配列を含むペプチド又はCD8⁺リンパ球によって認識されるアミノ酸配列を含むペプチドを同定する方法は当業者に知られており、例えば細胞内サイトカイン染色法（ICS：intracellular cytokine staining）によって容易に達成され得る。例えば、刺激されたT細胞によって発現されるサイトカインタンパク質は公知であるから、Brefeldin-Aの存在下でペプチドと検体のインキュベーションを行って、フローサイトメトリーによりCD4又はCD8とそのサイトカインとについて共染色されるリンパ球の存在を確認すれば、ペプチドにCD4⁺又はCD8⁺リンパ球によって認識されるアミノ酸配列が含まれていたことが確認される。

[0026] このように、生細胞によるペプチドの取り込み、抗原提示、及び抗原認識を*in vitro*あるいは*ex vivo*の水性媒体中で行えること自体は本

技術分野で確立されており、当業者はその目的に適した水性媒体を通常の知識に基づいて選択又は調製することができる。水性媒体は例えば細胞培養用の液体培地であり得る。全血は典型的に水性媒体中に維持されるが、その水性媒体を本実施形態の方法における水性媒体として使用してもよい。

[0027] 本実施形態の方法の工程（２）では、水性媒体中に添加された、上記条件を満たす複数のペプチドと検体とがインキュベートされる。インキュベーションは、 30°C ～ 40°C の範囲の温度で実施され得、好ましくは $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で実施され得る。インキュベートする時間は、例えば１時間～８時間までの範囲内とし得る。インキュベーションは、１時間～２時間、２時間～３時間、３時間～４時間、４時間～５時間、５時間～６時間、６時間～７時間、６時間～８時間、１時間～４時間、又は２時間～６時間であってもよく、好ましくは２～４時間である。インキュベーションの際の、検体と複数のペプチドとを含む混合物において、当該複数のペプチド全体としての濃度は、例えば $0.1\sim 20\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.2\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は $0.5\sim 5\mu\text{g}/\text{mL}$ であり得る。このインキュベーションのあいだに、生細胞によるペプチドの取り込み、抗原提示、及び抗原認識が起こることが理解され、さらに、ブレイクスルー感染における症状と相関し得る mRNA レベル差が起こることが見出された。T 細胞エフェクター分子の発現上昇には転写後調節も寄与し得るため（Immunology, 2021;164:57-72）、mRNA レベルで信頼性の高い細胞性免疫活性の判定を行えること自体も必ずしも自明なことではなく、また、ブレイクスルー感染の症状予測に関し特定のペプチド条件でそのような有意な mRNA レベル差を起こさせることができることは全く知られていなかった。

[0028] ELISpot のような従来型の細胞性免疫測定法、又はスパイクタンパク質に対する抗体若しくは偽ウイルス（pseudovirus）中和抗体を検出する液性免疫測定法では、ワクチン接種者の検体においてその後のブレイクスルー感染における症状の有無を有意に予測し分けることができなかった。これらの異なるアッセイは、互いに免疫活性の異なる側面を捉えるスナップショットであると考えられる。液性免疫が細胞性免疫とは異質であることはいうまでもない

が、細胞性免疫のなかにも著しい複雑さが存在する。例えば、スパイクタンパク質ペプチドでの刺激に応答して、直ちにIFN γ 、CXCL9、CXCL10、IL-1A等の分泌体勢に入ることができる細胞の能力と、IFN γ 、CXCL9、CXCL10、IL-1A等の生産体勢に入ることができる細胞の能力とは、非同一であり得る。特定の態様のペプチド刺激及びmRNA発現レベル測定を組み合わせる本実施形態の方法は、ブレイクスルー感染における症状の有無に相関する特定の細胞性免疫系の状態を特に正確に検知することができる可能性がある。

[0029] 本実施形態の方法は、上述した工程（2）の後、かつ工程（3）の前に、検体を凍結する工程（2a）、及び工程（2a）で凍結された検体を融解する工程（2b）をさらに含み得る。これらの工程は、ペプチド刺激後の検体の安定化、長期保管、輸送等のために有利となる。工程（1）が、ペプチド刺激前の検体を凍結し、融解することを含むことも可能である。

[0030] IFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1Aは、公知のT細胞機能関連マーカーである。これらのマーカーは細胞性免疫の一部として、刺激された白血球において発現が誘導され、細胞性免疫応答活性の指標となる。これらマーカーのmRNAレベルを測定できる技術の非限定的な例としては、ノザンブロットやマイクロアレイ等のハイブリダイゼーションに基づく方法、RNAaseプロテクション法、RNA-Seq（配列決定）法等が挙げられるが、迅速性、簡便性、信頼性等の観点から逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法が好ましく、特にリアルタイムRT-PCR法は優れた定量性を有するため好ましい。リアルタイムRT-PCR法としては、例えばSYBR（登録商標）Green法、及びTaqMan（登録商標）法が挙げられる。SARS-CoV-2の蔓延に伴って、感染検査のためにPCR装置の普及が一層進んでいるため、RT-PCR法により本実施形態の方法を実施できることは有利である。同様に、臨床現場などで簡便かつ迅速に使用できる、定温核酸増幅法のLoop mediated isothermal amplification（LAMP）法、Helicase dependent a

mplification法、Rolling circle amplification法、Recombinase polymerase amplification法、Invader assay法、なども好ましい。さらに、より定量性の高い、Digital droplet PCR法やDigital droplet LAMP法なども好ましい。

[0031] 工程（３）の一つの実施形態では、必要に応じて、赤血球、及び白血球以外の血液成分が、全血サンプルから除去されてよい。他の実施形態では、全血は、特定のいずれの細胞型の除去又は単離をも行わずに用いられる。いくつかの実施形態では、全血から、一般的な市販の磁気ビーズ、遠心カラムなどを利用したTotal RNA抽出法にてRNAが抽出された後、上記マーカーが測定されてよい。好ましい実施形態では、mRNAの単離及び増幅のためのデバイスの使用を通じて白血球が単離される。このデバイスの実施形態は、各々その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,745,180号、同第7,968,288号、同第7,939,300号、同第7,981,608号、及び同第8,076,105号により詳細に記載されている。

[0032] 工程（３）の一実施形態は、以下の（a）～（d）を含むRT-PCR法であり得る。

（a）フィルターメンブレンを通す濾過により全血から赤血球と非白血球血液成分とを除去して、フィルターメンブレン上に白血球を得ること；

（b）白血球を細胞溶解して、mRNAを含有する溶解物を生成させること；

（c）溶解物をオリゴ（dT）固定化基材（例えばオリゴ（dT）固定化プレート）に移して、オリゴ（dT）上にmRNAを捕捉すること；及び

（d）mRNAレベルをRT-PCR法で測定すること。

[0033] 工程（a）の一実施形態は、工程（２）で得られたインキュベーション後の検体を含むサンプルを、フィルタープレートのサンプル導入ウェルに添加し、インキュベートし、遠心力を利用してフィルタレーションをする工程である。

その結果、フィルターメンブレン上に白血球を捕捉することができる。白血球捕捉フィルターであるフィルターメンブレンの好適な一例は、ポリブチレンテレフタレート（PBT）繊維膜である。インキュベーションは、20℃～40℃の範囲の温度で実施され得る。インキュベートの時間は、1秒間から1時間までで様々であってよい。インキュベーションは、1秒間～1分間、1分間～1時間、1分間～20分間、2分間～20分間、5分間～15分間又は7分間～12分間であってよい。

[0034] 工程（b）は、細胞溶解バッファーを用いて細胞を溶解する工程であり得る。細胞を溶解して細胞内RNAを放出させることができる細胞溶解バッファーは当業者に知られている。

工程（c）は、工程（b）で得られた溶解物を、オリゴ（dT）固定化基材に移して、例えば1時間、1時間～3時間、1時間～24時間、又は16時間～24時間インキュベートして、オリゴ（dT）上にmRNAを捕捉する工程である。

工程（d）は、

（i）（c）でオリゴ（dT）上の捕捉を介して単離されたmRNAに、プライマー及び逆転写酵素を添加して、相補DNA（cDNA）を作り出すこと；並びに

（ii）cDNAを、IFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1Aから成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーの核酸配列に特異的であるセンス及びアンチセンスプライマーと、DNAポリメラーゼとに接触させて、増幅されたDNAを作り出すこと、を含む方法によって実施され得る。これらの文脈において「プライマー」という用語はオリゴヌクレオチドプライマーを表す。これらの工程によって、上記T細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定することができる。

[0035] PCR反応の完了後、又はPCR反応の進行中に、T細胞機能関連マーカーのmRNA（PCR増幅cDNAの検出量で表される）が定量される。特定

の実施形態では、定量は、T細胞機能関連マーカーをコードするmRNAの量を参照値と比較することによって算出される。いくつかの実施形態では、参照値は、ハウスキーピング遺伝子を例とする、刺激剤（例えば抗原ペプチド）によって発現が誘導も抑制もされない遺伝子の発現レベルである。特定のそのような実施形態では、 β -アクチンの発現レベルが参照値として用いられる。本技術分野にて公知である数多くのその他のハウスキーピング遺伝子のいずれかも、参照値として用いられてよい。一つの実施形態として、リアルタイムRT-PCR法で得られるサイクル閾値（cycle threshold: Ct値）に基づいて、mRNAの発現レベルを評価することができる。当業者に一般的に知られているように、関心対象のマーカーのCt値をハウスキーピング遺伝子のCt値にてノーマライズすることで、検体間でのマーカーの発現量を容易に比較することができる。リアルタイムRT-PCR法では、測定対象となるマーカー遺伝子とハウスキーピング遺伝子との検出量を測定し、ハウスキーピング遺伝子のCt値を用いて、マーカー遺伝子をノーマライズし、ノーマライズされたCt値を遺伝子発現量（gene expression level）へ換算することで、刺激により発現変化（例えば増加）したマーカー遺伝子mRNA量を概算することができる。例えば、

$$\text{Gene expression level} = 2^{(-Ct \text{ value} [\text{marker}] + Ct \text{ value} [\text{housekeeping gene}])},$$

$$\log_2 (\text{Gene expression level}) = -Ct \text{ value} [\text{marker}] + Ct \text{ value} [\text{housekeeping gene}]$$

などの式を用いることができる。

- [0036] 本開示の方法の実施形態において、IFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1Aから成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーの、刺激剤にて誘導された発現レベルを、非誘導（溶媒コントロール）サンプルからの同じT細胞機能関連マーカーの発現レベルと比較することで、刺激によるT細胞機能関連マーカーの発現レベル変化を評価することができる。ひと

つの実施形態として、当業者には理解されるように、誘導されたマーカーの遺伝子発現量を非誘導されたマーカーの遺伝子発現量と比較した $Fold\ increase$ ($F. I.$) 値又はそれから派生した値にて誘導の度合いを概算することができる。例えば、

$$\log_2 F. I. = \text{Gene expression level} [\text{stimulated sample}] \div \text{Gene expression level} [\text{solvent control}],$$
$$\log_2 F. I. = -Ct [\text{stimulated sample}] + Ct [\text{solvent control}]$$

などの式を用いることができる。つまり、概算した mRNA 発現量を、未刺激サンプルの mRNA 発現量と比較することで、 $\log_2 F. I.$ としてペプチド抗原刺激特異的な mRNA 発現量を算出することができる。 $\log_2 F. I.$ は、刺激サンプルの mRNA 発現量が、未刺激サンプルの mRNA 発現量の何倍であるかを評価する指標であり、例えば、 $\log_2 F. I.$ が 0 のときは、未刺激サンプルの mRNA 発現量と刺激サンプルの mRNA 発現量と同じであることを意味し、 $\log_2 F. I.$ が 1 のときは、刺激サンプルの mRNA 発現量が、未刺激サンプルの mRNA 発現量の 2 倍であることを意味する。従って、 $\log_2 F. I.$ が大きいほど、ペプチド刺激で誘導された mRNA 発現量が増加したことを意味する。

[0037] 本実施形態の方法では、 $IFN\gamma$ 、 $CXCL9$ 、 $CXCL10$ 及び $IL-1A$ から成る群より選択されるいずれかの T 細胞機能関連マーカーの mRNA の発現レベル（以下、単に「mRNA 発現レベル」ともいう）が、予測参照レベル以上である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に無症状となると予測され、予測参照レベル未満である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に症状が出ると予測される。ここでいう症状とは、感染者が自覚できる症状である。感染者が自覚できる SARS-CoV 感染の症状には、発熱、咳、息切れ、悪寒、悪寒を伴う震え、筋肉痛、頭痛、咽頭痛、味覚障害、嗅覚障害、肺炎症状、及び呼吸困難が含まれる。

[0038] 予測参照レベルは、mRNA発現レベルを測定するアッセイの具体的な種類及び個々の実施形態で求められる予測の厳格さに応じて、実施者が適宜設定できることが理解されるべきである。例えば、予測参照レベルを高めにするれば、ブレイクスルー感染した場合に無症状となるという予測についての特異度が上がり、例えば無症状感染を特に警戒すべき被験者を見出すためのスクリーニングに、より有用となる。予測参照レベルを低めにするれば、ブレイクスルー感染した場合に無症状となるという予測についての感度が上がり、無症状感染の可能性のある被検者を見逃さず予測する能力がより高まる。

[0039] 予測参照レベルは事前に定められた値であり得る。例えば、予測参照レベルは、検体採取後のブレイクスルー感染が無症状又は有症状のいずれであったかが決定された複数のブレイクスルー感染者（本開示において参照（reference）ブレイクスルー感染者ともいう）の対応するmRNA発現レベルに基づいて事前に定められた値であり得る。少なくともそれぞれ7人以上、8人以上、10人以上、20人以上、又は50人以上の、無症状又は有症状のブレイクスルー感染者のmRNA発現測定値に基づいて定められた予測参照レベルを用いることが好ましい。ここでいう「対応するmRNA発現レベル」は、ワクチン接種後かつブレイクスルー感染前にその参照ブレイクスルー感染者から採取された検体中のmRNA発現レベルである。「対応する」とは、mRNA発現レベルを測定する検体の種類及びアッセイの種類が予測対象者の場合と共通していることを意味する。これら複数の参照ブレイクスルー感染者は、特定の国、地域、年齢範囲、性別、又はこれらのいずれかの組合せのような、共通のカテゴリーに属するブレイクスルー感染者であり得る。予測対象となるワクチン接種者と同じカテゴリーに属する複数のブレイクスルー感染者のmRNA発現レベルに基づいて予測参照レベルが定められることが好ましい。

[0040] 一実施形態では、予測参照レベルは、無症状であったことが決定された複数の参照ブレイクスルー感染者のmRNA発現レベルの中央値（又は平均値）より低く、かつ、有症状であったことが決定された複数の参照ブレイクスルー感

染者のmRNA発現レベルの測定値の中央値（又は平均値）より高い範囲の中から選択される値である。

[0041] 別の実施形態では、予測参照レベルは、これら複数の参照ブレイクスルー感染者のmRNA発現レベルについてのROC（受信者操作特性）曲線分析により得られるカットオフ値である。ROC曲線分析及びカットオフ値の決定は当業者によく知られている。すなわち、上向きの縦軸に感度（つまり真陽性率）を、縦軸の下端から右に伸びる横軸に（1－特異度）（つまり偽陽性率）をプロットし、グラフの左上隅の点（感度（sensitivity）＝1、特異度（specificity）＝1となる理想点）に対して最短距離となる点、又は、Youden Index（感度＋特異度－1）が最大になる点がカットオフ値である。SARS-r-CoVワクチン接種者について血液検体中IFN γ のmRNAの発現レベルをバイオマーカーとしてブレイクスルー感染時の症状の有無を予測し分ける場合、ROC曲線分析において少なくとも0.7以上のAUC（曲線下面積）が典型的に得られるところ、0.7以上のAUCを生じる参照ブレイクスルー感染者群に基づいて基準値が定められることが好ましく、0.8以上のAUCを生じる参照ブレイクスルー感染者群に基づいて基準値が定められることがより好ましく、0.9以上のAUCを生じる参照ブレイクスルー感染者群に基づいて基準値が定められることがさらに好ましい。

[0042] 一実施形態の方法は、被験者がブレイクスルー感染した場合に無症状となる、又はブレイクスルー感染した場合に症状が出るという予測結果を、固形媒体上に印刷すること、及び／又は、電子的表示装置に表示する工程をさらに含み得る。固形媒体は例えば紙、樹脂フィルム等であり得る。電子的表示装置は例えば液晶ディスプレイ、発光ダイオードディスプレイ、エレクトロルミネセンスディスプレイ等であり得る。

[0043] 本開示の方法のいくつかの実施形態は、以下のいずれかのキットを用いて実施することができる。従って本開示は以下のキットの実施形態も提供する。

<キット1>

SARS r-CoVのワクチン接種を受けた被験者において、該ワクチン接種後のブレイクスルー感染における症状を予測するための、又はその予測用のデータを収集するためのキットであって、

(1) 上記複数のペプチドを含むペプチドセット；

(2) IFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1Aから成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定するための測定試薬（例えば当該T細胞機能関連マーカーに特異的なプライマー等を含むRT-PCR試薬）；及び

(3) 測定される前記T細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルが、予測参照レベル以上である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に無症状となると予測され、予測参照レベル未満である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に症状が出ると予測されることを説明する、説明書

を含む、キット。

[0044] <キット2>

上記キット1と同じであるが、キット1の構成要素に加えて、さらに、

(4) 血液から白血球を単離するための試薬及び／又は器具（例えば白血球捕捉フィルターであるフィルターメンブレン）；

(5) 白血球からRNAを精製するための試薬及び／又は器具（例えば細胞溶解バッファー）；及び

(6) Total RNAからmRNAを単離するための試薬及び／又は器具（例えばオリゴ(dT)又はオリゴ(dT)固定化基材)のうちの1つ以上を含む、キット。

[0045] 方法の実施形態に関連して提供された説明（例えば複数のペプチド、試薬、細胞及び核酸ならびにそれらの単離、測定等に関すること）は、キットの実施形態にも適用することができる。

[0046] 本明細書において、「～」（「…から…まで」の意）を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含

む範囲を示し、また、その最小値及び／又は最大値を除外した範囲の開示も包含する。複数の数値範囲が記載されている場合は、或る記載された数値範囲の上限値又は下限値は、別の記載された数値範囲の上限値又は下限値と任意に組み合わせて別個の数値範囲を規定することができ、そのような別個の数値範囲も本開示に含まれる。「工程」が行われることは、明確に分離して独立した工程が行われる場合だけでなく、他の工程と明確に分離できなくてもその工程の所期の事象が達成される場合も含まれ得る。

実施例

[0047] 以下、実施例を示して本開示の実施形態をさらに詳細に説明する。しかしながら、これらの実施例は代表的な実験結果の例示に過ぎず、発明の実施形態がこれらの詳細に限定されるわけではないことが理解されるべきである。

[0048] 実施例において以下の試薬及び器具を使用した。

- ・ GenScript 社製のオーバーラップペプチドプール製品（「複数のペプチド」）である SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein (PepGen Sfとも記す)、及び SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein B. 1. 1. 529-Omicron (PepGen Soとも記す)

- ・ ジメチルスルホキシド（以下、DMSOと記す）；リン酸緩衝生理食塩水（－）（以下、PBSバッファーと記す）；リポポリサッカリド、大腸菌 O111 由来フェノール抽出品（以下、LPSと記す）；ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（以下、Tween 20と記す）（以上、富士フィルム和光純薬社製）

- ・ M-MLV Reverse Transcriptase、M-MLV (Promega 社製)

- ・ RNasin（商標）Ribonuclease Inhibitor（以下、RNasinと記す）（Promega 社製）

- ・ ベノインジェクトⅡ真空採血管ヘパリンナトリウム（以下、ヘパリン Na 採血管と記す）（テルモ社製）

・ 96 ウェル 透明 丸底 細胞培養表面処理 マイクロプレート（以下、細胞培養プレートと記す）（Corning社製）

・ MicroAmpTM Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL（以下、PCR用プレートと記す）（Applied Biosystems社製）

・ SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix（Bio-Rad社製）

[0049] [実施例1]

細胞性免疫応答活性の測定方法

（1）刺激用のペプチドプール

標準型Wuhan-Hu-1株SARS-CoV-2を構成するスパイクタンパク質のアミノ酸配列を元に作製されたオーバーラップペプチドプール製品である、PepGen Sf、及び変異型オミクロンB. 1. 1. 529株SARS-CoV-2を構成するスパイクタンパク質のアミノ酸配列を元に作製されたオーバーラップペプチドプール製品である、PepGen Soを刺激抗原として使用した。これらのペプチドプールはそれぞれ、スパイクタンパク質のアミノ酸配列の15アミノ酸長断片に相当する複数のペプチドから構成され、隣接するペプチドが互いに11アミノ酸オーバーラップして、スパイクタンパク質の全長をカバーしている（カバー率100%）。

[0050] PepGen Soには、PepGen Sfと比較して、以下のアミノ酸変異が含まれている：A67V、H69-、V70-、T95I、G142-、V143-、Y144-、Y145D、N211-、L212I、214Rと215Dの間の“EPE”挿入、G339D、S371L、S373P、S375F、K417N、N440K、G446S、S477N、T478K、E484A、Q493R、G496S、Q498R、N501Y、Y505H、T547K、D614G、H655Y、N679K、P681H、N764K、D796Y、N856K、Q954H、N969K、L981F。

[0051] （2）ペプチド刺激用プレートの準備及び保管

それぞれのペプチドプールを、抗原希釈液（20%のDMSOを含むPBSバッファー）中に20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように溶解した。各ペプチドプール溶液を5 μL ずつ、細胞培養プレートの異なるウェルに分注した。また、ペプチドプール溶液の他、陰性コントロールとして上記抗原希釈液単独を、及び、免疫細胞の刺激を確認するための陽性コントロールとして20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のLPSを含む抗原希釈液を調製し、それぞれ5 μL ずつ細胞培養プレートの異なるウェルに分注した。これらの溶液が分注された細胞培養プレート（以下、ペプチド刺激用プレートと記す）を、 -80°C のフリーザーで凍結し保管した。

[0052] （3）全血のペプチド刺激

凍結保管していたペプチド刺激用プレートを 25°C で保持し、ペプチドプール溶液を融解した。ヘパリンNa採血管中に採取された、採血後24時間以内の全血を、ペプチド刺激用プレートの各ウェルに120 μL ずつ添加し、攪拌し混合した。その後、 37°C で4時間インキュベートすることにより、全血に含まれる白血球の刺激を行った。刺激後の全血サンプルを -80°C で凍結し保管した。

[0053] （4）全血に含まれる白血球の捕捉

（3）で凍結したペプチド刺激用プレートを、 37°C で15分間保持し、全血サンプルを融解した。ポリブチレンテレフタレート繊維膜のフィルターを各ウェルに有するマルチウェルフィルタープレートのウェルに、フィルター洗浄液（0.05% Tween 20を含むPBSバッファー）を150 μL ずつ添加し、2500 g、 4°C で1分間遠心分離した。その後、上記全血サンプルをウェルに100 μL ずつ添加し、 4°C で10分間静置した後、2500 g、 4°C で2分間遠心分離を行い、フィルター上に白血球を捕捉した。なお、この実施例の文脈では、「遠心分離」とは、遠心分離機でプレートを回転させてプレートの底方向に遠心力を掛けることを意味する。

[0054] （5）mRNAの溶出及び捕捉

細胞溶解バッファーを、上記フィルタープレートの各ウェルのフィルター上に60 μ Lずつ添加し、37℃で10分間インキュベートし、フィルター上の白血球を溶解した。オリゴ(dT)が各ウェルに固定化されている別のマルチウェルプレート(以下、mRNA捕捉用プレートという)を、上記フィルタープレートの下に配置して両プレートのウェルを上下に重ならせ、2500g、4℃で5分間遠心分離した。フィルタープレートを取り外し、細胞溶解液をウェル中に受け入れたmRNA捕捉用プレートを4℃で1~24時間インキュベートした。インキュベーション後、洗浄バッファーを用いて各ウェルを洗浄し、細胞溶解液中に含まれていたオリゴ(dT)非結合性物質を取り除いた。

[0055] (6) cDNAの合成

逆転写酵素を含む逆転写バッファーを、mRNA捕捉用プレートの各ウェルに30 μ Lずつ添加し、37℃で2時間インキュベートした。この操作により、mRNA捕捉用プレートに捕捉されていたポリAテール化mRNAの相補DNA(cDNA)が合成された。

[0056] (7) qPCR

SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermixに、各遺伝子(アクチンベータ: ACTB、インターフェロンガンマ: IFNG、CXCL9、CXCL10、IL-1A)用のプライマー対(表1に配列を示す)を混合し、PCR用プレートの各ウェルに6 μ Lずつ分注した。上記(6)で得られたcDNA溶液を4 μ Lずつウェルに添加し、7500 FastリアルタイムPCR(ThermoFisher Scientific社製)を用いて、当該システム取扱説明書に従い、下記のサイクルでリアルタイムPCRを行った。

Stage 1: 95℃ 10:00,

Stage 2: 40 cycle of 95℃ 00:30 and 65℃ 1:00,

Stage 3: Melting curve

[0057] [表1]

Species	Gene	Sense primer (5' to 3')	Anti sense primer (5' to 3')
Human	ACTB	TTTTCCTGGCAGCCAGCACAAT	TTTTCGCCGATCCACACGGAGTACT
Human	IFNG	GGAGACCATCAAGGAAGACATGA	GCTTTGCGTTGGACATTCAA
Human	CXCL9	CCACCTACAATCCTTGAAAGACCTT	CAGTGTAGCAATGATTTCAATTTTCTC
Human	CXCL10	TCCACGTGTTGAGATCATTGC	TCTTGATGGCCTTCGATTCTG
Human	IL_1A	AATGACGCCCTCAATCAAAG	TGGGTATCTCAGGCATCTCC

ここで、ACTBのセンス（Sense）プライマー配列は配列番号1、ACTBのアンチセンス（Antisense）プライマー配列は配列番号2、IFNGのセンスプライマー配列は配列番号3、IFNGのアンチセンスプライマー配列は配列番号4、CXCL9のセンスプライマー配列は配列番号5、CXCL9のアンチセンスプライマー配列は配列番号6、CXCL10のセンスプライマー配列は配列番号7、CXCL10のアンチセンスプライマー配列は配列番号8、IL-1Aのセンスプライマー配列は配列番号9、IL-1Aのアンチセンスプライマー配列は配列番号10である。

[0058] (8) 測定結果の解析方法

リアルタイムPCRにより得られた各遺伝子の測定値は、反応の閾値を満たすサイクル数であるCt値で表された。また、ハウスキーピング遺伝子であるACTB遺伝子のCt値を用いて、検出対象遺伝子（IFNG、CXCL9、CXCL10、IL-1A）のCt値をノーマライズし、ノーマライズされたCt値を遺伝子発現量へ換算することで、刺激により発現増加したmRNA量を概算した。すなわち、概算したmRNA発現量を、未刺激サンプルのmRNA発現量と比較することで、ペプチド刺激特異的なmRNA発現量を決定し、結果は $\log_2 F. I.$ で表現した。例えば、 $\log_2 F. I.$ が0のときは、未刺激サンプルのmRNA発現量と刺激サンプルのmRNA発現量とが同じであることを意味し、 $\log_2 F. I.$ が1のときは、刺激サンプルのmRNA発現量が、未刺激サンプルのmRNA発現量の2倍であることを意味する。従って、 $\log_2 F. I.$ が大きいほど、ペプチド刺激で誘導されたmRNA発現量が増加したことを意味する。

[0059] (9) IFN γ mRNA測定法の感度とペプチドカバー率の関係

臨床検査において、陽性検体を検査した場合に当該陽性検体が陽性と判断される割合を感度といい、感度が高いほど、陽性者を陽性として正しく判定する可能性が高い検査法であるといえることができる。臨床検査において、一般的に、感度が70%以上となることが要求される。図1は、SARS-CoV-2ワクチン接種を受け、場合によってはCOVID-19感染歴もあり、SARS-CoV-2スパイクタンパク質に対する細胞性免疫保持が従来法でも確認された個体からの、細胞性免疫応答活性が陽性である複数の検体に基づいて、本実施形態で使用されるIFN γ mRNA測定法が細胞性免疫陽性を検出する感度を調べた結果を示す。この実験では、スパイクタンパク質のカバー率が異なるペプチドプールを用いて、上述のように検体の刺激を行い、さらに上述のようにリアルタイムPCRによりIFN γ のmRNAレベルを測定した。図1に示されるように、カバー率と感度は相関しており、約40%以上のカバー率であるペプチドプールを使用することにより約70%以上の感度が得られた。

[0060] [実施例2]

ブレイクスルー感染検体の測定1 (IFN γ)

(1) ブレイクスルー感染検体の入手

COVID-19 mRNAワクチンを2回以上接種した約100人のワクチン接種者から、最後のワクチン接種の約3か月後に1回目の採血を行い、その後約3か月ごとに2回目及び3回目の採血を行った。この約9カ月の間にさらに追加のワクチン接種を受けたか否かに関わらず、この約3か月間隔3回の採血スケジュールを保った。採血にはヘパリンNa採血管を使用した。ワクチン接種後の感染すなわちブレイクスルー感染の有無は、まず、採血時の問診により、前回採血から今回採血までのあいだに新たにCOVID-19の陽性診断歴（より具体的には、PCR検査による陽性判明）があった否かを確認することにより決定した。またSARS-CoV-2への感染によりワクチン接種とは独立に血漿中に増加する抗ヌクレオカプシドタンパク質抗体の有無を

検体において確認した。前回採血から今回採血までのあいだに診断歴がなくとも、血漿中にこの抗体の存在を検出することにより、ブレイクスルー感染の事実が決定された。

[0061] 約100例のワクチン接種者のうち、2回目又は3回目の採血の際に過去約3カ月のあいだのブレイクスルー感染の事実が確認されたワクチン接種者が16例見出された。これら16例を以下の表2に示す。表2において、灰色で示された箇所は、前回の採血時から今回の採血時の間にブレイクスルー感染があったことを示している。これらの例のブレイクスルー感染において発症していた症状は、日本の厚生労働省の「新型コロナウイルス感染症 COVID-19 診療の手引き（第8.0版）」として公開された重症度分類に基づいて「軽症」と判断された。表2において、「無自覚」と表記されたブレイクスルー感染者は、無症状であったがPCR検査で感染が判明した者、又は無症状でありかつ検査もしていなかった者と推定される。

[0062] [表2]

例数16	1回目採血時		2回目採血時		3回目採血時	
	採血日	抗体価 (IU/mL)	採血日	抗体価 (IU/mL)	採血日	抗体価 (IU/mL)
ブレイクスルー感染者1	2022/2/28	5.4	2022/5/17	無自覚	2022/8/18	N/A
ブレイクスルー感染者2	2022/3/21	N/A	2022/7/24	N/A	2022/11/21	無自覚
ブレイクスルー感染者3	2022/3/20	5.4	2022/7/24	N/A	2022/11/21	無自覚
ブレイクスルー感染者4	2022/4/1	N/A	2022/7/24	N/A	2022/11/21	軽症
ブレイクスルー感染者5	2022/4/1	5.4	2022/7/27	N/A	2022/11/24	軽症
ブレイクスルー感染者6	2022/5/13	N/A	2022/10/25	軽症	2022/11/21	N/A
ブレイクスルー感染者7	2022/7/24	5.4	2022/10/25	軽症	2022/11/21	N/A
ブレイクスルー感染者8	2022/4/15	N/A	2022/8/1	N/A	2022/11/21	軽症
ブレイクスルー感染者9	2022/3/18	5.4	2022/8/1	N/A	2022/11/21	軽症
ブレイクスルー感染者10	2022/4/21	N/A	2022/7/28	無自覚	2022/10/25	N/A
ブレイクスルー感染者11	2022/4/15	N/A	2022/7/1	N/A	2022/11/4	無自覚
ブレイクスルー感染者12	2022/4/15	N/A	2022/7/15	軽症	2022/11/4	N/A
ブレイクスルー感染者13	2022/4/15	N/A	2022/7/1	N/A	2022/4/28	軽症
ブレイクスルー感染者14	2022/4/22	N/A	2022/8/24	N/A	2022/9/15	無自覚
ブレイクスルー感染者15	2022/4/22	N/A	2022/7/28	N/A	2022/11/5	無自覚
ブレイクスルー感染者16	2022/4/21	N/A	2022/7/1	N/A	2022/11/4	無自覚

*ブレイクスルー感染者6は、2回目採血の前の約4カ月のあいだにブレイクスルー感染の事実がPCR検査により確認されたが、2回目採血の時点では検体中の抗ヌクレオカプシドタンパク質抗体価（表中「抗核抗体」）が低下していたと見られた。

[0063] (2) ブレイクスルー感染前の誘導IFN γ のmRNA発現レベルと感染後の症状との関係

3回の採血のうち、ブレイクスルー感染が確認された回の直前の回で得られた検体から測定されたIFN γ のmRNA発現レベル（すなわち検体のペプチド刺激によって誘導されたIFN γ のmRNA発現レベル）と、ブレイクスルー感染後の症状との関係を解析した。実施例1の方法に従いIFN γ のmRNA発現レベルを測定した。症状発症者及び無自覚者の測定値の分布を図2a, cに示す。SARS-CoV-2標準株のスパイクタンパク質に対応するペプチドプールであるPepGen Sfで刺激された場合の検体のIFN γ mRNA発現レベル（log₂F.I.）に対しStudent-t検定を実施した結果、無自覚者（「Unnoticed」）のブレイクスルー感染前のIFN γ mRNA発現レベル（図2a左）が、症状発症者（「Mild」）のブレイクスルー感染前のIFN γ mRNA発現レベル（図2a右）に比べて高い傾向にあることが判明した（図2a；片側p値=0.036, 両側p値=0.074）。SARS-CoV-2オミクロン株のスパイクタンパク質に対応するペプチドプールであるPepGen Soを用いて検体の刺激を行った場合も、同様の結果が得られた（図2c；片側p値=0.035, 両側p値=0.071）。

[0064] さらに、ROC分析を実施した結果、PepGen Sfを検体の刺激に用いた場合のカットオフ値は2.310（感度：0.875、特異度0.625）であり、AUCは0.750（CI：0.4964-1.0000）であった（図2b）。また、PepGen Soを検体の刺激に用いた場合のカットオフ値は5.090（感度：0.571、特異度：1.000）であり、AUCは0.7679（CI：0.5047-1.0000）であった（図2d）。これらのカットオフ値は、上記方法で測定されるIFN γ のmRNAの発現レベルに基づいてブレイクスルー感染時に無症状となる可能性を予測することについてのカットオフ値であると解することができる。

[0065] （3）従来法による細胞性免疫応答活性の測定

上記（2）と同じブレイクスルー感染者の検体を用いて、細胞性免疫応答活性測定の従来法であるELISpotアッセイも行った。このELISpot

t アッセイは、刺激された細胞から分泌される I F N γ タンパク質を、プレートウェル上にコーティングされた抗体で捕捉し、I F N γ タンパク質分泌箇所（スポット）を可視化して定量化することにより、細胞性免疫応答活性を測定するものである。この場合も P e p G e n S f 及び P e p G e n S o を刺激抗原として使用した。市販キットである B D（商標）E L I S p o t R e a g e n t s（B D B i o s c i e n c e s 社製）を用い、当該製品の取扱説明書に従って、ペプチド刺激及び I F N γ タンパク質の検出を行った。陰性コントロールとして、ペプチドで刺激しないウェルを準備した。E L I S p o t 法のウェル上に生じたスポットの濃さ（スポット強度）を測定し、陰性コントロールにおけるスポット強度を、ペプチド刺激したサンプルのスポット強度から差し引いた $\Delta S p o t I n t e n s i t y$ を求めた。

[0066] P e p G e n S f で刺激した検体で E L I S p o t アッセイにより測定された細胞性免疫活性（D S p o t I n t e n s i t y）は、症状発症者と無自覚者との間で差はなく（両側 p 値 = 0.371）、症状の有無と細胞性免疫活性測定値との間に関連性は見出されず、測定された細胞性免疫活性は中央値だけを見るとむしろ症状発症者の方が高かった（図 3 a）。P e p G e n S o で刺激した検体の場合も、症状発症者と無自覚者との間で差はなく（両側 p 値 = 0.446）、症状の有無と細胞性免疫活性測定値との間に関連性は見出されなかった（図 3 c）。R O C 解析を実施したところ、P e p G e n S f を刺激に使用した場合の細胞性免疫活性のカットオフ値は 21.635（感度：0.625、特異度 0.750）となり、A U C は 0.625（C I：0.3179–0.9321）となった（図 3 b）。P e p G e n S o を刺激に使用した場合の細胞性免疫活性のカットオフ値は 46.075（感度：0.750、特異度：0.625）となり、A U C は 0.6094（C I：0.3027–0.9164）となった（図 3 d）。

[0067]（４）抗体検査によるブレイクスルー感染検体の液性免疫の測定

上記（２）と同じブレイクスルー感染者の検体を用いて、液性免疫の度合いを示す抗体検査も行った。市販キットである A I A（商標）－C L 用 S A

R S - C o V - 2 - S P - I g G 抗体測定試薬（東ソー社製）を、当該キットの取扱説明書に従って使用して、S A R S - C o V - 2 スパイクタンパク質に対する I g G の血漿レベルを測定した。抗スパイクタンパク質抗体価（I U / m L）は、症状発症者と無自覚者との間で差はなく（両側 p 値 = 0. 5 0 9）、症状の有無と測定値との間に関連性は見出されなかった（図 4 a）。R O C 解析を実施したところ、カットオフ値は 2 2. 4 5 0（感度：0. 6 2 5、特異度 0. 7 5 0）となり、A U C は 0. 5 6 2 5（C I : 0. 2 4 8 5 - 0. 8 7 6 5）となった（図 4 b）。

[0068] [実施例 3]

ブレイクスルー感染検体の測定 2（I F N γ 、C X C L 9、C X C L 1 0、I L - 1 A）

（1）ブレイクスルー感染検体

実施例 2 と同じ検体（表 2 に記載）を使用した。但し、表 2 のブレイクスルー感染者 1 の検体量が足りずに当該感染者の検体が使用できなかったため、「ブレイクスルー感染者 1」を除く 7 症例を無自覚者の検体として使用した。

[0069] （2）ブレイクスルー感染前の誘導された T 細胞機能関連マーカーの m R N A 発現レベルと感染後の症状との関係

実施例 2（2）と同様の方法で、3 回の採血のうち、ブレイクスルー感染が確認された回の直前の回で得られた検体から測定された I F N γ 、C X C L 9、C X C L 1 0 及び I L - 1 A の m R N A 発現レベル（すなわち検体のペプチド刺激によって誘導された T 細胞機能関連マーカーの m R N A 発現レベル）と、ブレイクスルー感染後の症状との関係を解析した。実施例 1 の方法に従い I F N γ 、C X C L 9、C X C L 1 0 及び I L - 1 A の m R N A 発現レベルを測定した。なお、刺激用のペプチドプールとして P e p G e n S f を用いてペプチド刺激を行った。症状発症者及び無自覚者の測定値の分布を図 5 a（I F N γ ）、図 5 c（C X C L 9）、図 5 e（C X C L 1 0）、図 5 g（I L - 1 A）に示す。S A R S - C o V - 2 標準株のスパイクタンパク質に対応す

るペプチドプールであるPepGen Sfで刺激された場合の検体のIFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1AのmRNA発現レベル(log₂ F. I.) に対しWelch's-t検定を実施した結果、無自覚者(「Unnoticed」)のブレイクスルー感染前のIFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1AのmRNA発現レベル(それぞれ図5a左、図5c左、図5e左、及び図5g左)が、症状発症者(「Mild」)のブレイクスルー感染前のIFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1A mRNA発現レベル(それぞれ図5a右、図5c右、図5e右、及び図5g右)に比べて高い傾向にあることが判明した(図5a:片側p値=0.049, 両側p値=0.098、図5c:片側p値=0.006, 両側p値=0.012、図5e:片側p値=0.046, 両側p値=0.092、図5g:片側p値=0.040, 両側p値=0.080)。

[0070] さらに、ROC分析を実施した結果を図5b(IFN γ)、図5d(CXCL9)、図5f(CXCL10)及び図5h(IL-1A)に示す。IFN γ のカットオフ値は5.822(感度:0.429、特異度1.000)となり、AUCは0.714(CI:0.4341-0.9945)となった(図5b)。CXCL9のカットオフ値は6.385(感度:0.857、特異度0.875)となり、AUCは0.857(CI:0.6098-1.0000)となった(図5d)。CXCL10のカットオフ値は6.234(感度:0.714、特異度0.875)となり、AUCは0.750(CI:0.4490-1.0000)となった(図5f)。IL-1Aのカットオフ値は4.673(感度:0.857、特異度0.625)となり、AUCは0.768(CI:0.5106-1.0000)となった(図5h)。

[0071] (3) 刺激用のペプチドプールとしてPepGen Soを用いる細胞性免疫応答活性の測定 刺激用のペプチドプールとして、SARS-CoV-2オミクロン株のスパイクタンパク質に対応するペプチドプールであるPepGen Soを用いて、実施例3(1)及び(2)と同じ方法で、ブレイクスルー感染前の誘導されたIFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1AのmR

NA発現レベルと感染後の症状との関係を解析した。IFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1AのmRNA発現レベルは、実施例1の方法に従い測定した。症状発症者及び無自覚者の測定値の分布を図6a（IFN γ ）、図6c（CXCL9）に示す。図6a及び図6cの通り、SARS-CoV-2オミクロン株のスパイクタンパク質に対応するペプチドプールであるPeptide S_oを用いて検体の刺激を行った場合も、SARS-CoV-2標準株のスパイクタンパク質に対応するペプチドプールであるPeptide S_fで刺激された場合と同様の結果が得られた（図6a：片側p値=0.036，両側p値=0.071、図6c：片側p値=0.035，両側p値=0.071）。さらに、ROC解析の結果を図6b（IFN γ ）、図6d（CXCL9）に示す。IFN γ のカットオフ値は5.090（感度：0.571、特異度1.000）となり、AUCは0.768（CI：0.5047-1.0000）となった（図6b）。CXCL9のカットオフ値は6.967（感度：0.714、特異度1.000）となり、AUCは0.821（CI：0.5406-1.0000）となった（図6d）。

[0072] 関連出願への相互参照

本願は、2023年6月8日に出願された日本国特許出願第2023-094650号、及び2023年10月19日に出願された日本国特許出願第2023-180350号の利益を主張し、これらの出願は参照によりその全体がここに組み入れられる。

請求の範囲

[請求項1]

SARS r-CoVのワクチン接種を受けた被験者において、前記ワクチン接種後のブレイクスルー感染における症状を予測するためのデータを収集する方法であって、

(1) 前記被験者から採取された、白血球を含む検体を準備する工程と、

(2) 前記検体に複数のペプチドを添加し、水性媒体中で、前記検体と前記複数のペプチドとをインキュベートする工程と、

(3) 工程(2)の後、前記白血球における、インターフェロン γ (IFN γ)、CXCモチーフケモカインリガンド9 (CXCL9)、CXCモチーフケモカインリガンド10 (CXCL10) 及びインターロイキン-1A (IL-1A) から成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定する工程と

を含み、

前記複数のペプチドは、SARS r-CoVスパイクタンパク質のアミノ酸配列の複数の断片に相当する複数のペプチドであり、かつ、前記スパイクタンパク質のアミノ酸配列全長の40%以上をカバーしており、

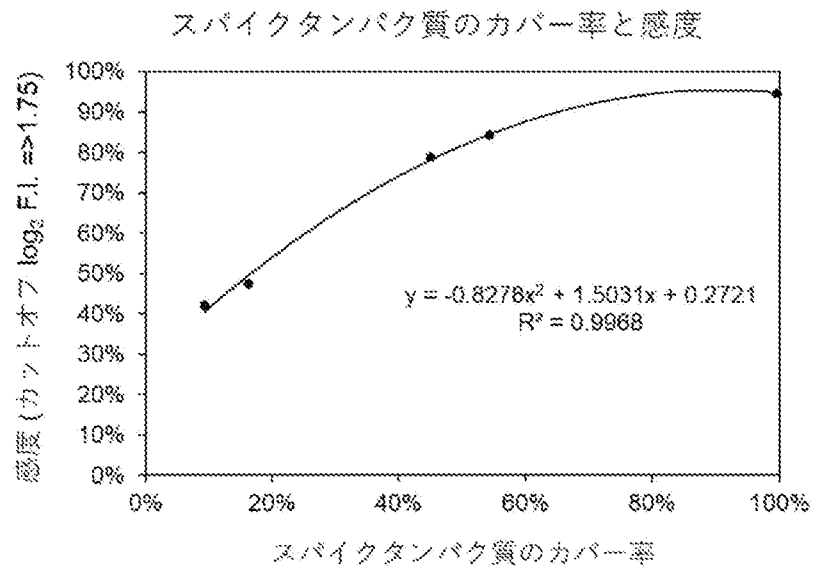
前記IFN γ のmRNAの発現レベルが、予測参照レベル以上である場合には、前記被験者はブレイクスルー感染した場合に無症状となると予測され、予測参照レベル未満である場合には、前記被験者はブレイクスルー感染した場合に症状が出ると予測される、方法。

[請求項2]

前記複数のペプチドが、前記スパイクタンパク質のアミノ酸配列の15～20アミノ酸長の断片に相当する複数のペプチドである、請求項1に記載の方法。

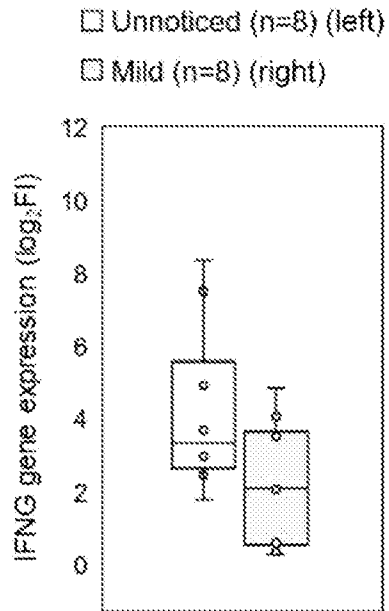
- [請求項3] 前記複数のペプチドは、前記スパイクタンパク質のアミノ酸配列に沿って隣接するペプチドが互いに10～14アミノ酸オーバーラップしている、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記検体は全血である、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程(3)において、前記T細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定する方法が、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれか一項に記載の方法を実行するためのキットであって、
- (1) 前記複数のペプチドを含むペプチドセット；
 - (2) IFN γ 、CXCL9、CXCL10及びIL-1Aから成る群より選択されるいずれかのT細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルを測定するための測定試薬；及び
 - (3) 測定される前記T細胞機能関連マーカーのmRNAの発現レベルが、予測参照レベル以上である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に無症状となると予測され、予測参照レベル未満である場合には、被験者はブレイクスルー感染した場合に症状が出ると予測されることを説明する、説明書を含む、キット。

[図 1]

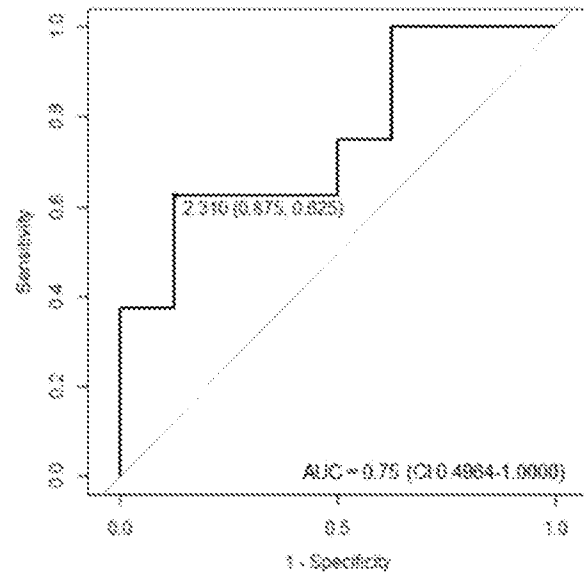


[2]

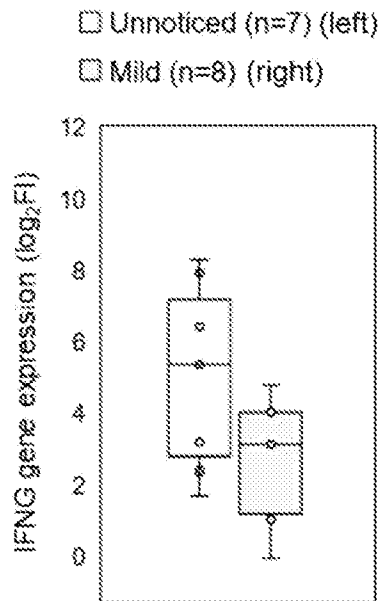
(a)



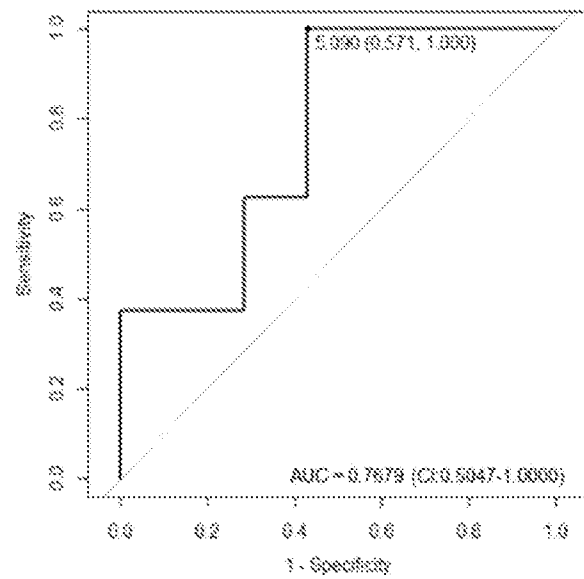
(b)



(c)



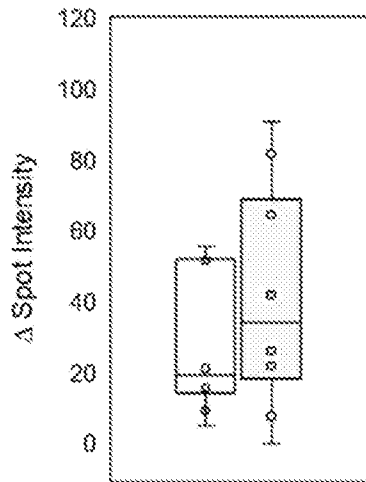
(d)



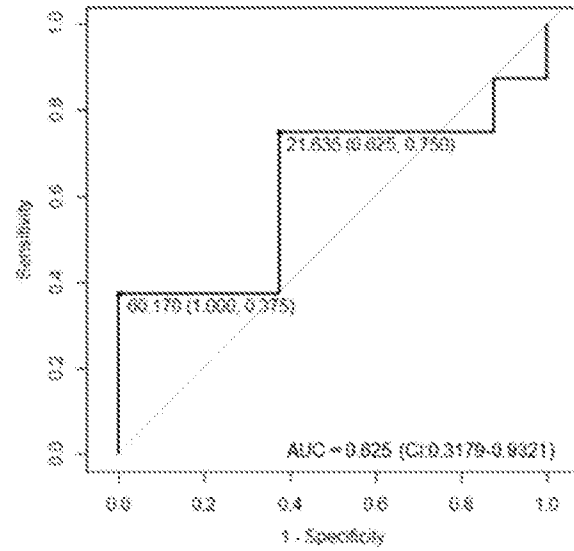
[3]

(a)

□ Unnoticed (n=8) (left)
 □ Mild (n=8) (right)

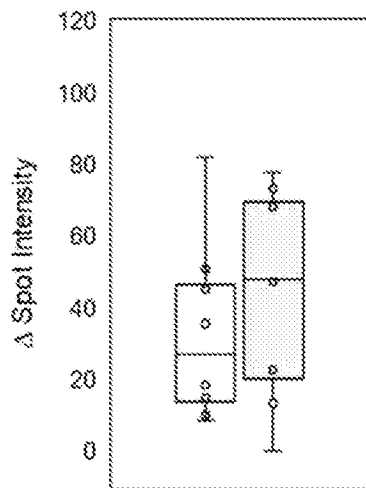


(b)

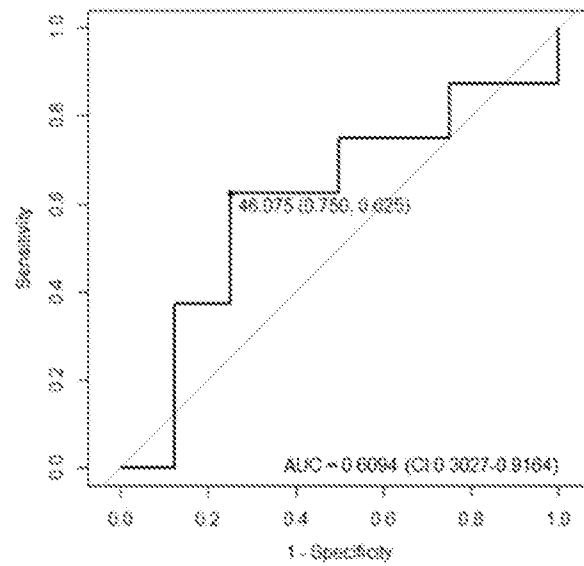


(c)

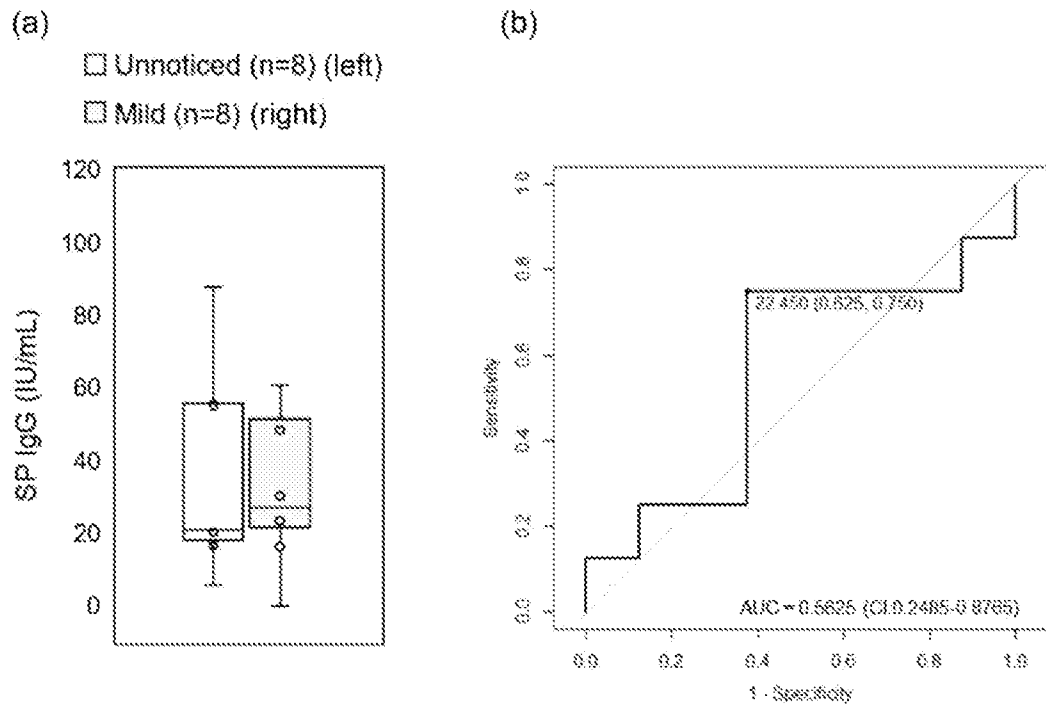
□ Unnoticed (n=8) (left)
 □ Mild (n=8) (right)



(d)



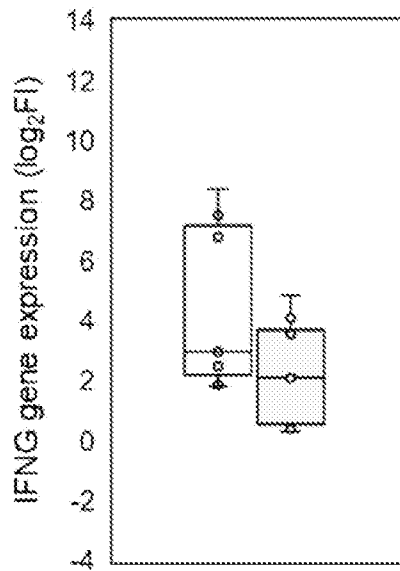
[4]



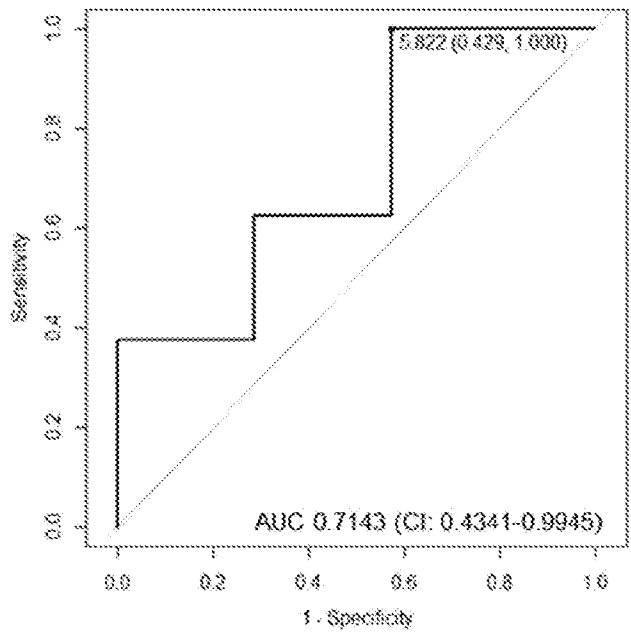
[図 5-1]

(a)

□ Unnoticed (n=7) (left)
■ Mild (n=8) (right)

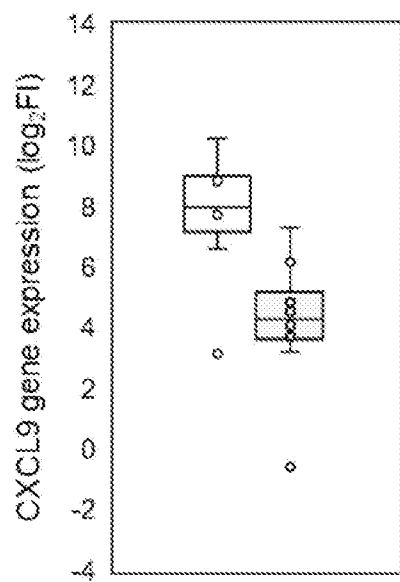


(b)

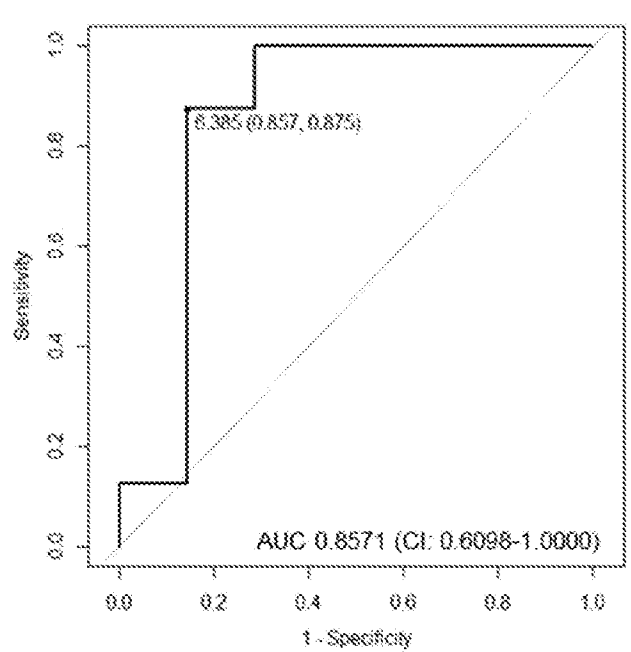


(c)

□ Unnoticed (n=7) (left)
■ Mild (n=8) (right)



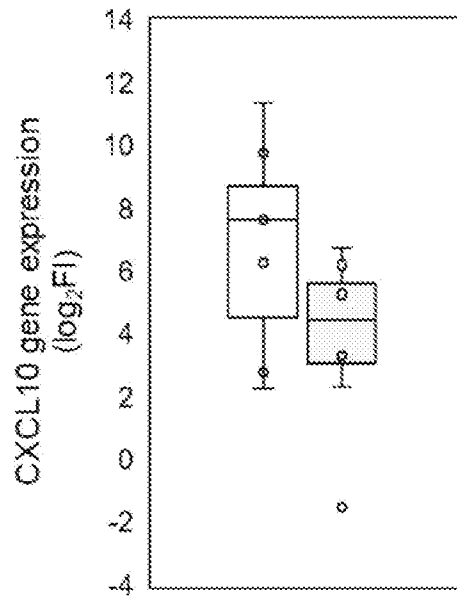
(d)



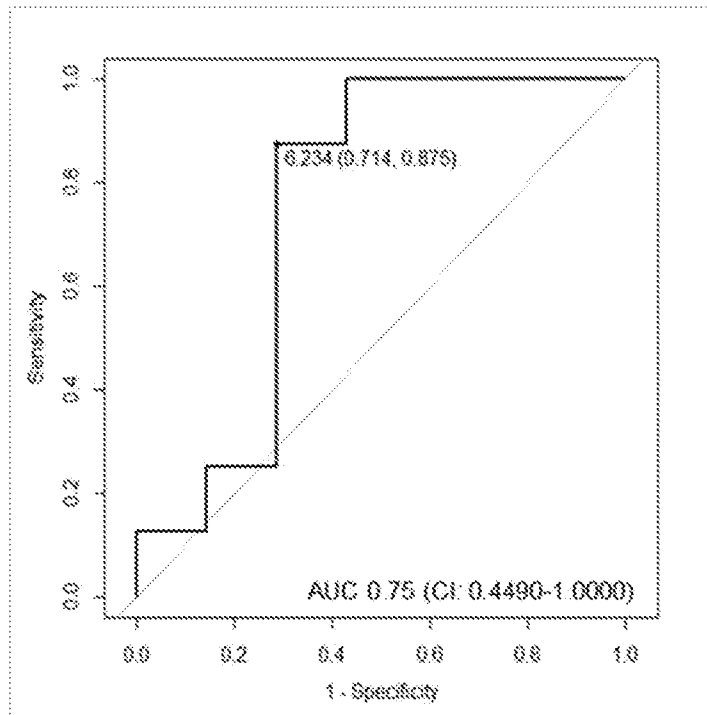
[5-2]

(e)

□ Unnoticed (n=7) (left)
□ Mild (n=8) (right)

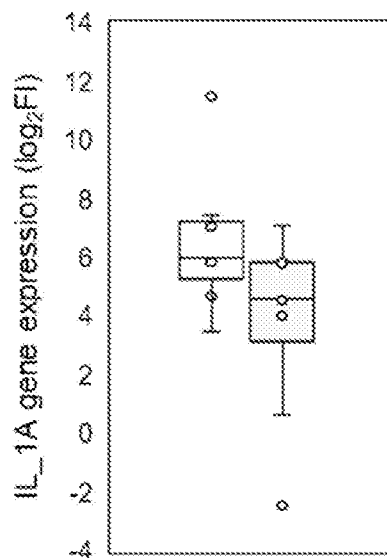


(f)

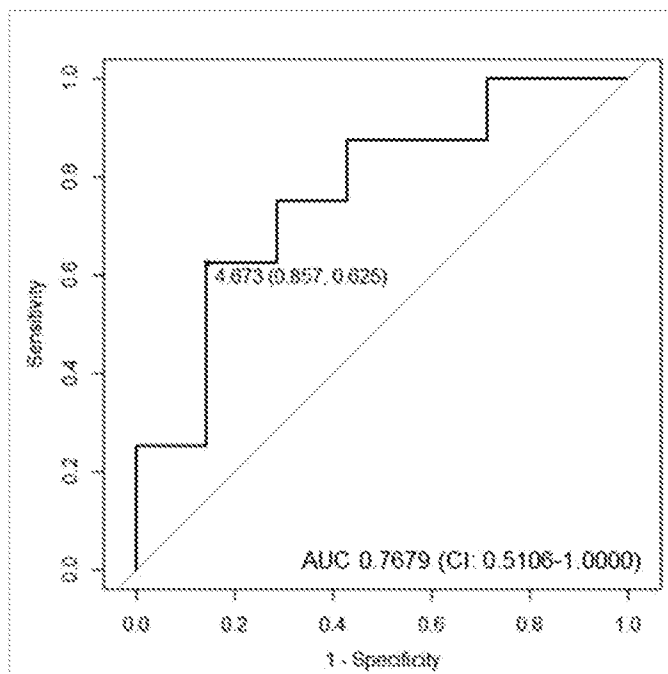


(g)

□ Unnoticed (n=7) (left)
□ Mild (n=8) (right)



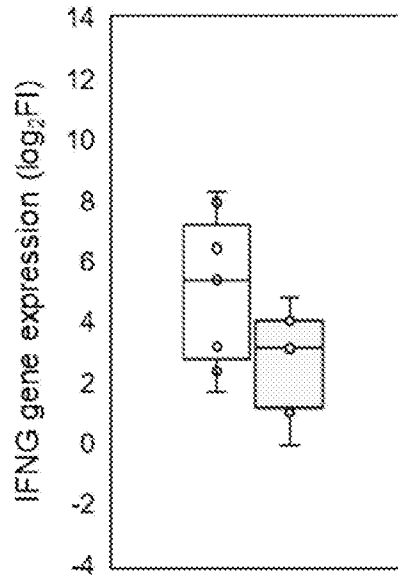
(h)



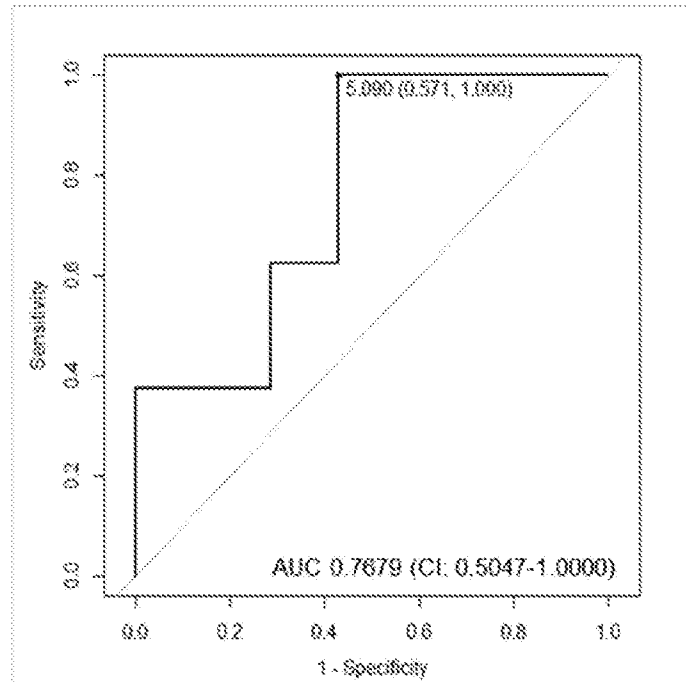
[6]

(a)

□ Unnoticed (n=7) (left)
■ Mild (n=8) (right)

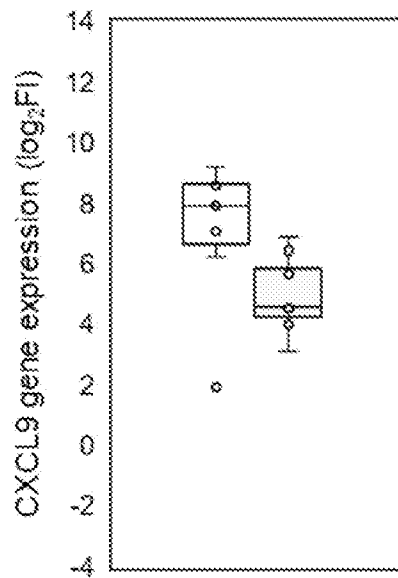


(b)

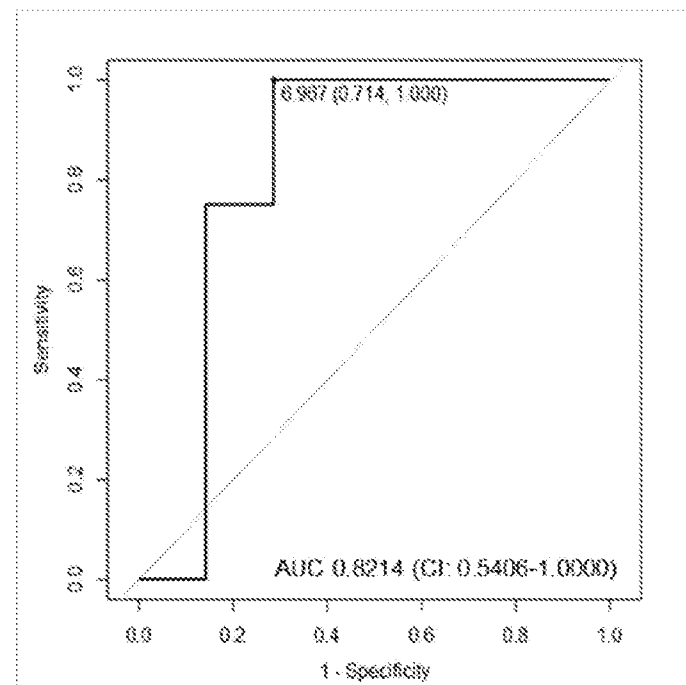


(c)

□ Unnoticed (n=7) (left)
■ Mild (n=8) (right)



(d)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q 1/6806</i> (2018.01)i; <i>C07K 14/165</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/686</i> (2018.01)i FI: C12Q1/6806 Z; C12Q1/686 Z; C12M1/00; C07K14/165 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) C12Q1/6806; C07K14/165; C12M1/00; C12Q1/686 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHWARZ, M. et al. Rapid, scalable assessment of SARS-CoV-2 cellular immunity by whole-blood PCR. Nat. Biotechnol. 2022, vol. 40, pp. 1680-1689, supplements 1-11 abstract, methods, fig. 5	1-6
X	COSMA, C. et al. SARS-CoV-2 specific T-cell humoral response assessment after COVID-19 vaccination using a rapid direct real-time PCR amplification. Clin. Chem. Lab. Med. 24 March 2023, vol. 61, no. 9, pp. 1652-1660 abstract, materials and methods, figures, tables	1-6
X	WO 2022/086444 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE) 28 April 2022 (2022-04-28) example 4, fig. 9	1-6
X	WO 2022/240887 A1 (ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI) 17 November 2022 (2022-11-17) example 5, fig. 11	1-6
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 09 August 2024		Date of mailing of the international search report 20 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020613

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2023/167250 A1 (NAT CANCER CT) 07 September 2023 (2023-09-07) claims, examples	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020613

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/020613

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2022/086444	A1	28 April 2022	US 2023/0393121 A1 example 4, fig. 9 EP 4232827 A1	
WO	2022/240887	A1	17 November 2022	(Family: none)	
WO	2023/167250	A1	07 September 2023	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/6806(2018.01)i; C07K 14/165(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i FI: C12Q1/6806 Z; C12Q1/686 Z; C12M1/00; C07K14/165		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/6806; C07K14/165; C12M1/00; C12Q1/686		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	SCHWARZ M. et al., Rapid, scalable assessment of SARS-CoV-2 cellular immunity by whole-blood PCR., Nat. Biotechnol., 2022, vol.40, pp.1680-1689, suppl. 1-11 Abstract, Methods, Fig. 5	1-6
X	COSMA, C. et al., SARS-CoV-2 specific T-cell humoral response assessment after COVID-19 vaccination using a rapid direct real-time PCR amplification., Clin. Chem. Lab. Med., 2023.03.24, vol.61, no.9, pp.1652-1660 Abstract, Materials and methods, Figures, Tables	1-6
X	WO 2022/086444 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE) 28.04.2022 (2022-04-28) EXAMPLE 4, Figure 9	1-6
X	WO 2022/240887 A1 (ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI) 17.11.2022 (2022-11-17) Example 5, FIG. 11	1-6
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 09.08.2024	国際調査報告の発送日 20.08.2024	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 戸来 幸男 4N 3964 電話番号 03-3581-1101 内線 3461	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	W0 2023/167250 A1 (国立研究開発法人国立がん研究センター) 07.09.2023 (2023 - 09 - 07) 請求項、実施例	1-6

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
- ☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/020613

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2022/086444	A1	28.04.2022	US 2023/0393121 A1 Example 4, Figure 9 EP 4232827 A1	
WO	2022/240887	A1	17.11.2022	(ファミリーなし)	
WO	2023/167250	A1	07.09.2023	(ファミリーなし)	