



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117441103 A

(43) 申请公布日 2024.01.23

(21) 申请号 202280022067.8

尼可拉·克劳德·保罗·萨克斯

(22) 申请日 2022.03.15

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

(30) 优先权数据

2021-042670 2021.03.16 JP

专利代理师 汤国华

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.15

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/011710 2022.03.15

C12Q 1/6869 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/196701 JA 2022.09.22

C12M 1/34 (2006.01)

(71) 申请人 国立大学法人大阪大学

地址 日本国大阪府吹田市山田丘1番1号

申请人 弘泰生物科技股份有限公司

(72) 发明人 山崎晶 陆修远 细野裕贵

石塚茂宜 山下和男

权利要求书4页 说明书62页 附图13页

(54) 发明名称

使用滤泡性T细胞的新型医疗技术

(57) 摘要

本发明提供一种使用滤泡性T细胞的新型医疗技术。本发明根据发现了对各患者的共同疾病因素特异性的公共TfhTCR (Public TfhTCR), 提供一种对疾病有特异性的滤泡性T细胞的生产方法, 所述方法包括确定具有引发对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞的能力的疾病相关因素或其一部分的工序, 利用该疾病相关因素或其一部分引发对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞的工序, 以及获得对该疾病有特异性的滤泡性T细胞的工序。

1. 一种用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的方法,所述方法包括:  
对与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,  
以及将该水平或量与规定的基准进行比较的步骤。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述基准是关于选自以下组成的群组中的至少1种的基准:所述疾病的履历、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性、对所述疾病的治疗剂的有效性、对再次罹患所述疾病的防御能力、所述疾病的病情以及所述疾病的罹患风险。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的基准。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的感染履历的基准。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的疫苗有效性、再感染防御能力的基准。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性评价的基准。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述测定包括对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,所述基准是关于所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险、病情的基准。
8. 根据权利要求1~7中任一项所述的方法,其中,所述测定根据酶联免疫斑点检测即ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查、免疫染色、原位分析进行,所述外周血单个核细胞即PBMC,所述新一代测序仪/基因检查即组库分析,所述免疫染色即病理组织检查。
9. 根据权利要求1~8中任一项所述的方法,其中,所述比较还包括:将测定的与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量,跟与未罹患疾病的受试体的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的平均值或中位数进行比较的步骤。
10. 根据权利要求1~6和8~9中任一项所述的方法,其中,所述疾病是感染症或癌症。
11. 根据权利要求1~6和8~9中任一项所述的方法,其中,所述疾病是病毒感染症。
12. 根据权利要求1~9中任一项所述的方法,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。
13. 一种用于评价受试体的疾病的试剂或装置,所述试剂或装置包括用于测定与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的试剂或装置。
14. 根据权利要求13所述的试剂或装置,所述试剂或装置包括与滤泡性T细胞特异性反应的试剂。
15. 根据权利要求13所述的试剂或装置,所述装置是用于进行酶联免疫斑点检测即ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查、免疫染色、原位分析的装置,所述外周血单个核细胞即PBMC,所述新一代测序仪/基因检查即组库

分析,所述免疫染色即病理组织检查。

16. 根据权利要求13~15中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是感染症或癌症。

17. 根据权利要求13~15中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是病毒感染症。

18. 根据权利要求13~15中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

19. 一种用于评价受试体的疾病的系统,所述系统包括:

测定与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的试剂或装置,

以及根据该试剂或装置得到的测定结果对该疾病进行评价的评价部。

20. 根据权利要求19所述的系统,其中,所述评价部构成为进行选自以下组成的群组中的至少1种:所述疾病履历的评价、对所述疾病的预防剂或疫苗有效性评价、对所述疾病的治疗剂的有效性评价、对再次罹患所述疾病的防御能力的评价、所述疾病的病情的评价以及所述疾病的罹患风险评价。

21. 根据权利要求19或20所述的系统,所述系统进一步包括对所述受试体的所述疾病进行检查或诊断的检查、诊断部。

22. 根据权利要求19所述的系统,所述系统进一步包括对所述受试体的所述疾病的感染履历进行评价的感染履历评价部。

23. 根据权利要求19所述的系统,所述系统进一步包括进行所述受试体的所述疾病的疫苗有效性评价、再感染防御能力评价的疫苗有效性评价、再感染防御能力评价部。

24. 根据权利要求19所述的系统,所述系统进一步包括对所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性进行评价的癌症免疫药物有效性评价部。

25. 根据权利要求19所述的系统,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述系统包括对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量进行测定的滤泡性T细胞测定部,以及对所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病进行风险评价、病情评价的自身免疫性疾病风险评价、病情评价部。

26. 根据权利要求19~25中任一项所述的系统,其中,所述试剂或装置包括与滤泡性T细胞特异性反应的试剂。

27. 根据权利要求19~25中任一项所述的系统,其中,所述装置是用于进行酶联免疫斑点检测即ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查、免疫染色、原位分析的装置,所述外周血单个核细胞即PBMC,所述新一代测序仪/基因检查即组库分析,所述免疫染色即病理组织检查。

28. 根据权利要求19~27中任一项所述的系统,所述系统进一步包括:将测定的与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量,跟与未罹患疾病的受试体的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的平均值或中位数进行比较的比较部。

29. 根据权利要求19~24和26~28中任一项所述的系统,其中,所述疾病是感染症或癌症。

30. 根据权利要求19~24和26~28中任一项所述的系统,其中,所述疾病是病毒感染

症。

31. 根据权利要求19~24和26~28中任一项所述的系统,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

32. 一种用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的方法,所述方法包括:

提供该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序,

以及将该滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息与规定的基准进行比较的工序。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述基准是关于选自由以下组成的群组中的至少1种的基准:有无所述疾病的履历、对于所述疾病的预防剂或疫苗的有效性、对于所述疾病的治疗剂的有效性、有无对于再次罹患所述疾病的防御能力、所述疾病的病情评价以及所述疾病的罹患风险。

34. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述基准是关于有无所述受试体的所述疾病的感染履历的基准。

35. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述基准是关于有无所述受试体的所述疾病的疫苗有效性、再感染防御能力的基准。

36. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性的基准。

37. 根据权利要求32所述的方法,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述测定包括对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,所述基准是关于所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险、病情的基准。

38. 根据权利要求32~37中任一项所述的方法,其中,所述提供信息的工序是根据酶联免疫斑点检测即ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查、免疫染色、原位分析进行的,所述外周血单个核细胞即PBMC,所述新一代测序仪/基因检查即组库分析,所述免疫染色即病理组织检查。

39. 根据权利要求32~38中任一项所述的方法,其中,所述比较进一步包括:将与所述受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息,跟与未罹患疾病的受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的平均值或中位数进行比较的步骤。

40. 根据权利要求32~36和38~39中任一项所述的方法,其中,所述疾病是感染症或癌症。

41. 根据权利要求32~36和38~39中任一项所述的方法,其中,所述疾病是病毒感染症。

42. 根据权利要求32~41中任一项所述的方法,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

43. 一种将用于评价受试体的疾病的方法安装在计算机中、包括可计算机读取的代码的程序,所述程序包括:

提供与受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量

的相关信息工序，

以及针对该疾病评价该滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息工序。

44. 根据权利要求43所述的程序，其中，所述评价工序还包括进行选自以下组成的群组中的至少1种的工序：所述疾病的履历的评价、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性评价、对所述疾病的治疗剂的有效性评价、对再次罹患所述疾病的防御能力的评价、所述疾病的病情的评价以及所述疾病的罹患风险评价。

45. 根据权利要求43所述的程序，其中，所述方法包括对所述受试体的所述疾病的感染履历进行评价的步骤。

46. 根据权利要求43所述的程序，其中，所述方法包括进行所述受试体的所述疾病的疫苗有效性评价、再感染防御能力评价的步骤。

47. 根据权利要求43所述的程序，其中，所述方法包括对所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性进行评价的步骤。

48. 根据权利要求43所述的程序，其中，所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素，所述方法包括：所述测定为与该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤，以及进行所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价、病情评价的步骤。

49. 根据权利要求43～48中任一项所述的程序，其中，所述提供信息的工序是根据酶联免疫斑点检测即ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查、免疫染色、原位分析进行的，所述外周血单个核细胞即PBMC，所述新一代测序仪/基因检查即组库分析，所述免疫染色即病理组织检查。

50. 根据权利要求43～49中任一项所述的程序，其中，所述方法进一步包括：将与所述受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息，跟与未罹患疾病的受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的平均值或中位数进行比较的步骤。

51. 根据权利要求43～47和49～50中任一项所述的程序，其中，所述疾病是感染症或癌症。

52. 根据权利要求43～47和49～50中任一项所述的程序，其中，所述疾病是病毒感染症。

53. 根据权利要求43～50中任一项所述的程序，其中，所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

54. 一种计算机可读记录介质，所述记录介质中存储了权利要求43～53中任一项所述的程序。

55. 一种用于评价受试体的疾病的方法，所述方法包括对该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤。

56. 一种用于评价受试体的疾病的方法，所述方法包括提供与受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序，以及针对该疾病评价该滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序。

## 使用滤泡性T细胞的新型医疗技术

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种使用滤泡性T细胞的新型医疗技术。更详细而言,涉及一种以滤泡性T细胞为指标以诊断疾病的技术。

### 背景技术

[0002] 针对各种疾病的因素会产生后天性免疫应答,但这其中存在很多未知点。因此,理解针对疾病因素的后天性免疫应答,成为预测长期免疫、为疫苗设计提供信息的关键。

### 发明内容

#### 【发明要解决的课题】

[0003] 本发明人发现,当存在某种感染因素(病毒等)时,各种患者的共同感染因素中存在特异性的公共TfhTCR(Public TfhTCR)。本发明人发现,通过对TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链进行重组,确认了由频繁发现的等位基因所呈递的抗原是T细胞表位。本发明人发现,使用该TCR克隆型可用于诊断。

[0004] 因此,本发明提供以下内容。

[0005] (项目1)

一种用于评价受试体的疾病的方法,所述方法包括对与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤。

(项目2)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法基于所述测定结果,进一步包括进行选自自由以下组成的群组中的至少1种步骤:所述疾病的履历的评价、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性评价、对所述疾病的治疗剂的有效性评价、对再次罹患所述疾病的防御能力的评价、所述疾病的病情评价以及所述疾病的罹患风险评价。

(项目3)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法进一步包括对所述受试体的所述疾病进行检查或诊断的步骤。

(项目4)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法进一步包括对所述受试体的所述疾病的感染履历进行评价的步骤。

(项目5)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法进一步包括进行所述受试体的所述疾病的疫苗有效性评价、再感染防御能力评价的步骤。

(项目6)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法进一步包括进行所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性评价的步骤。

(项目7)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述测定进一步包括对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量测定的步骤,以及进行所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价、病情评价的步骤。

(项目8)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述测定根据酶联免疫斑点检测即ELISPOT(Enzyme Linked Immunospot Assay)、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析进行。

(项目9)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法进一步包括:将测定的与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量,跟与未罹患疾病的受试体的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的平均值或中位数进行比较的步骤。

(项目10)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目11)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目12)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

(项目13)

一种用于评价受试体的疾病的试剂或装置,所述试剂或装置包括测定与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的试剂或装置。

(项目14)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,所述试剂或装置包括与滤泡性T细胞特异性反应的试剂。

(项目15)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,所述装置是用于进行ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析的装置。

(项目16)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目17)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目18)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

(项目19)

一种用于评价受试体的疾病的系统,包括测定与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的试剂或装置,以及根据该试剂或装置的

测定结果对该疾病进行评价的评价部。

(项目20)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述评价部被构成为进行选自以下组成的群组中的至少1种:所述疾病履历的评价、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性的评价、对所述疾病的治疗剂的有效性的评价、对再次罹患所述疾病的防御能力的评价、所述疾病的病情评价以及所述疾病的罹患风险评价。

(项目21)

根据上述项目中任一项所述的系统,所述系统进一步包括对所述受试体的所述疾病进行检查或诊断的检查、诊断部。

(项目22)

根据上述项目中任一项所述的系统,所述系统进一步包括对所述受试体的所述疾病的感染履历进行评价的感染履历评价部。

(项目23)

根据上述项目中任一项所述的系统,所述系统进一步包括进行所述受试体的所述疾病的疫苗有效性评价、再感染防御能力评价的疫苗有效性评价、再感染防御能力评价部。

(项目24)

根据上述项目中任一项所述的系统,所述系统进一步包括对所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性进行评价的癌症免疫药物有效性评价部。

(项目25)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述系统包括对与该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量进行测定的滤泡性T细胞测定部,以及进行所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价、病情评价的自身免疫性疾病风险评价、病情评价部。

(项目26)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述试剂或装置包括与滤泡性T细胞特异性反应的试剂。

(项目27)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述装置是用于进行ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析的装置。

(项目28)

根据上述项目中任一项所述的系统,所述系统进一步包括:将测定的与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量,跟与未罹患疾病的受试体的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的平均值或中位数进行比较的比较部。

(项目29)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目30)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目31)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

(项目32)

一种用于对受试体的疾病进行评价的方法,所述方法包括提供与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序,以及针对该疾病对所述滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息进行评价的工序。

(项目33)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述评价的工序进一步包括进行选自以下组成的群组中的至少1种的步骤:所述疾病履历的评价、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性的评价、对所述疾病的治疗剂的有效性的评价、对再次罹患所述疾病的防御能力的评价、所述疾病的病情评价以及所述疾病的罹患风险评价。

(项目34)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法包括对所述受试体的所述疾病的感染履历进行评价的步骤。

(项目35)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法包括对所述受试体的所述疾病的疫苗有效性、再感染防御能力进行评价的步骤。

(项目36)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法包括对所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性进行评价的步骤。

(项目37)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述测定包括对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,以及进行所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价、病情评价的步骤。

(项目38)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述提供信息的步骤是根据ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析进行的。

(项目39)

根据上述项目中任一项所述的方法,所述方法进一步包括:将与所述受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息,跟与未罹患疾病的受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的有关信息的平均值或中位数进行比较的步骤。

(项目40)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目41)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目42)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。  
(项目43)

一种将用于评价受试体的疾病的方法安装在计算机中、并包含可计算机读取的代码的程序,所述程序包括提供与受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序,以及针对该疾病对所述滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息进行评价的工序。

(项目44)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述评价的工序进一步包括进行选自以下组成的群组中的至少1种的步骤:所述疾病履历的评价、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性评价、对所述疾病的治疗剂的有效性的评价、对再次罹患所述疾病的防御能力的评价、所述疾病的病情评价以及所述疾病的罹患风险评价。

(项目45)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述方法包括对所述受试体的所述疾病的感染履历进行评价的步骤。

(项目46)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述方法包括对所述受试体的所述疾病的疫苗有效性、再感染防御能力进行评价的步骤。

(项目47)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述方法包括对所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性进行评价的步骤。

(项目48)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述方法包括:所述测定为与该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,以及进行所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价、病情评价的步骤。

(项目49)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述提供信息的工序是根据ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析进行的。

(项目50)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述方法进一步包括:将与所述受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的有关信息,跟与未罹患疾病的受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的有关信息的平均值或中位数进行比较的步骤。

(项目51)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目52)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目53)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。  
(项目54)

一种计算机可读记录介质,所述记录介质中存储了上述项目中任一项所述的程序。

(项目55)

一种计算机可读记录介质,所述记录介质中存储了上述项目中任一项所述的程序。

本发明也提供以下项目。

(项目A1)

一种用于治疗或预防疾病的药物组合物,所述组合物具有引发与该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的能力,并含有该疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物。

(项目A2)

一种针对上述疾病的疫苗,所述疫苗具有引发与上述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的能力,并含有该疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物。

(项目A3)

根据上述项目中任一项所述的组合物或疫苗,所述组合物或疫苗优先诱导滤泡性T细胞。

(项目A4)

一种用于治疗或预防上述疾病的药物组合物,所述组合物含有与上述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞。

(项目A5)

一种针对上述疾病的细胞疫苗,所述细胞疫苗含有与上述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞。

(项目A6)

根据上述项目中任一项所述的组合物或疫苗,其中,与上述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞至少对上述疾病相关因素有反应性。

(项目A7)

根据上述项目中任一项所述的组合物或疫苗,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目A8)

根据上述项目中任一项所述的组合物或疫苗,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目A9)

根据上述项目中任一项所述的组合物,所述组合物诱导HLA分型特异性滤泡性T细胞。

(项目A10)

根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,所述疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物最多包含20个氨基酸。

(项目A11)

根据上述项目中任一项所述的组合物,其中,所述滤泡性T细胞是公共滤泡性T细胞。

胞。

(项目A12)

一种对所述疾病有反应性的滤泡性T细胞的生产方法,所述方法包括确定具有引发与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的能力的所述疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物的工序,

利用该疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物使对所述疾病引发特异性滤泡性T细胞的工序,

以及得到对该疾病有反应性的滤泡性T细胞的工序。

(项目13)

一种筛选对所述疾病有反应性的滤泡性T细胞的方法,所述方法包括:

A) 提供滤泡性T细胞集团的工序、

B) 使该滤泡性T细胞集团与所述疾病相关因素接触的工序、

C) 测定该滤泡性T细胞对该疾病相关因素的反应性的工序、以及

D) 在该滤泡性T细胞集团中,选择对该疾病相关因素显示出规定值以上的反应性的滤泡性T细胞的工序。

(项目A14)

根据上述项目所述的方法,所述C) 测定的工序是通过ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验实施的。

(项目B1)

一种多肽,用于呈递所述疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物,所述多肽具有引发与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的能力。

(项目B2)

根据上述项目中任一项所述的多肽,其中,所述多肽优先诱导滤泡性T细胞。

(项目B3)

根据上述项目中任一项所述的多肽,其中,对所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞至少对所述疾病相关因素有反应性。

(项目B4)

根据上述项目中任一项所述的多肽,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目B5)

根据上述项目中任一项所述的多肽,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目B6)

根据上述项目中任一项所述的多肽,其中,所述多肽诱导HLA分型特异性滤泡性T细胞。

(项目B7)

根据上述项目中任一项所述的多肽,其中,所述疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物最多包含20个氨基酸。

(项目B8)

根据上述项目中任一项所述的多肽,其中,所述滤泡性T细胞是公共滤泡性T细胞。

(项目C1)

一种跟与所述疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物相互作用的TCR特异性结合的抗体,所述抗体具有引发与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的能力。

(项目C2)

根据上述项目中任一项所述的抗体,其中,所述抗体优先诱导滤泡性T细胞。

(项目C3)

根据上述项目中任一项所述的抗体,其中,与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞至少对所述疾病相关因素有反应性。

(项目C4)

根据上述项目中任一项所述的抗体,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目C5)

根据上述项目中任一项所述的抗体,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目C6)

根据上述项目中任一项所述的抗体,其中,所述抗体诱导HLA分型特异性滤泡性T细胞。

(项目C7)

根据上述项目中任一项所述的抗体,其中,所述疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物最多包含20个氨基酸。

(项目C8)

根据上述项目中任一项所述的抗体,其中,所述滤泡性T细胞是公共滤泡性T细胞。

(项目D1)

一种用于诊断疾病的药物组合物,所述药物组合物具有引发与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的能力,将该疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物作为指标。

(项目D2)

根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物优先诱导滤泡性T细胞。

(项目D3)

根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,对所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞至少对所述疾病相关因素有反应性。

(项目D4)

根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目D5)

根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目D6)

根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物诱导HLA分型特异性滤泡性T细胞。

(项目D7)

根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,所述疾病相关因素或其中一部分或功能性等效物最多包含20个氨基酸。

(项目D8)

根据上述项目中任一项所述的药物组合物,其中,所述滤泡性T细胞是公共滤泡性T细胞。

(项目E1)

一种用于强化对所述疾病的免疫获得的组合物,所述组合物包含与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞。

(项目E2)

根据上述项目中任一项所述的组合物或疫苗,其中,对所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞至少对所述疾病相关因素有反应性。

(项目E3)

根据上述项目中任一项所述的组合物或疫苗,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目E4)

根据上述项目中任一项所述的组合物或疫苗,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目E5)

根据上述项目中任一项所述的组合物或疫苗,其中,所述滤泡性T细胞是公共滤泡性T细胞。

(项目X1)

一种用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的方法,所述方法包括:

对与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,以及

将该水平或量与规定的基准相比较的步骤。

(项目X2)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准为与选自以下组成的群组中的至少1种相关的基准:所述疾病履历、所述疾病的预防剂或疫苗的有效性、所述疾病的治疗剂的有效性、再次罹患所述疾病的防御能力、所述疾病的病情以及所述疾病的罹患风险。

(项目X3)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的基准。

(项目X4)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的感染履历的基准。

(项目X5)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准是关于对所述受试体的所述疾病的疫苗的有效性、再感染防御能力的基准。

(项目X6)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准是关于对所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性的基准。

(项目X7)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述测定包括对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,所述基准是关于所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险、病情的基准。

(项目X8)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述测定根据ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析进行。

(项目X9)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述比较进一步包括将测定的与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量,跟与未罹患疾病的受试体的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的平均值或中位数进行比较的步骤。

(项目X10)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目X11)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目X12)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

(项目X13)

一种用于评价受试体的疾病的试剂或装置,所述试剂或装置包括测定与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量进行测定的试剂或装置。

(项目X14)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,所述试剂或装置包括与滤泡性T细胞特异性反应的试剂。

(项目X15)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,其中,所述装置是用于进行ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析的装置。

(项目X16)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目X17)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目X18)

根据上述项目中任一项所述的试剂或装置,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

(项目X19)

一种用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的系统,所述系统包括:测定

与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的试剂或装置,以及将由该试剂或装置得到的测定结果与规定的基准进行比较的比较部。

(项目X20)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述基准为关于选自由以下组成的群组中的至少1种的基准:所述疾病的履历、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性、对所述疾病的治疗剂的有效性、对再次罹患所述疾病的防御能力、所述疾病的病情以及所述疾病的罹患风险。

(项目X21)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的基准。

(项目X22)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病履历的基准。

(项目X23)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述基准是关于对所述受试体的所述疾病的预防剂或疫苗的有效性、再感染防御能力的基准。

(项目X24)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述基准是关于对所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性的基准。

(项目X25)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述系统进一步包括对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量进行测定的滤泡性T细胞测定部,所述基准是关于所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险、病情的基准。

(项目X26)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述试剂或装置包含对滤泡性T细胞特异性反应的试剂。

(项目X27)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述装置是用于进行ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析的装置。

(项目X28)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述比较部将测定的与所述疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量,跟与未罹患疾病的受试体的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的平均值或中位数进行比较。

(项目X29)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目X30)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目X31)

根据上述项目中任一项所述的系统,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

(项目X32)

一种用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的方法,所述方法包括:

提供与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序,以及

将该滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息与规定的基准相比较的工序。

(项目X33)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准为与选自由以下组成的群组中的至少1种相关的基准:所述疾病履历、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性、对所述疾病的治疗剂的有效性、对再次罹患所述疾病的防御能力、所述疾病的病情评价以及所述疾病的罹患风险。

(项目X34)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的感染履历的基准。

(项目X35)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准是关于对所述受试体的所述疾病的疫苗的有效性、再感染防御能力的基准。

(项目X36)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述基准是关于对所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性的基准。

(项目X37)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述测定包括对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,所述基准是关于所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险、病情的基准。

(项目X38)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述提供信息的步骤是通过ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析进行的。

(项目X39)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述比较进一步包括将与所述受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息,跟与未罹患疾病的受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的平均值或中位数进行比较的步骤。

(项目X40)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目X41)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目X42)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

(项目X43)

一种将用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的方法安装在计算机中、并包含可计算机读取的代码的程序,所述程序包括提供与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序,以及将该滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息与规定的基准进行比较的工序。

(项目X44)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述基准是与选自以下组成的群组中的至少1种相关的基准:所述疾病履历、对所述疾病的预防剂或疫苗的有效性、对所述疾病的治疗剂的有效性、对再次罹患所述疾病的防御能力、所述疾病的病情评价以及所述疾病的罹患风险。

(项目X45)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的感染履历的基准。

(项目X46)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的疫苗有效性、再感染防御能力的基准。

(项目X47)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述基准是关于所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性的基准。

(项目X48)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,所述方法包括:所述测定为对该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,所述基准是关于所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险、病情的基准。

(项目X49)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述提供信息的工序是通过ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析进行的。

(项目X50)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述比较进一步包括:将与所述受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息,跟与未罹患疾病的受试体的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的平均值或中位数进行比较的步骤。

(项目X51)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述疾病是感染症或癌症。

(项目X52)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述疾病是病毒感染症。

(项目X53)

根据上述项目中任一项所述的程序,其中,所述疾病是过敏症或自身免疫性疾病。

(项目X54)

一种计算机可读记录介质,所述记录介质中存储了上述项目中任一项所述的程序。

[0006] 本发明中,上述一个或多个特征旨在除已明示的组合以外可进一步组合而提供。在根据需要进行阅读和理解以下详细说明后,本领域技术人员可认识到本发明进一步的实施方式和优点。

#### 【发明的效果】

[0007] 本发明的基于发现了各种患者的共同疾病因素中的特异性的公共TfhTCR (Public TfhTCR),提供一种用于诱导滤泡性T细胞、与含有对疾病因素有特异性的表位的组合物有特异性的滤泡性辅助T细胞 (Tfh)。

#### 附图说明

[0008] 图1:图1是显示已确定的来自COVID-19患者的Tfh细胞中表达的TCR的图。来自患者的PBMC的18661个T细胞的UMAP投影。每个点对应单细胞(single cell)。使用标准的作为Tfh细胞标志物的CD200、ICOS、CD40LG、PDCD1、CXCL13和CXCR5,在对UMAP图中显示的Tfh集群标签化。

图2:图2是显示克隆1和克隆2的TCR CDR3序列的排列的图。

图3-1:图3是显示从患者的Tfh细胞克隆而来的TCR对来自SARS-CoV-2S蛋白的肽有反应性的图。表达克隆型1/2(分别为克隆1和克隆2)的TCR的T细胞杂交瘤,在来自对应的供者的APC的存在下(A)或不存在下(B),历经20小时,在无刺激的状态下(被涂色的直方图),或用灭活病毒(相当于1 $\mu$ g/ml的S蛋白)、重组S蛋白(1 $\mu$ g/ml)、S肽池和M+N肽池(两者均为每种肽1 $\mu$ g/ml)(分别为空白直方图)刺激,对CD69表达进行分析(图3A和B)。

图3-2:图3是显示从患者的Tfh细胞克隆而来的TCR对来自SARS-CoV-2S蛋白的肽有反应性的图。将克隆1和克隆2在同一起源的APC的存在下,历经20小时,用S肽池#1和#2(每种肽1 $\mu$ g/ml)刺激(图3C)。将克隆1和克隆2在同一起源的APC的存在下,历经20小时,用S肽池#2和S肽池PepTivator(注册商标)(两者均为每种肽0.3 $\mu$ g/ml)刺激,然后对CD69进行染色(图3D)。将克隆1和克隆2在来自不同供者的APC的存在下,历经20小时,用S肽池#2(每种肽1 $\mu$ g/ml)刺激,然后对CD69表达进行分析(图3E)。

图4:图4是显示肽池的覆盖范围的相对位置的图。

图5-1:图5是显示已确定的由S蛋白质应答性TCR识别的HLA和S蛋白质肽的图。在来自具有与相同的DP或原始个体的DR/DQ等位基因的其他供者PBMC的APC的存在下,将表达克隆型1/2(分别为克隆1和克隆2)的TCR的T细胞杂交瘤用S肽池#2(每种肽0.3 $\mu$ g/ml)刺激(图5A)。在表达所示的HLA的HEK 293T细胞的存在下,用S肽池#2(每种肽0.3 $\mu$ g/ml)刺激克隆1和2(图5B)。

图5-2:图5是显示已确定的由S蛋白质应答性TCR识别的HLA和S蛋白质肽的图。由NetMHC预测的、具有由DRB1\*15:01向含有克隆1和2的表位的S蛋白质的一部分呈递的可能性的肽(红色:强结合肽,灰色:弱结合肽)(图5C)。合成的两个强力的结合肽的序列(图5D)。

在不同起源的APC的存在下,历经20小时,将克隆1和2在无刺激的状态下(被涂色的直方图)、或用S肽池#2(0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肽)和单肽(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )(空白直方图)刺激,然后将CD69染色(图5E)。

图6-1:图6中, $S_{864-882}$ 是被健康人群和恢复期的COVID-19患者广泛识别的SARS-CoV-2特异性肽。将表达克隆型1/2(分别为克隆1和克隆2)的TCR的T细胞杂交瘤与来自APC和HCoV-OC43 S蛋白质(每种肽0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的肽池共同培养(图6A)。 $S_{864-882}$ 人类冠状病毒的对应区域的SARS-CoV-2的序列排列(图6B)。通过NetMHC 4.0服务器预测的对肽 $S_{864-882}$ 的DRB1\*15:01和\*15:02的结合能力(红色:强结合肽,灰色:弱结合肽)(图6C)。

图6-2:图6中, $S_{864-882}$ 是被健康人群和恢复期的COVID-19患者广泛识别的SARS-CoV-2特异性肽。在具有DRB1\*15:02的APC的存在下,用单肽刺激克隆1和2,并对CD69表达进行分析(图6D)。在健康供者和恢复期COVID-19患者的公开数据库中的克隆型1/2的分布。上图为两者群体拥有克隆型1/2的个人的百分比,下图为两者群体的各个人中的克隆型1/2的增加(图6E)。

图7:图7显示将通过CD4阳性细胞和EBV感染无限增殖化的来自患者的B细胞的混合物通过SARS-CoV-2 $S_{864-882}$ 肽刺激时,与无刺激的情况相比较,培养基中IL-21浓度较高。

图8:图8是显示系统1000的构成的一例的图。

图9:图9是显示用户装置100的构成的一例的图。

图10:图10显示用户装置200的构成的一例。

## 具体实施方式

[0009] 以下在展示本发明的最优方式的同时进行说明。在本说明书全文中,只要未另有提及,则单数形式的表达应理解为也包括其复数形式的概念。因此,只要未另有提及,单数形式的冠词(例如英语的情况时的“a”、“an”、“the”等)应理解为也包括其复数形式的概念。此外,本说明书中所用的用词,只要未另有提及,则应理解为按本领域中通常使用的含义使用。因此,只要未有其他定义,则本说明书中所用的全部专业术语及科学技术用语具有与本发明所属技术领域的技术人员通常理解的相同的含义。当发生矛盾时,以本说明书(包括定义)为优先。

[0010] 以下对本说明书特别所用的用语的定义和/或基本技术内容进行适当说明。

[0011] (定义等)

本说明书中的“滤泡性T细胞”指:抑制B细胞的成熟和活化、抗体产生的拥有共同TCR的辅助T细胞。也称滤泡性辅助T细胞,滤泡性T细胞与滤泡性辅助T细胞表示相同含义,在本说明书可互换使用。

[0012] 本说明书中,“特异性”指:抗体或其片段或含有这些的细胞以比任意其他靶标更高的亲和性与靶标识别、结合的特性。

[0013] 本说明书中,(针对某对象的)“反应性”(的滤泡性T细胞)指:至少与该对象反应、活化的滤泡性T细胞,无论其与该对象以外的物质是否反应,包括能与该对象以外的物质反应的物质(交叉反应性的物质)、与该对象以外的物质反应性较低的物质(对该对象优先的物质)或没有反应性的物质(对该对象有特异性的物质)。

[0014] 本说明书中,“优先诱导”指:以较高的比例诱导对象,例如以50%以上、55%以上、

60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、100%以上诱导。

[0015] 本说明书中“疾病因素”指:除病毒等感染源以外,还包括癌等新生物、自身免疫性疾病的情况时引起免疫异常的因素等。

[0016] 本说明书中,“表位”指:作为抗原决定簇已知的、被抗体、B细胞或T细胞等免疫系统识别的分子或部分,也可指抗体或淋巴细胞受体所结合的抗原分子中的部位。在本说明书中使用时,“表位”是能与本说明书中记载的结合部分(例如抗体或其抗原结合片段)相结合的分子。通常而言,表位由氨基酸或糖侧链等分子的化学活性的表面基团组成,通常具有特定的三维结构特征,并拥有特定的电荷特征。本说明书中,决定表位的方法为本领域公知的方法,在提供了核酸或氨基酸的一级结构时,本领域技术人员即可通过这样的公知常用技术来决定这种表位。本说明书中的“抗原”(antigen)指:能与抗体分子特异性结合的任意基质。本说明书中“免疫原”(immunogen)指:能引发产生抗原特异性免疫应答的淋巴细胞活化的抗原。

[0017] 本说明书中,“向HLA呈递表位的探针”指:用于向HLA呈递表位的探针,通过使用该探针进行测定,根据有无与该探针结合的细胞,由此可以检查免疫系统有无确立。虽然是探针,但HLA与表位肽作为多肽也有成为一体的情况,但也可以不是一体,而是肽附着在HLA上。

[0018] 本说明书中,“与TCR特异性结合”指:与T细胞受体(TCR)特异性结合。

[0019] 本说明书中,“强化免疫获得”指:促进针对抗原的自然免疫及获得免疫等免疫的获得。例如可列举通过滤泡性T细胞促进B细胞的成熟、活化和抗体产生的控制等。

[0020] 本说明书中,“防御抗体”指:在主动免疫或被动免疫中可观察到的承担对感染病原体的免疫、特别是承担阻止病毒感染能力的抗体。

[0021] 本说明书中,“公共滤泡性T细胞”指:控制B细胞的成熟和活化、抗体产生的、具有在不同人之间共有的TCR的辅助T细胞。可与公共滤泡性辅助T细胞、公共T<sub>fh</sub>细胞互换使用。

[0022] 本说明书中,“可工作地连接”指:被核酸编码的多肽以在启动子等元件的控制下,以显示该多肽的生物学活性的状态进行表达地与元件连接。

[0023] 本说明书中的所谓“疾病”(disease),在本发明中可与“障碍”(disorder)、“症状”(condition)互换使用,更广义的解释中指人类或动物的身心紊乱或发生不适的状态,指疾病、障碍、各种症状等不被具体定义的不能说是健康的状态的任意状态。

[0024] 本说明书中,疾病等的“评价”指:针对其对象疾病从一些侧面,确认事物、性质、能力等的好坏等确定其价值或意义等,例如包括但不限于:疾病履历的评价、对疾病的预防剂或疫苗的有效性的评价、对疾病的治疗剂(例如,癌症时,免疫检查点抑制剂等癌症免疫药物)的有效性的评价、对再次罹患疾病(例如,感染症时为再感染)的防御能力的评价、疾病(例如癌症、感染症、自身免疫性疾病或过敏症)的病情评价以及上述疾病的罹患风险评价等。

[0025] 本说明书中“疾病相关因素”指:除直接引发疾病的因素、成为引发上述直接因素的因素等间接的原因的因素以外,产生疾病的结果的结果性因素、同时产生的因素、关联而产生的因素等,与受试体在非疾病状态下相比较,在其疾病状态下发生了变化的任意的因素。引发疾病的因素称为“疾病原因因素”,这种情况下,例如,若是感染症,则指作为病原因

素或感染因素的病毒、细菌、原虫、支原体等,若是过敏症等自身免疫性疾病,则指成为过敏源等免疫原的物质(原因物质),若是新生物,则可列举肿瘤细胞、有毒物质等。另一方面,产生疾病结果的因素也称“疾病结果因素”,这种情况时,包括与受试体的免疫反应相关的因素、代谢物等。

[0026] 本说明书中“与疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞”中的“反应性”指:当滤泡性T细胞被置于能与疾病相关因素相互作用的条件下时,与该因素不存在时相比较,在该因素存在时其他因素会发生变化。与疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞指:在被置于能与该疾病相关因素相互作用的状态时,该滤泡性T细胞发生某些正或负的变化。

[0027] 本说明书中,滤泡性T细胞的“水平”指该T细胞的功能的程度,滤泡性T细胞的“量”指该T细胞的物理性的量的程度。

[0028] 本说明书中“病毒抗原”指作为欲使之引起免疫反应的对象的部分或全部,指在向宿主投放时会引起免疫反应的物质。可使用肽或整体(溶菌产物)等。或者也可形成并利用病毒样颗粒(VLP)。作为病毒抗原的对象,可列举但不限于HIV、乙肝病毒、丙肝病毒、冠状病毒、诺如病毒、轮状病毒、狂犬病病毒、西尼罗病毒、乳头瘤病毒、寨卡病毒、风疹病毒、巨细胞病毒、流感病毒、禽流感病毒的抗原等。

[0029] 本说明书中“细菌抗原”指:作为想要使之引起免疫反应的对象的部分或全部,指在向宿主投放时引起免疫反应的物质。可使用肽或整体(溶菌产物)等。作为细菌抗原的对象,可列举但不限于来自*Bacillus anthracis*(炭疽杆菌)、*Bordetella pertussis*(百日咳杆菌)、*Borrelia burgdorferi*(伯氏疏螺旋体)、*Brucella abortus*(流产布鲁氏菌)、*Brucella canis*(犬布鲁氏菌)、*Brucella melitensis*(羊布鲁氏菌)、*Brucella suis*(猪布鲁氏菌)、*Burkholderia mallei*(鼻疽伯克霍尔德氏菌)、*Burkholderia pseudomallei*(类鼻疽伯克氏菌)、*Campylobacter jejuni*(空肠弯曲杆菌)、*Chlamydia pneumoniae*(肺炎衣原体)、*Chlamydia trachomatis*(沙眼衣原体)、*Chlamydophila psittaci*(鹦鹉热嗜衣原体)、*Clostridium botulinum*(肉毒杆菌)、*Clostridium difficile*(艰难梭菌)、*Clostridium perfringens*(产气荚膜梭菌)、*Clostridium tetani*(破伤风芽孢梭菌)、*Corynebacterium diphtheriae*(白喉杆菌)、*Enterococcus faecalis*(粪肠球菌)、*Enterococcus faecium*(屎肠球菌)、*Escherichia coli*(大肠杆菌)、*enterotoxigenic Escherichia coli*(肠毒素性大肠杆菌)、*enteropathogenic Escherichia coli*(致病性大肠杆菌)、*Escherichia coli* 157:H7(大肠杆菌157:H7)、*Francisella tularensis*(土拉热弗朗西斯菌)、*Haemophilus influenza*(流感嗜血杆菌)、*Helicobacter pylori*(幽门螺杆菌)、*Legionella pneumophila*(嗜肺军团菌)、*Leptospira interrogans*(问号钩端螺旋体)、*Listeria monocytogenes*(李斯特菌)、*Mycobacterium leprae*(麻风杆菌)、*Mycobacterium tuberculosis*(结核分支杆菌)、*Mycoplasma pneumoniae*(肺炎支原体)、*Neisseria gonorrhoeae*(淋球菌)、*Neisseria meningitidis*(脑膜炎奈瑟菌)、*Pseudomonas aeruginosa*(铜绿假单胞菌)、*Rickettsia rickettsia*(立克次氏体)、*Salmonella typhi*(伤寒杆菌)、*Salmonella typhimurium*(鼠伤寒杆菌)、*Shigella sonnei*(宋内志贺菌)、*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)、*Staphylococcus epidermidis*(表皮葡萄球菌)、*Staphylococcus saprophyticus*(腐生葡萄球菌)、*Streptococcus agalactiae*(无乳链球菌)、*Streptococcus pneumoniae*(肺炎链

球菌)、*Streptococcus pyogenes* (酿脓链球菌)、*Treponema pallidum* (梅毒螺旋体)、*Vibrio cholerae* (霍乱弧菌) 的抗原。

[0030] 本说明书中“真菌抗原”指:作为欲使之引起免疫反应的对象的真菌的部分或全部,指在向宿主投放时引起免疫反应的物质。可使用肽或整体(溶菌产物)等。真菌抗原的对象可列举但不限定于来自*Aspergillus clavatus* (棒曲霉)、*Aspergillus flavus* (黄曲霉)、*Aspergillus fumigatus* (烟曲霉)、*Aspergillus nidulans* (构巢曲霉)、*Aspergillus niger* (黑曲霉)、*Aspergillus terreus* (土曲霉)、*Blastomyces dermatitidis* (皮炎芽生菌)、*Candida albicans* (白色念珠菌)、*Candida dubliniensis* (杜氏假丝酵母)、*Candida glabrata* (光滑念珠菌)、*Candida parapsilosis* (近平滑假丝酵母)、*Candida rugosa* (皱落假丝酵母)、*Candida tropicalis* (热带假丝酵母)、*Cryptococcus albidus* (浅白隐球酵母)、*Cryptococcus gattii* (格特隐球菌)、*Cryptococcus laurentii* (罗伦隐球酵母)、*Cryptococcus neoformans* (新型隐球菌)、*Histoplasma capsulatum* (荚膜组织胞浆菌)、*Microsporium canis* (犬小孢子菌)、*Pneumocystis carinii* (卡氏肺孢子菌)、*Pneumocystis jirovecii* (耶氏肺孢子菌)、*Sporothrix schenckii* (申克氏孢子丝菌)、*Stachbotrys chartarum* (葡萄穗霉菌)、*Tinea barbae* (须癣)、*Tinea capitis* (头癣)、*Tinea corporis* (体癣)、*Tinea cruris* (股癣)、*Tinea faciei* (面癣)、*Tinea incognito* (伪装癣)、*Tinea nigra* (黑癣)、*Tinea versicolor* (花斑癣)、*Trichophyton rubrum* (红色毛癣菌)、*Trichophyton tonsurans* (断发毛癣菌) 的抗原。

[0031] 本说明书中“免疫异常”指:至少部分性地由于免疫系统的异常而产生或疑似产生的任意疾病、障碍或状态。指由于一些原因使免疫出现异常,变得容易感染感染症或引起过敏反应的状态。免疫异常可列举但不限于过敏症、自身免疫性疾病等。对来自自身的抗原的情况时通常称自身免疫性疾病,对外源性抗原,则称为过敏症。免疫应答强时,对来自自身的抗原,可以会成为自身免疫性疾病状态,对非自身抗原,可以成为过敏状态;另一方面,免疫应答弱时,对自身的抗原,可以成为癌症状态,对非自身的抗原,可以成为感染症。

[0032] 本说明书中“感染症”可以是任意的感染症,包括病毒感染症(包括单链或双链的DNA病毒、RNA病毒等任意的病毒形态)、细菌感染症、原虫感染症、支原体感染症等任意感染症的种类,例如可以是:结核、冠状病毒、疟疾、黄热病毒、天花病毒、牛痘、麻疹/风疹、脊髓灰质炎、流行性腮腺炎(腮腺炎)/MUMPS、轮状病毒感染、水痘、黄热病、埃博拉、西尼罗河热、B型流感嗜血杆菌(Hib)感染、肺炎球菌感染、百日咳、日本脑炎、脑膜炎奈瑟氏菌感染、沙门氏菌感染、病原性大肠菌、弓形虫、寨卡病毒、疱疹病毒1型、EBV/爱泼斯坦-巴尔病毒(疱疹病毒4型)、CMV/巨细胞病毒(疱疹病毒5型)、流感、MARS、狂犬病以及白喉等。

[0033] 本说明书中所谓“癌症”以与本领域中通常所使用的相同的含义使用,指:异型性强,比正常细胞增值更快,对周围组织能破坏性浸润或能引起转移的恶性肿瘤或类似的恶性肿瘤存在的状态。本发明中,癌症包括但不限于实体癌症以及造血器官肿瘤,本说明书中“新生物”和“肿瘤”可互换使用。癌症、新生物、肿瘤不仅包括实体新生物,而且也包括造血系统新生物。新生物的例子包括但不限于:黑色素瘤、非小细胞肺、小细胞肺、肺、肝癌、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、牙龈、舌、白血病、神经母细胞瘤、头部、颈部、胸部、胰腺、前列腺、肾脏、骨、睾丸、卵巢、间皮瘤、肉瘤、宫颈、胃肠道、淋巴瘤、脑、结肠、膀胱、骨髓瘤,或其他恶性或良性新生物。更具体而言,新生物还可以是选自急性骨髓性

白血病、急性淋巴细胞白血病、骨髓增生异常综合征、慢性粒单核细胞白血病、幼年型粒-单核细胞白血病、多发性骨髓瘤以及慢性淋巴性白血病组成的群组中的造血系统新生物。

[0034] 本说明书中“自身免疫性疾病”指：检测出对自身成分（例如免疫球蛋白等）的自身抗体（例如抗Sm抗体、抗dsDNA抗体、风湿病因素）、自身免疫参与病情的疾病。作为自身免疫性疾病可列举但不限于：脏器特异性自身免疫性疾病（例如慢性甲状腺炎、原发性粘膜水肿、甲状腺中毒症、恶性贫血、肺出血肾炎综合征（Goodpasture syndrome）、急性进行性肾小球肾炎、重症肌无力、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮、胰岛素抵抗型糖尿病、青少年型糖尿病、阿狄森病、萎缩性胃炎、男性不育症、早发性更年期、晶状体源性葡萄膜炎、交感神经炎、多发性硬化症、溃疡性结肠炎、原发性胆汁性肝硬化、慢性活动性肝炎、自身免疫性溶血性贫血、发作性血尿、突发性血小板减少性紫癜以及干燥综合征等），以及脏器非特异性自身免疫性疾病（例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮（SLE）、盘状红斑狼疮、多发性肌炎、硬皮病、混合性结缔组织病等）。类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、盘状红斑狼疮、多发性肌炎、硬皮病和混合性结缔组织病已作为胶原性疾病为人所知。即，胶原性疾病包括在全身性自身免疫性疾病中。

[0035] 本说明书中“过敏症”指：对特定的非自身抗原产生的过度免疫反应，是对“过敏源”发生免疫反应的疾病。“过敏源”指：能与患有过敏症疾病的受试体的抗体发生反应的抗原，作为例子可列举但不限于：来自树木类花粉的过敏源（洋槐、桤木、白蜡（*Fraxinus lanuginosa f. veltina*）、欧洲山毛榉、白桦、枫树、山杉、红雪松、欧洲山杨、柏树、美国榆树、榔榆、黄杉、橡胶树、桉树、朴树、山核桃树、美国紫杉树、糖槭树、牧豆树、构树、栎树属、橄榄树、美国山核桃、胡椒树、松树、水蜡树、俄罗斯橄榄树、美国梧桐、臭椿、黑胡桃树、黑柳等）、来自草木类花粉的过敏源（棉花、狗牙根、肯塔基蓝草、雀麦草、玉米、牛尾草、石茅、野燕麦、鸭茅、小糠草、黑麦草、水稻、黄花茅、梯牧草、苜蓿、藜、苍耳、羊蹄、北美一枝黄花、地肤、白藜、金盏花、荨麻、青稞、长叶车前草、三裂叶豚草、豚草、多年生豚草、风滚草、山地蒿、金雀花、小酸模等）、来自昆虫的过敏源（蚕、螨虫、蜜蜂、黄蜂、蚂蚁、蟑螂等）、来自菌类的过敏源（交链孢霉、曲霉菌、肉毒杆菌、念珠菌、头孢属、弯孢属、表球菌、表皮菌、镰刀菌属、长蠕孢属、连锁枝孢菌、毛霉菌、青霉菌、茎点霉属、出芽茁霉（*Pullularia pullulans*）、根霉菌等）、来自动物毛发的过敏源（狗、猫、鸟等）、来自灰尘（House dust）的过敏源蛋白质、来自食物的过敏源（OVA等）等。“过敏症”的代表性疾病，可列举特异性皮炎、过敏性鼻炎（花粉症等）、过敏性结膜炎、过敏性胃肠炎、支气管哮喘、小儿哮喘、食物过敏、药物过敏或荨麻疹等。

[0036] 本说明书中“炎症性疾病”指：以异常炎症（例如与未患病的健康人等的对照相比较的炎症水平上升）为特征的疾病或状态。作为炎症性疾病的非限定性例子，可举出：特异性反应、哮喘、自身炎症性疾病、过敏症、儿童过敏性哮喘、过敏性哮喘、炎症性肠病、乳糜泻、克罗恩氏病、结肠炎、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、憩室炎、肠易激综合征、短肠综合征、盲襻综合征、慢性持续性腹泻、婴儿顽固性腹泻、旅行者腹泻、免疫增殖性小肠疾病、慢性前列腺炎、肠炎后综合征、热带性口炎性腹泻、惠普尔病、沃尔曼病、关节炎、类风湿性关节炎、白塞病、葡萄膜炎、坏疽性脓皮病、结节性红斑、创伤性脑损伤、关节病型牛皮癣关节炎、幼年特发性关节炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮（SLE）、重症肌无力、青少年型糖尿病、1型糖尿病、吉兰-巴雷综合症、桥本氏脑病、桥本甲状腺炎、强直性脊

柱炎、牛皮癣、干燥综合征、血管炎、肾小球肾炎、自身免疫性甲状腺炎、大疱性类天疱疮、结节病、鱼鳞癣、格雷夫斯眼病、阿狄森病、白癜风、寻常性痤疮、盆腔炎性疾病、再灌注损伤、肉样瘤病、移植物排斥反应、间质性膀胱炎、动脉粥样硬化症和特应性皮炎。

[0037] 本发明的技术的适用中,还应考虑HLA限制性。当细胞毒性(杀伤性)(killer)T细胞识别疾病因素,并通过杀伤行为将其排除时,能确定杀伤性T细胞所识别的来自疾病因素抗原的肽与HLA I类分子的复合体,并可以使用此类信息。在特定的疾病因素中,有共同的抗原所具有的共同HLA型,可将该方法用于确定本发明的树突状细胞制剂的特定人群中所用的抗原肽。使该特定的HLA型的转基因小鼠对这些合成肽免疫后,可确定能诱导杀伤性T细胞的免疫应答的肽,并可对此加以利用。利用同样的方法和HLA抗原的Tgm,可确定来自与日本人群中出现频率最高的HLA的特定分子相结合的疾病因素的抗原的肽,该方法可用于确定本发明的树突状细胞制剂的特定人群中所用的抗原肽(方法可参照以下:Chen, Y.-Z., Liu, G., Senju, S., Wang, Q., Irie, A., Haruta, M., ... Nishimura, Y. (2010). Identification of SARS-COV Spike Protein-Derived and HLA-A2-Restricted Human CTL Epitopes by Using a New Muramyl Dipeptide-Derivative Adjuvant. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 165-177. <https://doi.org/10.1177/039463201002300115>)。利用此信息,可确定与有助于疾病因素的排除的杀伤性T细胞所识别的特定的HLA型(对于特定的物质以外的HLA型,通过其他途径特定来确定的物质所特有的HLA型)相结合的病毒抗原,如果使用从表达这些HLA的人类ES细胞使用分化诱导的方法制造的本发明的树突状细胞疫苗,则可以抗原特异性地活化杀伤性T细胞,有望防止因细胞因子风暴等导致的重症化。本发明中所用的代表性的抗原肽可以是HLA限制性的,也可以是HLA非限制性的。设为限制性时,即使用单肽等也可应对,设为非限制性时,优选使用overlap(重叠)的多个肽、或对病毒核酸进行电穿孔(electroporation)。

[0038] 此外,T细胞中大概分类时存在两种类型,CD8+T细胞和CD4+T细胞。这两种T细胞所识别的抗原本质上是不同的。CD8+T细胞识别与被称为I类种类的HLA(MHC)结合的、代表性以9个氨基酸组成的肽。另一方面,CD4+T细胞识别与被称为II类的MHC结合的肽。与HLA(MHC)II类结合的肽的长度,例如被认为是15~24个(但不限于此)氨基酸。HLA(MHC)I类分子在所有体细胞中表达,并使自身细胞所产生的蛋白质片段结合而呈递。HLA(MHC)II类分子在巨噬细胞和树突状细胞等抗原呈递细胞和B细胞等有限的细胞中表达。通常与体细胞不同,抗原呈递细胞从外界获取蛋白质并分解后,与HLA(MHC)I类、II类分子结合而呈递。因此,CD8+T细胞主要识别体细胞上的内源性HLA(MHC)I类限制性抗原,CD4+T细胞识别抗原呈递细胞上的外来性HLA(MHC)II类限制性抗原。人类中,MHC I类是HLA A、B、C,MHC II类是HLA DR、DQ、DP。

[0039] 本说明书中的“药物(组合物)”的剂型没有特别限定,可以是固体状、半固体状、或液态制剂的任意种,可根据其利用目的等选择。细胞制剂的情况时,通常作为液态制剂提供,但也可以冷冻或冷冻干燥后提供。作为药物组合物的剂型,例如可举出第十七次修订日本药典制剂总则或各国的等同物中记载的剂型。

[0040] 本说明书中“疫苗”指:包含抗原或细胞并投放于生物体内能够产生抗体的因素、能增强细胞性免疫能力的因素,或指能产生该因素的物质。所谓抗原指被选择的物质,指用

于在人类等脊椎动物中诱发针对该物质的免疫应答的组合物。

[0041] 本说明书“药剂”、“剂”或“因素”(均相当于英语中的agent)在广义上可互换使用,只要能达成所图的目的,就可以是任意物质或其他要素(例如光、放射能、热、电等能量)。作为这样的物质,可举例但不限于:蛋白质、多肽、寡肽、肽、多核苷酸、寡核苷酸、核酸(例如包括cDNA、基因组DNA之类的DNA、mRNA之类的RNA)、多糖、寡糖、脂质、有机低分子(例如激素、配位基、信息传递物质、有机低分子、通过组合化学合成的分子,可作为药品使用的低分子(例如低分子配位基等)等)、这些复合分子。

[0042] 本说明书中“治疗”指:治愈或改善疾病或症状,或抑制症状。成为这种状态时,指防止这样的疾病或障碍的恶化,优选指维持现状,更优选指减轻,进一步优选指使之消退,包括能发挥患者的疾病或伴随疾病的1个以上的症状的症状改善效果或预防效果。事先诊断并进行适当治疗称为“伴随治疗”或“定制治疗”,将为此所用的诊断药有时称为“伴随诊断药”。

[0043] 本说明书中“预防”指:在疾病或症状显现之前防止。

[0044] 本说明书中“处置”指:对疾病或症状的任意处置,包括治疗和预防。

[0045] 本说明书中“诊断”指:确定与受试体的疾病、障碍、状态(例如癌症、病毒感染等)等相关的各种参数,判定这样的疾病、障碍、状态的现状或未来。通过使用本发明的方法、装置、系统,可检查体内的状态,使用这样的信息,可选定受试体的疾病、障碍、状态、用于应给予的处置或预防的处方物或方法等的各种参数。本说明书中,狭义而言“诊断”指对现状的诊断,广义而言包括“早期诊断”、“预测诊断”、“事前诊断”等。原则上,本发明的诊断方法可以利用从身体出来的物质,可以不由医师等医疗从业者实施,因而在产业上是有用的。本说明书中,为了明确可以不由医师等医疗从业者实施,特地将“预测诊断、事前诊断或诊断”有时称为“支援”。

[0046] 本说明书中“受试体(者)”指:成为本发明的诊断或检测、治疗等的对象的对象(例如人等生物或从生物中取出的细胞、血液、血清等)。

[0047] 本说明书中“试样”指:从受试体等得到的任意物质,例如包括血清等。本领域技术人员可根据本发明的记载适当选择优选的试样。

[0048] 本说明书中“套盒(kit)”指:通常分为2个以上的部分来提供了应提供的部分(例如检查药、诊断药、治疗药、抗体、标识、说明书等)的单元。为确保稳定性等,不应被混合而提供,在以提供优选在使用前混合然后使用这样的组合物为目的时,优选这种套盒的形式。这样的套盒优选为具备所提供的部分(例如如何使用检查药、诊断药、治疗药,或应如何处理药物)的指示书或说明书是有利的。本说明书中的套盒作为试剂盒(reagent kit)使用时,套盒中通常包含记载了检查药、诊断药、治疗药、抗体等的使用方法等的指示书等。

[0049] 本说明书中“指示书”指:对医师或其他使用者记载使用本发明的方法的说明的材料。该指示书中记载有本发明的检测方法、诊断药的使用方法、或指示给药等内容的词句。此外,指示书中也可记载指示经口、食道给药(例如通过注射等)等给药部位的词句。该指示书中,根据实施本发明的国家的监管部门(例如,在日本为厚生劳动省,在美国为食品药品监督管理局(FDA)等)所规定的格式制作,并明确记载受到其监管部门的批准。指示书是所谓的附页资料(package insert),通常以纸媒介提供,但不限于此,例如也可通过电子介质(例如通过互联网提供的主页、电子邮件)等形态提供。

[0050] 本说明书中“功能性等效物”指：针对作为对象的实体，目标功能相同但结构不同的任意物质。因此，应理解为：“疾病相关因素”或其一部分的功能性等效物虽然不是疾病相关因素或其一部分自身，但是疾病相关因素或其一部分的变异体或改变体（例如核酸类似物、氨基酸序列改变体等），可以变为具有疾病相关因素或其一部分具有的生物学作用的物质、以及在作用的时刻，可以变为疾病相关因素或其一部分自身或该疾病相关因素或其一部分的变异体或改变体（例如，编码疾病相关因素或其一部分自身或疾病相关因素或其一部分的变异体或改变体的核酸，以及包括包含有核酸的载体、病毒、脂质体、细胞等）。本发明中，疾病相关因素或其一部分的功能性等效物，即使不做特别说明，也应理解为与疾病相关因素或其一部分相同。功能性等效物可通过数据库检索发现。本说明书中“检索”指：通过电子或生物学或其他方法，利用某种核酸碱基序列，发现具有特定功能性和/或性质的其他核酸碱基序列。电子检索可列举但不限于：BLAST (Altschul et al., J.Mol.Biol.215:403-410 (1990))、FASTA (Pearson&Lipman, Proc.Natl.Acad.Sci., USA 85:2444-2448 (1988))、Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J.Mol.Biol.147:195-197 (1981))、以及Needleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J.Mol.Biol.48:443-453 (1970))等。生物学检索可列举但不限于：严格杂交 (stringent hybridization)、将基因组DNA粘贴在尼龙膜等上的微阵列 (micro array) 或粘贴在玻璃板上的微阵列 (micro array assay)、PCR以及原位杂交等。本说明书中，本发明中所用的基因中也包括通过上述电子检索、生物学检索所确定的对应基因。

[0051] 本说明书中“蛋白质”、“多肽”、“寡肽”以及“肽”在本说明书中以相同含义使用，指任意长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是直链也可以有支链，还可以是环状。氨基酸可以是天然氨基酸，也可以是非天然氨基酸，还可以是被改变的氨基酸。该用语也可以包括装配在多个多肽链的复合体上的物质。该用语还包括天然或人工改变的氨基酸聚合物。此类改变例如包括形成硫醚键、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任意其他操作或改变（例如与标识成分结合体化）。该定义中还包括例如包含1个或2个以上的氨基酸的相似物的多肽（例如包含非天然氨基酸等）、肽样化合物（例如肽）以及本领域中公知的其他改变。本说明书中，“氨基酸”是具有氨基和羧基的有机化合物的总称。当本发明的实施方式的抗体包含“特定的氨基酸序列”时，该氨基酸序列中的任意一个氨基酸都可被化学修饰。此外，该氨基酸序列中的任意一个氨基酸也可以形成盐或溶剂化物。此外，该氨基酸序列中的任意一个氨基酸可以是L型或D型。这些情况时，可以说本发明的实施方式的蛋白质包含上述“特定的氨基酸序列”。作为蛋白质中所包含的氨基酸在生物体内受到的化学修饰，已知的有例如N末端修饰（例如酰基化、肉豆蔻基化等）、C末端修饰（例如酰胺化、糖基磷脂酰肌醇加成等）、或侧链修饰（例如磷酸化、糖链加成等）等。只要满足本发明的目的，氨基酸可以使天然的也可以是非天然的。

[0052] 本说明书中“多核苷酸”、“寡核苷酸”以及“核酸”在本说明书中以相同含义被使用，指任意长度的核苷酸的聚合物。该用语还包括“寡核苷酸衍生物”或“多核苷酸衍生物”。“寡核苷酸衍生物”或“多核苷酸衍生物”指：包括核苷酸的衍生物，或核苷酸之间的键与通常不同的寡核苷酸或多核苷酸，可互换使用。作为这样的寡核苷酸，具体地可例示2'-O-甲基-核糖核苷酸、寡核苷酸中的磷酸二酯键被变换为硫代磷酸酯键的寡核苷酸衍生物、寡核苷酸中的磷酸二酯键被变换为N3'-P5'-磷酰胺键的寡核苷酸衍生物、寡核苷酸中的核糖和

磷酸二酯键被变换为肽核酸键的寡核苷酸衍生物、寡核苷酸中的尿嘧啶被C-5丙炔基尿嘧啶取代的寡核苷酸衍生物、寡核苷酸中的尿嘧啶被C-5噻唑尿嘧啶取代的寡核苷酸衍生物、寡核苷酸中的胞嘧啶被C-5丙炔基胞嘧啶取代的寡核苷酸衍生物、寡核苷酸中的胞嘧啶被吩恶嗪修饰的胞嘧啶(phenoxazine-modified cytosine)取代的寡核苷酸衍生物、DMA中的核糖被2'-O-丙基核糖取代的寡核苷酸衍生物以及寡核苷酸中的核糖被2'-甲氧基乙氧基核糖取代的寡核苷酸衍生物等。除非另有说明,否则,特定的核酸序列与明示的序列同样地包含其保守性修饰的改变体(例如简并密码子取代物)和互补序列。具体而言,简并密码子取代物可以通过制作1个或以上的选择的(或全部的)密码子的第3个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代而成的序列来实现(Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。本说明书中“核酸”还可与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸、以及多核苷酸互换地使用。本说明书中“核苷酸”可以是天然的也可以是非天然的。

[0053] 本说明书中“基因”指:决定遗传性状的因素,“基因”有时指“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”。

[0054] 本说明书中基因的“相同性”指:2个以上的基因序列的对于彼此的同一性的程度,一般具有“相同性”指:同一性或类似性的程度高。因此,某2个基因的相同性越高,其序列的同一性或相似性就越高。2种基因是否具有相同性,可通过将序列直接比较来检查,或者,若是核酸的情况,则可通过在严格条件下杂交法来检查。在将2种基因序列直接比较时,其基因序列间的DNA序列中,代表性地至少有50%相同时、优选至少70%相同时、更优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同时,这些基因具有相同性。因此,本说明书中的“相同体”或“相同基因产物”,意味着发挥与本说明书中进一步记载的复合体的蛋白质构成要素相同的生物学功能的其他种的蛋白质,优选意味着哺乳动物的蛋白质。此类相同体有时又被称为“直系同源基因产物”。只要符合本发明的目的,可理解为也可使用此类相同体、相同基因产物、直系同源基因产物等。

[0055] 在本说明书中,可由通常公知的3字母符号或根据IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission推荐的单字母符号表示氨基酸。核苷酸也同样地可以用通常认知的单字母符号表示。本说明书中,氨基酸序列和碱基序列的类似性、同一性以及相同性的比较可用序列分析工具BLAST,使用缺省参数算出。同一性的检索,例如可使用NCBI的BLAST 2.2.28(可以是2013.4.2发行的或者比之更新的)进行。本说明书中的同一性的值通常使用上述BLAST,指缺省条件下校正后的值。然而,通过变更参数来得到更高的值时,取最大值作为同一性的值。在多个领域评价同一性时,取其中的最大值作为同一性的值。类似性是除了同一性外对类似的氨基酸也计算的数值。

[0056] 本发明的一实施方式中“多个”指:可以是例如8、7、6、5、4、3或2个,也可以是这些中的任一个值以下。已知1个或多个氨基酸残基的缺失、加成、插入、或被其他氨基酸取代的多肽可以维持其生物学活性(Mark et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984Sep; 81(18): 5662-5666.、Zoller et al., *Nucleic Acids Res.* 1982Oct 25; 10(20): 6487-6500.、Wang et al., *Science.* 1984Jun 29; 224(4656): 1431-1433.)。通过用缺失等的适当方法测定活性,可以判定是否为功能性等效物。

[0057] 本发明的一实施方式中“90%以上”指:可以是例如90、95、96、97、98、99、或100%

以上,也可以在这些之中任意2个值的范围内。上述“相同性”是可按照本领域中公知的方法计算确定2个或多个氨基酸序列中相同的氨基酸数的比例。计算确定比例前,将比较的氨基酸序列组的氨基酸序列对齐,如需要使同一氨基酸的比例最大化,则在氨基酸序列的一部分中引入间隙。用于对齐的方法、比例的计算方法、比较方法、及这些相关的计算机程序是本领域以往所熟知的(例如BLAST、GENETYX等)。本说明书中的“相同性”,只要没有特别说明,则可以用NCBI的BLAST测定的值表示。通过BLAST比较氨基酸序列时的算法,可通过设定缺省来使用Blastp。测定结果作为Positives或Identities被数值化。

[0058] 本发明的物质可以是提纯后的物质,本说明书中的“提纯后的”物质或生物学因素(例如核酸或蛋白质等)指:天然伴随该物质或生物学因素的至少一部分物质被除去后的物质。因此,通常,提纯后的生物学因素中的该生物学因素的纯度比该生物学因素通常存在的状态更高(即被浓缩)。本说明书中所用的用语“提纯后的”指:存在优选为至少75重量%、更优选为至少85重量%、更进一步优选为至少95重量%、最优选为至少98重量%的同类型生物学因素。本发明中所用的物质或生物学因素优选为“提纯后的”物质。本说明书中所用的“分离出的”物质或生物学因素(例如核酸或蛋白质等)指:天然伴随该物质或生物学因素的物质被实质性去除后的物质。本说明书中所用的用语“分离出的”根据其目的而变化,因此不一定必须用纯度表示,但必要时,意味着存在优选为至少75重量%、更优选为至少85重量%、更进一步优选为至少95重量%、最优选为至少98重量%的同类型生物学因素。本发明中用的物质优选的是“分离出的”物质或生物学因素。

[0059] 本说明书中“对应的”氨基酸或核酸或部分指:某多肽分子或多核苷酸分子(例如编码刺突蛋白(spike protein)的多核苷酸等)中,具有与作为比较的基准的多肽或多核苷酸中的规定的氨基酸或核苷酸或部分相同的作用或被预测到具有相同作用的氨基酸或核苷酸,特别是酶分子时,指存在于活性部位中的相同位置、对催化剂活性做出同样的贡献的氨基酸,复合分子时,指对应的部分(例如肝素硫酸等)。例如,若是反义(antisense)分子,则可以是与该反义分子的特定部分对应的直系同源基因中的相同部分。对应的氨基酸,例如可以是进行了半胱氨酸化、谷胱甘肽化、S-S键形成、氧化(例如蛋氨酸侧链的氧化)、甲酰基化、乙酰基化、磷酸化、糖链加成、肉豆蔻基化等的特定的氨基酸。或者,对应的氨基酸可以是承担二聚体化的氨基酸。这样的“对应的”氨基酸或核酸可以是遍及一定范围的区域或区(domain)。因此,这种情况时,在本说明书中被称为“对应的”区域或区。这种对应的区域或区,在本说明书中设计复合分子时是有用的。

[0060] 本说明书中“对应的”基因(例如多核苷酸序列或分子)指:在某物种中,具有与作为比较基准的物种中的规定的基因相同的作用,或被预测到具有相同作用的基因(例如多核苷酸序列或分子),当存在多个具有这种作用的因素存在时,指具有与进化学上相同起源的基因。因此,与某基因对应的基因可以是该基因的直系同源(ortholog)。因此,人类的特定的基因,分别可以在其他动物(特别是哺乳动物)中找出对应的特定的基因。此类对应的基因可用本领域公知的技术确定。因此,例如,对于某种动物(例如小鼠)中对应的基因,成为对应的基因的基准的基因(例如S蛋白质等),可将成为基准的基因的序列作为查询序列,在含有该动物的序列的数据库中检索来发现。

[0061] 本说明书中“片段”(fragment)指:对于全长多肽或多核苷酸(长度为n),具有1~n-1为止的序列长度的多肽或多核苷酸。片段的长度可根据其目的适当变更,例如其长度的

下限,多肽的情况时,可列举3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50及以上的氨基酸,此处以未具体列举的整数表示的长度(例如11等),作为下限也可以是适合的。此外,多核苷酸的情况时,可列举5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100及以上的核苷酸。此处以未具体列举的整数表示的长度(例如11等),作为下限也可以是适合的。本说明书中,这样的片段,例如当完整长度的物质作为标志物或靶标分子发挥功能时,只要其片段自身也具有标志物或靶标分子的功能,就可理解为也属于本发明的范围内。

[0062] 根据本发明,用语“活性”在本说明书中指:最广义上的分子的功能,可在功能性等效物的评价中参考。活性没有特别限定,但通常包括分子的生物学功能、生物化学功能、物理功能或化学功能。活性例如包括酶活性,与其他分子相互作用的能力,以及对其他分子的功能进行活化、促进、稳定化、阻碍、抑制或不稳定化的能力、稳定性、在特定的细胞内位置局部存在的能力。在可适用的情况时,此用语还涉及最广义上的蛋白质复合体的功能。

[0063] 本说明书中“生物学功能”指:提及某基因或其相关的核酸分子或多肽时,该基因、核酸分子或多肽在生物体内可以具有的特定功能。其中,例如可列举但不仅限于:特异性的抗体的生成、酶活性、赋予抵抗性等。本说明书中,生物学功能可通过“生物学活性”发挥。本说明书中“生物学活性”指:某因素(例如多核苷酸、蛋白质等)在生物体内具有的活性,包括发挥各种功能(例如引发滤泡性T细胞的能力)的活性,例如也包括通过与某分子的相互作用而使其他分子活化或钝化的活性。2个因素相互作用时,其生物学活性可以是其两分子间的键及其导致的生物学变化,而且例如当使用抗体使1个分子沉淀时其他分子也共沉淀时,则被认为2个分子相互结合。因此,观察此类共沉淀是可列举的一种判断方法。例如,某因素为酶时,其生物学活性包括其酶活性。在其他例子中,某因素是配位基时,包括该配位基与其对应的受体的结合。此类生物学活性可通过本领域公知的技术测定。因此,“活性”指:展示或揭示结合(直接或间接的任意一种);影响(即具有对某些暴露或刺激有应答的可测定的影响)应答的各种可测定的指标,例如可列举与本发明的多肽或多核苷酸直接结合的化合物的亲和性,或例如各种某些刺激或事件后的上游或下游的蛋白质的量或其他类似功能的尺度。

[0064] 本说明书中,基因、多肽、多核苷酸等的“表达”指:该基因等在生物体内受到一定作用后转变为其他形态的现象。优选为:基因、多核苷酸等被转录或翻译后,转变为多肽的形态,但转录后被制成mRNA也是表达的一种形态。因此,本说明书中“表达产物”指:包括此类的多肽或蛋白质或mRNA。更优选的是,此类的多肽的形态还可以是在翻译后接受处理(processing)后的物质。

[0065] 作为本发明的功能性等效物,可使用在氨基酸序列中1个或多个氨基酸插入、取代或缺失、或在其一侧末端或两侧末端上加成后的产物。本说明书中,“在氨基酸序列中1个或多个氨基酸插入、取代或缺失、或在其一侧末端或两侧末端上加成”指:通过部位特异性突变诱发法等公知的技术方法,或通过天然的变异可天然产生的程度的多个数目的氨基酸的取代等而产生改变。改变的氨基酸序列,例如可以是1~30个、优选1~20个、更优选1~9个、进一步优选1~5个、特别优选1~2个氨基酸的插入、取代或缺失、或在其一侧末端或两侧末端上加成后的产物。改变的氨基酸序列优选其氨基酸序列是在病毒的S蛋白质等氨基酸序列中具有1个或多个(优选1或多个或1、2、3或4个)的保守性取代的氨基酸序列。此处“保守性取代”指:以不实质性地改变蛋白质的功能地用其他化学上类似的氨基酸残基取代1个或

多个氨基酸残基。例如,可列举用其他疏水性残基取代某疏水性残基的情况、通过具有相同电荷的其他极性残基取代某极性残基的情况等。每种氨基酸的可进行此类取代的功能上类似的氨基酸中,每个氨基酸是本领域公知的。若具体举例,作为非极性(疏水性)氨基酸,可举出丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸等。作为极性(中性)氨基酸,可列举甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸等。作为具有正电荷(碱性)的氨基酸,可列举精氨酸、组氨酸、赖氨酸等。具有负电荷(酸性)的氨基酸,可列举天冬氨酸、谷氨酸等。

[0066] (优选的实施方式)

以下对本发明的优选的实施方式进行说明。以下提供的实施方式是为了更好地理解本发明而提供的,本发明的范围不应被限定于以下内容。因此,本领域技术人员可参考本说明书中的记载,在本发明的范围内做适当改变是很清楚的。此外,本发明的以下实施方式可单独使用,也可将它们组合使用。

[0067] 本发明涉及一种用于评价受试体的疾病的方法及与其相关的组合物、系统、程序、存储其的程序等任意的医疗技术,所述方法包括对与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤。

[0068] 本发明中,本发明的医疗技术进一步包括根据对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的测定结果,进行选自由上述疾病履历的评价、对上述疾病的预防剂或疫苗的有效性的评价、对上述疾病的治疗剂的有效性的评价、对再次罹患上述疾病的防御能力的评价、上述疾病的病情评价以及上述疾病的罹患风险评价所组成的群组中的至少1种的步骤。

[0069] 一实施方式中,这些评价包括但不限于:例如感染履历的评价、疫苗有效性评价(有无Tfh诱导)、再次感染防御能力的评价、癌症免疫药物(免疫检查点等)有效性的评价、伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价(未患病时)、病情评价等。

[0070] 在一方面,本发明提供一种对疾病有特异性的滤泡性T细胞的生产方法,所述方法包括确定具有引发对某疾病的疾病相关因素特异性的滤泡性T细胞的能力的疾病相关因素或其一部分的工序,使用该疾病相关因素或其一部分引发对疾病有特异性的滤泡性T细胞的工序,以及得到对该疾病特异性的滤泡性T细胞的工序。

[0071] 在一方面,本发明提供一种筛选对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的方法,所述方法包括:A)提供滤泡性T细胞集团的工序、B)使该滤泡性T细胞集团与疾病相关因素接触的工序、C)测定该滤泡性T细胞的对该疾病相关因素或其一部分或功能性等效物的反应性的工序、D)在该滤泡性T细胞集团中,选择对该疾病相关因素显示出规定值以上的反应性的滤泡性T细胞的工序。

[0072] 在一实施方式中,A)提供滤泡性T细胞集团的工序,可通过从受试体采血或活检等来进行。

[0073] 在一实施方式中,B)使该滤泡性T细胞集团与疾病相关因素或其一部分或功能性等效物接触的工序,可通过以下方式进行:例如向培养有滤泡性T细胞集团的培养液中添加疾病相关因素或其一部分或功能性等效物,此后根据需要进行培养、培育(incubation)或静置。

[0074] 在一实施方式中,C)测定该滤泡性T细胞对该疾病相关因素或其一部分或功能性

等效物的反应性的工序,可通过ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析来实施。

[0075] 在一实施方式中,规定值可以是未患病的受试体中的滤泡性T细胞对疾病相关因素或其一部分或功能性等效物的反应性的平均值或中位数。

<诊断>

[0076] 在一实施方式中,本发明提供一种用于疾病的检查或诊断的方法,所述方法包括对与疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤。

[0077] 在另一方面,本发明提供一种用于对受试体的疾病进行试验的方法,所述方法包括对与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,以及将该水平或量与规定的基准相比较的步骤。在一部分实施方式中,规定的基准可以是健康人的滤泡性T细胞的水平或量的平均值或中位数。其他实施方式中,规定的基准可以是论文的参考值。

[0078] 在另一方面,本发明提供一种用于评价疾病的感染履历的方法、一种用于疾病的疫苗有效性评价、再次感染防御能力的评价的方法、一种用于进行疾病的癌症免疫药物(免疫检查点等)有效性评价的方法或一种用于进行伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价(未患病时)、病情评价的方法。这些方法包括对与疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤。

[0079] 在一部分实施方式中,上述测定也可以通过ELISPOT、流式细胞术、外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激试验、新一代测序仪/基因检查(组库分析)、免疫染色(病理组织检查)、原位分析进行。

[0080] 在一实施方式中,对与疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的测定,例如可以如下所述地实施。

[0081] 可以使来自受试体的外周血与含有感染源特异性表位的探针接触,通过ELISPOT或流式细胞仪测定与探针结合的外周血中的滤泡性T细胞的量,ELISPOT或流式细胞仪在本说明书中的其他位置有示例。

[0082] 可使用本发明中所用的ELISPOT。此处所用的ELISPOT测定中,使用涂布了可检测滤泡性T细胞所产生的IL-21的抗体的板。将外周血单个核细胞(PBMC)添加入孔中,使用来自感染源的抗原刺激36小时。所分泌的IL-21与处于产生细胞的周边的捕获用抗体结合。通过清洗去除细胞后,添加用于检测的细胞因子抗体,检测斑点。作为阴性对照,在不利用来自感染源的抗原的刺激的情况下进行测定。

[0083] 本发明中可利用流式细胞仪,其使用来自感染源的抗原对外周血单个核细胞(PBMC)刺激36小时。进行FSC SSC gating、PI negative gating、CD3 positive gating、CD4, CXCR5的double positive分级,和/或进一步与来自感染源的抗原结合的HLA四聚体的triple positive分级的FCM分析。与作为阴性对照的不施加来自感染源的抗原的刺激样品进行比较。

[0084] 在特定的实施方式中,通过将测定的对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量与规定值(例如阴性对照的测定值或健康人的测定值)进行比较,可以对疾病进行检查或诊断。

[0085] 在另一方面,本发明提供一种用于评价疾病的感染履历的方法,所述方法包括对

疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤。虽然基于抗体评价感染履经常进行,但由于特异性免疫细胞与抗体相比维持更长时间,因此在调查感染履历方面,确定感染源特异性的免疫细胞是有益的。

[0086] 在疾病的感染履历的评价的一实施方式中,对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的测定,例如可如下所述地实施。

可使来自受试体的外周血与含有感染源特异性表位的探针接触,通过ELISPOT或流式细胞仪测定与探针结合的外周血中的滤泡性T细胞的量,ELISPOT或流式细胞仪在本说明书中的其他位置有示例。

[0087] 在特定的实施方式中,通过对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量与规定值(例如阴性对照的测定值或健康人的测定值)作比较,可以评价疾病的感染履历。

[0088] 在另一方面,本发明提供一种用于评价疾病的疫苗有效性、评价再感染防御能力的方法,所述方法包括对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量测定的步骤。特异性免疫细胞与抗体相比维持更长时间,在再感染时能迅速应答方面,可评价免疫细胞的防御能力。

[0089] 在测定对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的一实施方式中,对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的测定,例如可如下所述地实施。

[0090] 可以使来自受试体的外周血与含有感染源特异性表位的探针接触,通过ELISPOT或流式细胞仪测定与探针结合的外周血中的滤泡性T细胞的量,ELISPOT或流式细胞仪在本说明书中的其他位置有示例。

[0091] 在特定的实施方式中,通过将测定的对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量与规定值(例如阴性对照的测定值或健康人的测定值)进行比较,可以评价疾病的疫苗有效性、再感染防御能力。

[0092] 在另一方面,本发明提供一种用于评价疾病的癌症免疫药物(免疫检查点等)有效性的方法,所述方法包括对癌症相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤。

[0093] 在测定对癌症相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的一实施方式中,对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的测定,例如可如下所述地实施。

[0094] 可使来自受试体的外周血与含有感染源特异性表位的探针接触,通过ELISPOT或流式细胞仪测定与探针结合的外周血中的滤泡性T细胞的量,ELISPOT或流式细胞仪在本说明书中的其他位置有示例。

[0095] 在特定的实施方式中,通过将测定的对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量与规定值(例如阴性对照的测定值或健康人的测定值)进行比较,可以评价疾病的癌症免疫药物(免疫检查点等)的有效性。

[0096] 在特定的方面,本发明提供一种用于伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价(未患病时)、病情评价的方法。伴随自身抗体的自身免疫性疾病很多,其中在被认为自身抗体具有病原性的疾病(例如ANCA相关性血管炎)中,与生产自身抗体的B细胞相互作用的滤泡性T细胞的有无、增减,被认为与伴随B细胞的成熟的发病和病情恶化/复发有关。

[0097] 在测定对自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的一实施

方式中,对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的测定,例如可如下所述地实施。

[0098] 可使来自受试体的外周血与含有感染源特异性表位的探针接触,通过ELISPOT或流式细胞仪测定与探针结合的外周血中的滤泡性T细胞的量,ELISPOT或流式细胞仪在本说明书中的其他位置有示例。

[0099] 在特定的实施方式中,通过将测定的对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量与规定值(例如,阴性对照的测定值或健康人的测定值)进行比较,可以评价伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价(未患病时)、病情。

[0100] 在具体实施方式中,通过测定上述各种量或水平,可进行诊断或检查。作为诊断、检查,可适用于自身免疫性疾病或其他疾病(神经变性疾病等)、免疫组库变化的疾病,可预想如下所述的具体示例。

- 1、感染履历的评价
- 2、疫苗有效性评价(有无Tfh诱导)
- 3、再感染防御能力的评价
- 4、癌症免疫药物(免疫检查点等)有效性的评价
- 5、伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价(未患病时)、病情评价

[0101] 在一实施方式中,本发明可提供一种感染履历的评价技术。

虽然利用抗体评价感染履历经常进行,但由于特异性免疫细胞与抗体相比维持更长时间,因此在调查感染履历方面,确定感染源特异性的免疫细胞是有益的。使用含有感染源特异性表位的探针的T细胞检测法,作为能简便地检测感染后成立并维持的免疫细胞的方法是有益的。有无与探针反应的T细胞,可通过使用外周血单个核细胞(PBMC)的ELISPOT或使用流式细胞仪的体系容易地检测。若检测出探针反应性的T细胞,则可判定为过去有过感染。除此以外,若与健康人相比检测出较多的探针反应性T细胞,则可判定为过去有过感染。

[0102] • 对感染诊断的应用

已知基于免疫细胞的特异性应答在感染后的数天至2周左右成立,之后可长期维持。因此,若使用选择的探针,则在感染后,感染症的病原体被从体内排除后,或被抑制到无法检测的状态下,也可从免疫状态判断感染履历。

[0103] • 感染履历的评价的具体顺序

使用与特定感染症相关的表位与患者或恢复者中被认为已成立有对特定感染症的获得免疫的被测体,确认滤泡性T细胞的反应性,确定诱导滤泡性T细胞的表位。此处,为确保是基于对特定感染症特异性的免疫细胞的应答,对表位的其他感染症抗原或疾病相关抗原的序列保守性评价,理想的是实际上使用被测体或表位反应性T细胞对交叉反应性进行评价,选择对有兴趣的特定感染症特异性的表位。由此可确保与仅对特定感染症有感染履历时选择的表位进行反应,可用于感染履历的评价。

[0104] 在一实施方式中,本发明提供一种疫苗有效性评价、再感染防御能力的评价。

特异性免疫细胞与抗体相比维持更长时间,在再感染时能迅速应答方面可评价免疫细胞的防御能力。此外,由于滤泡性T细胞在众多T细胞分级分离(T cell fractionation)中为对体液免疫的诱导与强化(亲和性成熟)重要的分级分离,因此特别是

具有与含有诱导滤泡性T细胞的该感染源表位的探针进行反应的T细胞的受试体,可判断其拥有更强力的感染防御能力、或质上有优势的防御能力。由于基于免疫细胞的特异性应答只对疫苗抗原反应,因此通过观察基于该表位的反应性,可判断接种疫苗后有无针对疫苗对象疾病的免疫和强度。

• 疫苗有效性评价、再感染防御能力的具体顺序

疫苗所含有的T细胞表位中,使用在疫苗对象疾病的患者或恢复者中被认为针对疫苗对象疾病的获得免疫已成立的被测体,确认滤泡性T细胞的反应性,确定诱导滤泡性T细胞的表位。此处,为确保是基于对特定感染症特异性的免疫细胞的应答,对表位的其他感染症抗原或疾病相关抗原的序列保守性评价,理想的是实际上使用被测体或表位反应性T细胞对交叉反应性进行评价,选择对有兴趣的特定感染症特异性的表位。。由此可确保与仅对特定感染症有感染履历时以及疫苗接种中选择的表位进行反应,用于疫苗有效性的评价。由于基于免疫细胞的特异性应答只对疫苗抗原反应,因此通过观察基于该表位的反应性,可判断接种疫苗后有无针对疫苗对象疾病的免疫和强度。由此可进行疫苗有效性评价、再感染防御能力评价。

[0105] 如上所述,认为:作为感染后或疫苗摄取后成立的免疫评价法,检查对PBMC的探针反应性的细胞被认为是有效的。评价方法与上述同样地可使用ELISPOT或流式细胞仪。这些方法可通过变更检测的细胞因子,或组合表面抗原探针,从而也可检测与表位探针反应的T细胞实际上是否为滤泡性T细胞,有多少比例是这样的,可根据检测灵敏度或判定基准设计实验体系。

[0106] 滤泡性T细胞以表面抗原和释放的细胞因子为特征。因此,如果是ELISPOT,则可在与表位反应后,通过检测从细胞释放出的滤泡性T细胞特有的细胞因子,具体而言IL-21等,来确认反应的T细胞是否是滤泡性T细胞,如果是流式细胞仪,则可通过捕捉CXCR5等滤泡性T细胞的特征性的细胞表面抗原,来确认反应的T细胞是否是滤泡性T细胞。进而,通过同时捕捉其他T细胞特有的细胞因子或表面抗原,可评价被每个表位诱导的T细胞中的滤泡性T细胞的优势性。此处,释放的细胞因子可通过与表位刺激前比较,或预先与作为对照而准备的阳性对照/阴性对照相比较,可评价该表位特异性滤泡性T细胞的诱导能力,进而以该值为基准,可对感染后或疫苗接种后成立的免疫进行评价。

[0107] 本发明在其他实施方式中,可对再感染防御能力进行评价。

[0108] 通过上述ELISPOT或流式细胞仪检测疫苗抗原、或感染症抗原特异性滤泡性T细胞的应答,可以理解针对免疫记忆维持的目标感染症免疫强度。有时也需要严密的、大规模流行病学研究,但通过发现滤泡性T细胞的应答水平或量的测定值与感染防御或重症化预防(评价受试体一定期间有无感染,评价有感染的人数与受试体的滤泡性T细胞的应答水平或量的测定值的相关)之间的关联,可作为再感染防御能力的指标使用。

[0109] 在一实施方式中,本发明提供一种癌症免疫药物(免疫检查点等)有效性评价。

[0110] 若针对癌症抗原的体液免疫应答被引发,则可期待更强的抗肿瘤性。因此,被诱导抗肿瘤体液免疫应答的滤泡性T细胞有更多地被检测的受试体,其抗肿瘤免疫容易活化,免疫检查点抑制剂等强化受试体的抗肿瘤免疫的药物被认为会更有效。

[0111] 每个患者的肿瘤特异性T细胞在外周血中极其微量,在体外(ex vivo)检测非常困难,但通过与患者肿瘤的共同培养等浓缩肿瘤特异性T细胞的方法,可检测针对肿瘤的应

答。由于预想细胞毒性 (CD8+) T细胞的应答会更强,因此通过去除来自外周CD8+T细胞,将CD4+T细胞、抗原呈递细胞(无限增殖化B细胞等)与患者肿瘤或来自患者的肿瘤细胞株共同培养,容易观察到肿瘤特异性滤泡性T细胞的应答,根据滤泡性T细胞的应答水平或量的测定值,可评价受试体的抗肿瘤免疫。更优选为,使用在癌症免疫药物给药前实施的手术或活检样本,通过体外检测可对存在于肿瘤局部或肿瘤微环境的滤泡性T细胞进行评价。此处,不仅能评价滤泡性T细胞的量或细胞因子的水平,而且也能对被认为将来诱导滤泡性T细胞的CXCL13等趋化因子、进而对被启示与预后有良好相关性的三维淋巴状结构相关的IL-7等或被启示负相关的IL-10等抑制性细胞因子的水平也合并进行评价,从而可进行更高精度的有效性评价。

[0112] 认为:通过评价来自肿瘤活检样本或外周血的T细胞与表位探针之间的反应性,可评价受试体的抗肿瘤免疫的活跃度,有助于治疗方法的选择。此外,结合表位探针和流式细胞仪,通过评价给药时的表位特异性滤泡性T细胞(肿瘤特异性T细胞)的活化或耗竭度,可期待检查抗肿瘤免疫活动是否得以维持。这对于免疫检查点抑制剂在今后是否有效,判断是否应中断治疗摸索其他治疗方法等是有效的。

[0113] 各滤泡性T细胞的活化可通过例如IL-21或ICOS的表达、IL-21的生产性能来评价。虽然耗竭度通常通过PD-1来评价,但也可使用其他的耗竭标记LAG3、TIM3、TIGIT等。

[0114] 本说明书中使用的T细胞的耗竭度的评价方法,可根据本领域公知的任意方法实施。例如,T细胞的耗竭度可通过流式细胞仪或同等试验中PD-1阳性细胞(目的细胞的分级分离中)的比例来评价。耗竭度可以是20%到100%。虽然没有特别限定,但耗竭度的测定可根据“PD-1BlockadeTherapy Promotes Novel Infiltration of Tumor-Specific T-CellClonotypes”[https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract\\_id=3796528](https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3796528))记载的方法测定。

[0115] 在一实施方式中,本发明提供一种伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价(未患病时)、病情评价。

[0116] 伴随自身抗体的自身免疫性疾病很多,但其中在被认为自身抗体具有病原性的疾病(例如ANCA相关性血管炎)中,与产生自身抗体的B细胞相互作用的滤泡性T细胞的有无、增减,被认为与伴随B细胞的成熟的发病、病情恶化/复发有关。因此,认为通过检测呈递来自疾病特异性的自身抗原的表位的滤泡性T细胞,可评价疾病风险(发病前)或疾病活跃度。

[0117] 通过检测呈递作为自身免疫性疾病的原因的来自自身抗体的表位的滤泡性T细胞,可以进行评价。试验方法可考虑使用ELISPOT或流式细胞仪对取自受试体的PBMC的探针反应性细胞检查。

[0118] 当与阴性对照相比较确认到滤泡性T细胞的增加时,可判断疾病风险(发病前)或疾病活跃度高。

[0119] (抗原的制作方法)

本发明的多肽等可使用化学合成、利用基因工程学通过微生物等制造的方法等各种方法来制造。

[0120] 本领域技术人员根据本发明以及本领域的知识会理解存在各种制作抗原的方法。一般来说,抗原可通过体外或体内的任意一种制作。抗原可以在体外作为肽或多肽制作,然后将其制作为个体化的新生物疫苗或免疫原性组合物,并向对象投放。正如本说明书中更

详细地说明,该体外制作例如可通过来自肽合成或各种细菌、真核生物、或病毒重组表达系统的任意一种中的DNA或RNA分子的肽/多肽的表达、以及持续表达的肽/多肽的提纯等本领域技术人员公知的各种方法进行。或者,也可以通过将抗原以编码抗原的分子(例如DNA、RNA、病毒表达系统等)导入至对象,导入后表达被编码的抗原,从而在体内制作。抗原的体内和体外制作方法还在本文中在其涉及药物组合物和联合疗法的递送方法时有进一步记载。

#### [0121] 体外肽/多肽合成

蛋白质或肽可通过包括根据标准的分子生物学技法得到的蛋白质、多肽或肽的表达、来自天然供给源的蛋白质、体外翻译或肽的分离、或蛋白质或肽的化学合成的本领域技术人员公知的任意技法来制作。与各种基因对应的核苷酸以及蛋白质、多肽以及肽序列已被公开,本领域技术人员可参照公知的计算机化数据库。涉及的一个数据库为日本国立卫生研究所(National Institutes of Health)网站主页上的日本国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的基因库(Genbank)以及GenPept数据库。已知的基因的编码区域可使用本说明书公开的技法,或如本领域技术人员公知的方法扩增和/或使表达。或者各种市售的蛋白质、多肽以及肽制备物也是本领域技术人员所公知的。

[0122] 肽可以通过使用不含有夹杂细菌或动物性物质的试剂容易地化学合成(Merrifield RB:“固相肽合成I.四肽的合成(Solid phase peptide synthesis.I.The synthesis of a tetrapeptide)”.J.Am.Chem.Soc.85:2149-54,1963)。在特定的实施方式中,抗原肽的制作通过以下来进行(1)使用均匀合成和裂解条件的多通道仪器进行的固相合成;(2)基于使用RP-HPLC柱汽提的提纯;以及肽之间的再清洗,但不进行交换;然后(3)通过信息价值最高的、限一组的测定进行的分析。关于各患者的一组肽,可定义药品制造管理及品质管理相关的基准(GMP)的记录(footprint),因此仅不同患者的肽合成之需要切换次序步骤。

[0123] 或者,也可以使用本发明的编码抗原肽的核酸(例如多核苷酸),在体外制作抗原肽。多核苷酸例如可以是DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA、单链和/或双链的任意一种的、或天然或稳定化形态的多核苷酸,例如具有硫代磷酸酯(phosphorothiate)骨架的多核苷酸等,或它们的组合,只要其编码肽,就可包括内含子,也可不包括内含子。一实施方式中,使用体外翻译来制作肽。存在许多本领域技术人员可以使用的示例性系统(例如Retic Lysate IVT kit、Life Technologies、Waltham,MA)。

[0124] 也可以制备具有多肽表达能力的表达载体。针对各种细胞的表达载体是本技术领域中公知的,不必通过过量实验即可选出。通常,在质粒等表达载体中,在适当的取向和正确的读码框下插入DNA。如有必要,DNA可连接到被所期望的宿主(例如细菌)识别的适当的转录或翻译调节控制的核苷酸序列,然而这种控制通常可利用于表达载体。然后,载体可用标准技法导入到克隆用的宿主细菌中(例如参照Sambrook et al.(1989)Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.)。

[0125] 此外,包含分离出的核苷酸的表达载体,以及包含表达载体的宿主细胞也在意图中。抗原肽可以以编码所期望的抗原肽的RNA或cDNA分子的形态提供。本发明的1个以上的

抗原肽可通过单一的表达载体提供。

[0126] 在一方面,本发明提供一种用于对受试体的疾病的相关事项进行试验的方法,所述方法包括对与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,以及将该水平或量与规定的基准相比较的步骤。

[0127] 在一实施方式中,基准是关于选自以下所组成的群组中的至少1种的基准:疾病履历、对疾病的预防剂或疫苗的有效性、对疾病的治疗剂的有效性、对再次罹患疾病的防御能力、疾病的病情以及疾病的罹患风险。

[0128] 在一实施方式中,基准是关于所述受试体的所述疾病的基准,作为基准可使用与健康人的疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量的平均值或中位数。比基准高时,受试体有可能患有疾病。

[0129] 在一实施方式中,基准是关于所述受试体的所述疾病的感染履历的基准,可用感染源特异性免疫细胞的有无作为基准。当有感染源特异性免疫细胞时,有可能有过感染史。

[0130] 在一实施方式中,基准是关于所述受试体的所述疾病的疫苗有效性、再感染防御能力的基准,可用感染源特异性免疫细胞的有无作为基准。当有感染源特异性免疫细胞时,可判断疫苗有效,有再感染防御能力。

[0131] 在一实施方式中,基准是关于所述受试体的所述疾病的癌症免疫药物的有效性的基准,可用具有抗肿瘤(表位)活性的免疫细胞的水平作为基准,表位特异性滤泡性T细胞(肿瘤特异性滤泡性T细胞)的活化或耗竭度也可合并用作基准。表位特异性滤泡性T细胞的活性增加时,可判断癌症免疫药物有效。

[0132] 在一实施方式中,疾病相关因素是自身免疫性疾病相关因素,测定包括对与该自身免疫性疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平或量进行测定的步骤,基准是关于所述受试体的伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险、病情的基准。可使用对自身免疫性疾病相关因素特异性的免疫细胞的有无作为基准。当存在对自身免疫性疾病相关因素特异性的免疫细胞时,有可能患有自身免疫性疾病。

[0133] 在一方面,本发明提供一种用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的系统,所述系统包括测定与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的试剂或装置,以及将由该试剂或装置得到的测定结果与规定的基准相比较的比较部。

[0134] 在一方面,本发明提供一种用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的方法,所述方法包括提供与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序,以及将滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息与规定的基准相比较的工序。

[0135] 在一方面,本发明提供一种将用于对受试体的相关疾病的相关事项进行试验的方法安装在计算机中、并包含可计算机读取的代码的程序,所述程序包括提供与该受试体的该疾病的疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息的工序,以及将滤泡性T细胞的水平、空间分布或量的相关信息与规定的基准相比较的工序。

[0136] 在一方面,本发明提供一种存储了上述程序的计算机可读记录介质。

[0137] <探针>

在一方面,本发明提供一种用于呈递疾病相关因素或其一部分的多肽,所述多肽

具有引发对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞的能力。这种多肽可用于本发明的检查或诊断,也称探针。

[0138] <探针:变法>

在另一方面,本发明提供一种跟与疾病相关因素或其一部分相互作用的TCR特异性结合的抗体,所述抗体具有引发对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞的能力。这种抗体可用于本发明的检查或诊断,也称探针。

[0139] (治疗及预防,药物及疫苗)

本发明可作为药物提供。药物或药物组合物中含有的成分可称作药剂等。本发明的药物可作为疫苗(包含细胞疫苗)或探针提供。

[0140] 在一方面,本发明提供一种用于治疗或预防疾病的药物组合物,所述组合物包含具有引发对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞的能力的疾病相关因素或其一部分。

[0141] 在另一方面,本发明提供一种针对疾病的疫苗,所述疫苗包含具有引发对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞的能力的疾病相关因素或其一部分。

[0142] 在另一方面,本发明提供一种用于治疗或预防疾病的药物组合物,所述组合物包含对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞。

[0143] 在一些方面,本发明可提供一种针对疾病的细胞疫苗,所述细胞疫苗包含对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞。

[0144] 在一实施方式中,疾病可以是感染症或癌症。在其他实施方式中,疾病可以是病毒感染症。在特定的实施方式中,本发明的组合物可诱导HLA型特异性滤泡性T细胞。在一部分实施方式中,疾病相关因素可以是氨基酸、核酸、病毒或细胞。在其他实施方式中,疾病相关因素可以是成为疾病的直接或间接性原因的因素,也可以是产生使疾病发病的结果的因素。例如,疾病为病毒疾病时,疾病相关因素可以是引起病毒疾病的病毒。在一部分实施方式中,疾病相关因素或其一部分包含最多20个氨基酸。在特定的实施方式中,本发明的滤泡性T细胞可以是公共滤泡性T细胞。

[0145] 在某方面,本发明涉及一种TCR-T细胞疗法。

[0146] 在一些方面,例如,本发明提供一种用于强化针对疾病的免疫获得的组合物,所述组合物包含对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞。

[0147] 在一方面,本发明提供一种用于治疗或预防疾病的药物组合物,所述组合物包含具有引发对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的能力的疾病相关因素或其一部分或功能性等效物。

[0148] 在一方面,本发明提供一种针对疾病的疫苗,所述疫苗包含具有引发对疾病相关因素有特异性的滤泡性T细胞的能力的疾病相关因素或其一部分或功能性等效物。在一实施方式中,上述组合物或疫苗可优先诱导滤泡性T细胞,也可以诱导滤泡性T细胞以外的细胞的同时,诱导滤泡性T细胞。

[0149] 在一方面,本发明提供一种用于治疗或预防疾病的药物组合物,所述组合物包含对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞。

[0150] 在一方面,本发明提供一种针对疾病的细胞疫苗,所述细胞疫苗包含对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞。

[0151] 在一实施方式中,本发明的上述对疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞,至少对

疾病相关因素有反应性。在其他实施方式中,在感染症或癌症的特定实施方式中,上述疾病是病毒感染症。在另一实施方式中,上述组合物诱导HLA型特异性滤泡性T细胞。在一部分实施方式中,滤泡性T细胞是公共滤泡性T细胞。

[0152] 本发明在给药时,在经口给药的情况时,可以配制成片剂、颗粒剂、细粒剂、散剂、胶囊剂等各种形状使用,也可以含有制剂中通常使用的粘合剂、包含剂、赋形剂、润滑剂、崩解剂、湿润剂等添加剂。此外,除此以外,口服给药时的制剂既可以作为内用水剂、悬浮剂、乳剂、糖浆剂等液体状态进行制剂化,也可以作为使用时再溶解的干燥状态的物质进行制剂化。

[0153] 在非经口给药的情况时,可以制剂化为容纳在单位给药量安瓿或多给药量容器或管内的状态,此外,也可以含有稳定剂、缓冲剂、保存剂、等渗化剂等添加剂。此外,非经口给药时的制剂在使用时也可以制剂化为可用适当的载体(灭菌水等)再溶解的粉体。

[0154] 本说明书中的“有效成分”指:为了得到作为目的的治疗预防或抑制进展等效果而以必要的量含有本发明的组合物等的成分,只要效果未受损到低于期望水平,则也可以含有其他成分。此外,本发明的药物、组合物等也可以是制剂化的物质。此外,本发明的药物、组合物等的给药路径可以是经口也可以是非经口的任意种,可根据制剂形态等适当设定。

[0155] 可使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐(盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、以及硫酸盐等),或有机酸盐(醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、以及苯甲酸盐等)。

[0156] 药物组合物中的在药学上可接受的盐还包含液体(水、生理盐水、甘油以及乙醇)。进而组合物中还可以存在辅助剂(湿润剂、乳化剂或pH缓冲剂等)。可以使载体以用于被受试体摄取的片剂、丸剂、糖衣片、液剂、凝胶剂、糖浆剂、浆剂以及悬浮剂的形态来调配药物组合物。

[0157] 本发明的范围为若干种给药形态中存在的组合物;该形态可列举但不限于用于非经口给药(例如注射或注入(例如大量瞬时给药或连续注入))的适宜形态。生成物被注射或注入时,可以以油性或水性介质中的悬浮液、溶液或乳液的形态给药,可以含有调和剂(悬浮剂、稳定剂和/或分散剂)。或者,为了在使用适当的灭菌液在使用前进行复原,也可以是干燥形态。

[0158] 一旦制备后,本发明的组合物可直接向受试体给药。一实施方式中组合物适用于向哺乳类(例如人类受试体)给药。

[0159] 本发明的药物组合物可以有任意数量的给药路径(可列举但不限于:经口、静脉内、肌肉内、动脉内、骨髓内、腹膜内、鞘内、心(脑)室内(intraventricular)、经皮、经皮肤、局部、皮下、鼻腔内、经肠、舌下、阴道内、或直路径。此外,为了将本发明的药物组合物给药,还可以使用无痛皮下注射器。典型的治疗组合物可由液体溶液或悬浮液中的任意一种制备成可注射的形态。可制备成适合注射前的液体介质中的溶液或悬浮液的固体形态。

[0160] 组合物的直接送达一般经由皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内注射实现,或送达至组织的间质性空间。组合物可向病变给药。给药处置可以是单次给药计划或多次给药计划。药物会提供与给药次数相关的指示(例如是否应每天、每周、每月送达等)。此外,次数及用量取决于症状的严重程度。

[0161] 本发明的组合物可制备成各种形态。例如,组合物可作为成液体溶液或悬浮液的任意一种,制备成可注射的药物。可制备成适合注射前的液体介质中的溶液或悬浮液的固

体形态(用于使用含有防腐剂的灭菌水进行复原的冷冻干燥组合物(例如Synagis(注册商标)以及Herceptin(注册商标)等))。组合物可以制备成例如用于局部给药的软膏、霜剂或粉末。组合物可制备成例如用于经口给药的片剂或胶囊剂、喷雾剂、或糖浆剂(添加任意风味)。组合物可制备成例如用于肺部给药的粉末或喷雾的吸入剂。组合物可制备成栓剂或阴道栓剂。组合物可制备成例如用于经鼻、耳或眼给药的滴剂。组合物可以是套盒(kit)的形态,其被设计为组合起来的组合物在向受试体临给药前能复原。例如,可以以冷冻干燥的抗体具备灭菌水或灭菌缓冲液的套盒形态提供。

[0162] 在另一方面,本发明可提供一种疫苗。此外,本发明在一些方面提供一种使用疫苗等预防疾病等的方法。

[0163] 在一部分实施方式中,本发明的药物组合物可以是为了增强免疫而向人类给药的疫苗组合物。疫苗组合物可以包含一种或多种辅助剂。疫苗组合物中含有的辅助剂的例子,在本说明书中可提供下列示例。在一部分实施方式中,疫苗组合物还可以包含细胞疫苗。在示例性的实施方式中,合适的辅助剂的例子可列举:(1) (含有或不含有胞壁酰多肽或细菌细胞壁构成要素等其他特定的免疫刺激性物质的) 水中油型乳液制剂,例如, MF59(商标) (含有5%角鲨烯、0.5%吐温80、以及0.5%三油酸山梨糖醇) 以及SAF(含有10%角鲨烯、0.4%吐温80、5%PLURONIC(注册商标)嵌段聚合物L121、以及苏氨酸(thr-)MDP); (2) 皂苷辅助剂,例如QS21、STIMULON(商标) (Cambridge Bioscience、Worcester、MA)、Abisco(注册商标) (Isconova、Sweden)、或Iscomatrix(注册商标) (Commonwealth Serum Laboratories、Australia); (3) 完全弗氏佐剂(CFA) 以及不完全弗氏佐剂(IFA); (4) 包含胞嘧啶未被甲基化的CpG基序的、即至少含有一个CG二核苷酸的寡核苷酸(例如Krieg、Vaccine(2000) 19:618~622; Krieg、Curr Opin Mol Ther(2001) 3:15~24; W098/40100、W098/55495、W098/37919以及W098/52581); 以及(5) 含有铝盐(明矾、磷酸铝、氢氧化铝等)的金属盐; (6) 皂苷以及水中油型乳液(例如W099/11241)。

[0164] 在一方面,通过向患有疾病或有患病风险的受试体投放用于治疗或预防疾病的药物组合物,由此可以治疗或预防疾病,所述药物组合物包含疾病相关因素或其一部分或功能性等效物,所述疾病相关因素或其一部分或功能性等效物具有引发与疾病相关因素有反应性的滤泡性T细胞的能力。

[0165] 关于本发明的治疗或预防,以使含有确定的滤泡性T细胞表位或其功能性等效物的物质与(1) 与以B细胞诱导等为目的的其他疫苗抗原/核酸结合,或(2) 在病毒载体和VLP中独立于其他抗原表达,(3) 细胞毒性T细胞表位等以与B细胞+Tfh不同的免疫激发为目的的物质组合这样的方法设计疫苗。疫苗有效性可通过HLA人源化小鼠进行上述组合、呈递的抗原的数量或平衡、组合的辅助剂的最优化。在某种程度上可以通过动物进行药物评价,但完全再现人类免疫是困难的,这是以T细胞为靶标时的难点。在肿瘤的情况时,给药方法最有希望的是肿瘤局部,但不限于于此。

在一方面,本发明的治疗或预防可通过以下进行步骤来实施:

(1) 使包含已确定的滤泡性T细胞表位,或其功能性等效物的物质与其他疫苗抗原/核酸结合,或与病毒载体、VLP独立表达的步骤,

(2) 与引发(细胞毒性T细胞表位等的) B细胞或Tfh不同的免疫的物质混合的步骤, 以及

(3) 将通过 (2) 得到的物质给药的步骤。

[0166] (对受试体的该疾病的评价技术的计算机程序或存储其的记录介质、以及构成系统或该系统的一部分的用户仪器)

本发明的一方面中,提供一种用于评价受试体的该疾病的方法,以及用于实现此方法的计算机程序或存储其的记录介质,以及构成系统或该系统的一部分的用户仪器。等

[0167] 系统1000包含:至少1个用户装置100、通过网络400与至少1个用户装置100连接的服务器装置200、以及与服务器装置200连接的数据库部300(图8)。

[0168] 用户装置100除了专用的医疗仪器外,还可以是智能手机、平板电脑、智能手表、手提电脑(laptop computer)、台式计算机、可穿戴式医疗装置等任意终端装置。用户装置100可通过网络400与服务器装置200通信。此处,不限定网络400的种类。例如,用户装置100可以通过互联网与服务器装置200通信,也可以通过LAN与服务器装置200通信。图8中描绘了3个用户装置100,但用户装置100的数量不限于此。用户装置100的量可以是相同或不同的1以上的任意数。

[0169] 服务器装置200可通过网络400与至少1个用户装置100通信。此外,服务器装置200可与连接在服务器装置200的服务器部分300通信。

[0170] 例如,与服务器装置200连接的数据库部300中可以存储有事先取得的多个对象的滤泡性T细胞的相关信息、与受试体相关的任意健康信息、医学信息等。储存的多个信息,可用于例如构建学习模型。例如,数据库部300也可以使之存储有已构建的学习模型。

[0171] 图9是用户装置100的构成的一例。

[0172] 用户装置100具备通信接口部110、输入部120、显示部130、存储部140和处理器部150。

[0173] 通信接口部110控制经由网络400的通信。用户装置100的处理器部150可通过通信接口部110接收来自用户装置100的外部的信息,也可向用户装置100的外部传送信息。例如,用户装置100的处理器部150可通过通信接口部110接收来自服务器装置200的信息,也可向服务器装置200传送信息。通信接口部110可以通过任意方法控制通信。

[0174] 输入部120可使用户向用户装置100输入信息。不拘输入部120以何种方式可实现使用户向用户装置100输入信息。例如,输入部120是触摸屏时,用户可通过触碰触摸屏输入信息。或者,输入部120为鼠标时,用户也可通过操作鼠标输入信息。或者,输入部120为键盘时,用户也可通过按下键盘的按键输入信息。或者,输入部120为麦克风时,用户也可通过声音输入信息。

[0175] 显示部130可以是用于显示信息的任意的显示器。

[0176] 存储部140中存储有用于运行用户装置100中的处理的程序及该程序运行所必需的数据等。存储部140中,例如存储有用于评价以下医疗技术的程序的一部分或全部:对象疾病的履历的评价、对疾病的预防剂或疫苗有效性评价、对疾病的治疗剂的有效性评价、对再次罹患疾病的防御能力的评价、疾病的病情评价以及疾病的罹患风险评价。存储部140中可以存储有安装任意功能的应用软件(application)。存储部140中也可以存储有例如用于通过测定滤泡性T细胞的相关生物化学信息得到滤泡性T细胞的水平或量的相关信息的应用软件。由此,用户装置100具有实现对滤泡性T细胞的相关信息的测定的部分。存储部140中还可以存储有例如用于根据滤泡性T细胞的相关生物化学信息得到滤泡性T细胞的水平

或量的信息的应用软件。由此,用户装置100具有实现测定眼电位的功能的部分。此外,存储部140中还可以存储用于通过其他装置得到的眼球信息的应用软件。此处,不拘程序以如何存储在存储部140中。例如,程序可以预装在存储部140中。或者,程序也可以通过经由网络400下载并安装在存储部140中。存储部140可通过任意存储装置安装。

[0177] 处理器部150控制用户装置100的所有动作。处理器部150读取存储部140中存储的程序并运行其程序。由此,可作为运行用户装置100所期望的步骤的装置发挥功能。处理器部150可以通过单一的处理器的安装,也可以通过多个处理器的安装。

[0178] 用户装置100除上述构成以外,还可以具备数据获取部160。数据获取部160是ELISA等生物化学手段等中示例的用于获取滤泡性T细胞的生物化学信息的任意装置。例如,数据获取部160是实现ELISA的仪器。数据获取部160可以是例如用户装置100的内藏吸光装置,也可以是安装在用户装置100的外部FACS仪器。

[0179] 除上述构成以外,用户装置100还可以具备追加信息获取装置170来代替上述数据获取部160,或者具备上述数据获取部160外进一步具备追加信息获取装置170。追加信息获取装置170可以是用于获取追加信息的任意装置。追加信息获取装置170是取得例如感染症、疫苗、癌症、过敏症、自身免疫性疾病的相关信息的装置。例如,追加信息获取装置170可以是用户装置100中确定感染症的PCR等生物化学仪器,也可以是安装在用户装置中的抗原抗体反应测定装置。例如,当用户装置100与其他医疗仪器组合时,可以将该其他医疗仪器用作追加信息获取装置170。

[0180] 图9所示的例子中,用户装置100内设置有用户装置100的各构成要素,但本发明不限于此。用户装置100的各构成要素的任意一种也可设置在用户装置100的外部。例如,输入部120、显示部130、存储部140、处理器部150、摄像装置160可分别由各自的硬件部件构成,各硬件部件也可通过任意网络连接。此时,不限定网络的种类。各硬件部件,例如可通过LAN连接,也可通过无线连接,还可通过有线连接。用户装置100不限于特定的硬件构成。例如,处理器部150可以不由数字电路而是由模拟电路构成,这也在本发明的范围内。只要能实现该功能,用户装置100的构成不限于上述示例。

[0181] 图10是服务器装置200的构成的一例。

[0182] 服务器装置200具备通信接口部210、存储部220和处理器部230。

[0183] 通信接口部210通过网络400控制通信。此外,通信接口部210也控制与数据库300间的通信。服务器装置200的处理器部230可通过通信接口部210接收来自服务器装置200外部的信息,也可向服务器装置200外部传送信息。服务器装置200的处理器部230可通过通信接口部210接收来自用户装置100的信息,也可向用户装置100传送信息。通信接口部210可通过任意方法控制通信。

[0184] 存储部220中,存储有运行服务器装置200的处理所必需的程序及运行该程序所必需的数据等。例如,存储有用于滤泡性T细胞的分析或以此评价疾病的程序的一部分或全部。存储部220中,例如存储有用于评价以下医疗技术的应用软件:用于获取滤泡性T细胞的水平或量的信息的应用软件、对象疾病的履历的评价、对疾病的预防剂或疫苗的有效性的评价、对疾病的治疗剂的有效性的评价、对再次罹患疾病的防御能力的评价、疾病的病情评价以及疾病的罹患风险评价。存储部220中还可存储例如用于通过其他装置获取滤泡性T细胞或其他医疗技术的信息的应用软件。存储部220可通过任意的存储装置被安装。

[0185] 处理器部230控制服务器装置200的全部动作。处理器部230读取存储部220中存储的程序并运行其程序。由此,可使服务器装置200作为运行所期望的步骤的装置发挥功能。处理器部230可以被单一的处理器的安装,也可以被多个处理器安装。

[0186] 图10所示的例子中,服务器装置200内设置有服务器装置200的各构成要素,但本发明不限于此。服务器装置200的各构成要素的任意一种也可设置在服务器装置200的外部。例如,存储部220、处理器部230可分别由各自的硬件部件构成,各硬件部件也可通过任意网络连接。此时,不限定网络的种类。各硬件部件,例如可通过LAN连接,也可通过无线连接,还可通过有线连接。服务器装置200不限于特定的硬件构成。例如,处理器部230可以由数字电路而是由模拟电路构成,这也在本发明的范围内。只要能实现该功能,服务器装置200的构成不限于上述示例。

[0187] 图8~10所示的例子中,数据库300被设置在服务器装置200的外部,但本发明不限于此。也可以将数据库300设置在服务器装置200的内部。此时,数据库300可以以与安装存储部220的存储装置相同的存储装置安装,也可以以安装存储部220的存储装置不同的存储装置安装。无论哪一种,数据库300都作为用于服务器装置200的存储部构成。数据库300的构成不限于特定的硬件构成。例如,数据库300可以由单一的硬件部件构成,也可以由多个硬件部件构成。例如,数据库300可作为服务器装置200的外接硬盘装置构成,也可作为通过网络连接的云上的存储设备构成。

#### (一般技术)

[0188] 本说明书中所用的分子生物学手法、生物化学手法、微生物学手法为本领域公知的且惯用的手法,例如,如Current Protocols in Molecular Biology (<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471142727>)以及Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition) (<http://www.molecularcloning.com>)等所记载,在本说明书的相关部分(可以是全部)援引这些作为参考。

[0189] 本说明书中的“或”在可采用文章中列举的事项的“至少1个以上”时使用。“或者”也相同。本说明书中写明为“2个值”的“范围内”时,则该范围也包含这2个值自身。

[0190] 本说明书中所引用的科学文献、专利、专利申请等参考文献,其整体本说明书中以与各自具体记载的内容相同的程度作为参考被援引。

[0191] 以上为容易理解,显示本发明的优选的实施方式进行说明。以下基于实施例对本发明进行说明,但上述说明以及以下的实施例仅以示例的目的提供,而不以限定本发明的目的提供。因此,本发明的范围也不被限定于本说明书中具体记载的实施方式或实施例,而仅被限定于权利要求书的范围。

#### 【实施例】

[0192] 本实施例中,基于赫尔辛基宣言,从受试体得到必要的知情同意(informed consent)后遵守大学中规定的伦理规定的情况下进行下述实验。所用的试剂除实施例中记载的物质以外,也可使用自和光制药或Sigma-Aldrich等获得的物质。

[0193] (实施例1:病毒事例(一般事例的情况时))

本实施例中,使用基于单细胞的RNA序列平台(10xGenomics公司的Chromium),对SARS-CoV-2特异性T细胞亚群及其克隆型进行分析。

[0194] (外周血单个核细胞(PBMC)的分离与采血浆)

从包括健康供者以及病毒感染患者(例如流感病毒感染患者)的6人制备外周血单个核细胞(PBMC)。制备按以下方式进行。将全血收集于肝素涂覆管中,在1500rpm离心分离10分钟,分离细胞与血浆。从细胞颗粒上去除血浆,保存于-80℃中。然后,通过密度梯度沉降分离PBMC,使用ACK溶解缓冲液溶解红细胞。将分离后的PBMC通过STEM-CELLBANKER(Zenoaq Resource)在-80℃冷冻保存。

[0195] 将冷冻保存的PBMC解冻,用添加了5%人AB血清的RPMI1640培养基清洗。通过含有1μg/ml的S蛋白质、重组S蛋白质(1μg/ml)、S肽池(每种肽1μg/ml)或M+N肽池(1μg/ml)的灭活病毒(例如流感病毒)刺激 $5 \times 10^5$ 个PBMC(刺激蛋白根据病毒适当选择。重组病毒的蛋白质根据公知的文献制备。)。PepMix流感病毒(各种蛋白质)等也可使用市售品。(例如funakoshi公司)。然后,在37℃下用抗人CD3(HIT3a)、CD69(FN50)、CD137(4B4-1)以及TotalSe(商标)-C散列标签(均购自BioLegend公司)染色20小时。通过细胞分选仪(cell sorter)SH-800S细胞(SONY)对CD3+CD69+或CD3+CD137+细胞进行分类,如下所记载地利用单细胞VDJ-RNA-seq分析方法分析RNA表达和TCR序列。

[0196] (基于单细胞的转录体以及TCR组库分析)

使用以下试剂,进行单细胞的捕获和文库的制备。Chromium Single Cell 5' Library&Gel Bead Kit、PN-1000165;Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit、PN-1000120;Chromium Single Index Kit T Set A、PN-1000213;Chromium Single Cell 5' Feature Barcode Library Kit、PN-1000080;Single Index Kit N Set A、PN-1000212;Chromium单细胞V(D)J浓缩套盒、人类T细胞、PN-1000005。在Chromium微流体芯片加载包含约 $2 \times 10^4$ 个细胞的单细胞悬浮液,按照制造商的指示,使用Chromium控制器(10XGenomics)生成单细胞的凝胶珠乳胶滴(Gel Bead in Emulsion)。然后,使用Veriti Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific)在凝胶珠乳胶滴内对来自各样本的带有条形码的细胞的RNA进行逆转录,按照制造商的实验步骤,为了扩增cDNA,以14个循环进行用于生成单细胞文库的后续的所有步骤。接着,在TCR文库的cDNA浓缩以及文库构建的同时,将约50ng的cDNA用于14个循环的基因表达文库的扩增。文库的片段尺寸通过Agilent 2100Bioanalyzer(Agilent)确认。文库作为双端模式(pair end model)(read1:28bp;read2:91bp)用Illumina NovaSeq6000测序。原始数据(raw read)通过Cell Ranger3.1.0(10XGenomics)处理。使用Seurat R包实施基于基因表达的聚类分析(gene expression-based clustering)(v3.1、Hafemeister,C.,Satija,R.Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression.Genome Biol 20,296(2019).<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1874-1>)。简而言之,对于线粒体含量超过10%的细胞,将被检测的基因小于200或超过4000的细胞视为偏离值(分别为濒死细胞、空液滴、二聚体),通过过滤去除。由于归一化使用Seurat SC Transform函数,同时处理所有样本,因此在不执行批量效应校正的情况下合并数据。以使用CLR归一化的HashTagUMI计数实施HashTag低聚反向多路复用,对克隆型使用Python脚本,通过液滴条形码与基因表达数据进行匹配。仅保留被分配了单个散列标签和β-链克隆型的细胞用于下游分析。

[0197] (批量TCR测序)(bulk TCR-seq)

用QIAzol溶解 $1 \sim 3 \times 10^5$ 个PBMC,然后使用SMARTer Technology(TakaraBio)合成

全长cDNA,使用TRAC/TRBC特异性引物,扩增TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 基因的可变区。对可变区扩增子测序后,使用MiXCR软件(Bolotin,D.,Poslavsky,S.,Mitrophanov,I.et al.MiXCR:software for comprehensive adaptive immunity profiling.Nat Methods 12,380-381(2015).<https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>),将克隆型(TR(A/B)V和TR(A/B)J基因和互补性决定区(CDR)3)分配给读取的各配对。对于每个 $\alpha/\beta$ 克隆型,将其克隆的读取的比例除以 $\alpha/\beta$ 链的读取总数,以此来定义扩增,为进行绘图和统计分析,将比例转换为log10。

[0198] 通过UMAP图和单细胞基因表达,确认循环Tfh聚类由表达CD200、PDCD1、ICOS、CXCL13、CD40LG等的Tfh相关基因的细胞构成。进而,在Tfh聚类中特定1100对以上的TCR。

[0199] 其中,检测患者间共有的TCR $\alpha\beta$ 对。

将这些TCR $\alpha\beta$ 对指定为来自患者X1和X2的克隆1和2,它们共享分别相同的V $\alpha$ ,J $\alpha$ ,V $\beta$ 和J $\beta$ 的使用。进而,还发现克隆1和2的CDR3 $\alpha$ 序列是相同的,CDR3 $\beta$ 除一个氨基酸以外是相同的。

[0200] 在患者X2中,克隆2被检测为共享完全相同的TCR序列的2个不同的条形码细胞。

[0201] 为了检查TCR、克隆型1和2的抗原特异性,分别将TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链转染TCR缺失T细胞杂交瘤,构建TCR重组CD3<sup>+</sup>细胞。

[0202] 用来自对应的各患者的爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)转化的B细胞的存在下,用各种抗原对这些TCR转染子刺激。

确认克隆1和2的应答性。由此可确认这与在单细胞分析中揭示的初始抗原特异性一致。

[0203] 由于排除了在不存在抗原呈递细胞的情况下的活化,因此确认活化是以MHC分子为媒介。

[0204] 在成池了的2个池中,只有后者的池刺激了克隆1和2,因而可知抗原肽包含在后者的特异性位置。

[0205] 然而,确认含有许多的肽、可在其他方面利用的肽池没有使克隆1和2活化。

[0206] 由这些结果可确认克隆1和2的抗原表位的位置。

[0207] 顺便,为了进一步减少表位的候选肽的数量,确定限制克隆1和2的HLA等位基因。

[0208] 发现来自患者X1和X2两者的抗原呈递细胞(APC)可以活化克隆1和2。这显示出APC可以相互交换。

[0209] 因此,将DRB1\*15:01、DPA1\*02:02-DPB1\*05:01、DQA1\*01:02-DQB1\*06等X1和X2之间共有的MHC II类等位基因各自作为HLA的候补。然后,为检查克隆1和2对S肽的识别,分别对这些等位基因进行转染。

[0210] 克隆1和2两者都在只有DRA\*01:01和DRB\*15:01存在的情况下对S肽池#2应答,由于DRA是单形性的,因此启示应答性是由DRB\*15:01决定的。

[0211] 在此,使用NetMHC服务器软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>),检索预测能与DRA-DRB1\*15:01结合的候选肽。

[0212] 预测一些强力的粘合剂为特定病毒蛋白质的缩小的区域内的候选者。因此,通过合成2种肽刺激克隆1和2,可以将特定的肽确定为克隆1和2两者的表位。

判明克隆1和2的TCR在CDR3中的一个氨基酸不同。在这种情况下时,这2个TCR可以被解释为由于它们识别由相同的MHC分子呈递的相同表位并来源于不同的供者,因此启示克

隆1和2是公共克隆。该表位可以解释为与其他流感病毒的对应的氨基酸序列间的相同性较低。

[0213] 实际上,在表达DRA-DRB1\*15:01的APC的存在下,克隆1和2都对来自其他病毒蛋白质的肽池和全蛋白质完全没有应答。此外,这启示克隆1/2与相关的流感病毒发生交叉反应的可能性很低。

[0214] 接着,检查除DRB1\*15:01以外的MHC II类等位基因是否可以呈递被克隆1/2识别的该抗原肽。

[0215] 其结果,也可将特定的氨基酸区域预测为对DRB1\*15:02和15:01的强力粘合剂。此外,DRB1\*15:01和\*15:02之间的氨基酸序列同一性为99.6%。因此,推测DRB1\*15:02也是负责表位识别的等位基因,可以测试来自另一个人的APC,该APC具有DRB1\*15:02但不具有DRB1\*15:01。其结果,在该特定肽的存在下,确定DRB1\*15:02能够刺激克隆1和2两者。

考虑到日本人群中DRB1\*15:02 (10.6%) 和\*15:01 (7.7%) 的频率 (<http://hla.or.jp/>),如果这些克隆型存在,则在18.3%的口中,预料克隆1和2会对该肽应答。对于其他HLA型也可以检查同样的限制特异性。

[0216] 接着,调查被认为没有感染流感病毒的人群中的克隆2/3的克隆型的发生,可知具有一定程度人数的克隆1/2的TCR $\beta$ 克隆型。这与本实施例的比例相同。

[0217] 其次,考虑到克隆1/2是显示Tfh概貌(profile)的该病毒特异性T细胞,为了促进防御性体液免疫,假定克隆1/2在感染时克隆性地增殖,如下进行调查。

[0218] 由于DRB1\*15:01/15:02在全世界并非为小众的等位基因(参照<http://www.allelefrequencies.net/tools/Report.aspx>),因此在美国市民的公开数据库(COVID-19事件的免疫应答活动; ImmuneRace, <https://immunerace.adaptivebiotech.com/>)中,调查健康的个人和从感染中恢复的个人的克隆1/2的克隆型的发生频率。在健康组和恢复组中分别以一定程度频率检测到克隆型。特别是,由于观察到与健康对照相比,每个人之间的这种克隆型频率在恢复组中显著增加,这表明特定的蛋白质特异性克隆在感染时在不同个体中克隆性地扩增了。有趣的是,克隆1/2的克隆型在恢复患者中的发生频率大于世界中的DRB1\*15:01或15:02等位基因频率(11.3%),因此认为克隆1/2可能会识别由其他HLA等位基因所呈递的其他这种病毒来源的表位。

[0219] 总之,识别SARS-CoV-2及其表位的公共T细胞克隆的最初的特定,被认为有助于诊断策略或选择项和下一代疫苗的开发。

[0220] (实施例2:病毒事例(SARS-CoV-2的情况))

在本实施例中,使用基于单细胞的RNA序列平台(10xGenomics公司的Chromium),分析SARS-CoV-2特异性T细胞亚群及其克隆型。

[0221] (外周血单个核细胞(PBMC)的分离和采血浆)

从包括健康供者以及COVID-19恢复期患者的6人制备外周血单个核细胞(PBMC)。制备按以下方式进行。将全血收集于肝素涂覆管中,在1500rpm下离心分离10分钟,分离细胞与血浆。从细胞颗粒去除血浆,保存于-80°C中。然后,通过密度梯度沉降分离PBMC,使用ACK溶解缓冲液溶解红细胞。分离后的PBMC通过STEM-CELLBANKER(Zenoaq Resource)在-80°C下冷冻保存。

表1:参加者的特征

【表1】

	COVID19 患者	健康人
	N=5	N=1
年龄 (岁)	A-B (中位数=C, IQR=D)	31
性别		
男性 (%)	E% (F/G)	100% (1/1)
女性 (%)		N/A
国籍		
日本 (%)		100% (1/1)
日本以外 (%)		N/A
峰值重症度 <sup>a</sup>		
轻症	N/A	N/A
中等症状 I	20% (1/5)	N/A
中等症状 II	20% (1/5)	N/A
重症	60% (3/5)	N/A

表2:日本的COVID-19疾病重症度分类

【表2】

	经皮动脉血氧饱和度 (SpO <sub>2</sub> )	临床症状及病情
轻症	SpO <sub>2</sub> ≥96%	无呼吸系统症状
		仅咳嗽, 无呼吸困难
中等症状 I	93% < SpO <sub>2</sub> < 96%	胸部 X 光或计算机断层摄影中有呼吸困难或异常阴影
中等症状 II	SpO <sub>2</sub> ≤93%	需要吸氧
重症		需要在集中治疗室程度的看护或需要呼吸机

将冷冻保存的PBMC解冻,用添加了5%人AB血清的RPMI1640培养基清洗。通过含有1μg/ml的S蛋白质、重组S蛋白质(1μg/ml)、S肽池(每种肽1μg/ml)或M+N肽池(1μg/ml)的灭活SARS-CoV-2刺激。(灭活SARS-CoV-2病毒由盐田氏和中山氏(大阪大学微生物病研究所)提供。重组SARS-CoV-2蛋白质如Amanat F, et al. bioRxiv.2020所记载地配制。PepMix SARS-CoV-2(刺突糖蛋白质)(包含池#1和#2)自JPT Peptide Technologies购入。PepTivator SARS-CoV-2Prot\_M以及N自MiltenyiBiotec购入。)然后,在37°C下用抗人CD3(HIT3a)、CD69(FN50)、CD137(4B4-1)以及TotalSe(商标)-C散列标签(均购自BioLegend公司)染色20小时。通过细胞分选仪SH-800S细胞(SONY)对CD3+CD69+或CD3+CD137+细胞进行分类,如下所记载地利用单细胞VDJ-RNA-seq分析方法分析RNA表达和TCR序列。

(基于单细胞的转录体以及TCR组库分析)

使用以下试剂,进行单细胞的捕获和文库的制备。Chromium Single Cell 5'

Library&Gel Bead Kit、PN-1000165;Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit、PN-1000120;Chromium Single Index Kit T Set A、PN-1000213;Chromium Single Cell 5' Feature Barcode Library Kit、PN-1000080;Single Index Kit N Set A、PN-1000212;Chromium单细胞V(D)J浓缩套盒、人类T细胞、PN-1000005。在Chromium微流体芯片加载包含约 $2 \times 10^4$ 个细胞的单细胞悬浮液,按照制造商的指示,使用Chromium控制器(10XGenomics)生成单细胞的凝胶珠乳胶滴(Gel Bead in Emulsion)。然后,使用Veriti Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific)在凝胶珠乳胶滴内对来自各样本的带有条形码的细胞的RNA进行逆转录,按照制造商的实验步骤(protocol),为了扩增cDNA,以14个循环进行用于生成单细胞文库的后续的所有步骤。接着,在TCR库的cDNA浓缩以及文库构建的同时,将约50ng的cDNA用于14个循环的基因表达文库扩增。文库的片段尺寸通过Agilent 2100Bioanalyzer(Agilent)确认。文库作为双端模式(pair end model)(read1:28bp;read2:91bp)用Illumina NovaSeq6000测序。原始数据通过Cell Ranger3.1.0(10XGenomics)处理。使用Seurat R包实施基于基因表达的聚类分析(gene expression-based clustering)(v3.1、Hafemeister,C.,Satija,R.Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression.Genome Biol 20,296(2019).<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1874-1>)。简而言之,对于线粒体含量超过10%的细胞,将被检测的基因小于200或超过4000的细胞视为偏离值(分别为濒死细胞、空液滴、二聚体),通过过滤去除。由于归一化使用Seurat SC Transform函数,同时处理所有样本,因此在不执行批量效应校正的情况下合并数据。以使用CLR归一化的HashTagUMI计数实施HashTag低聚反向多路复用,对克隆型使用Python脚本,通过液滴条形码与基因表达数据进行匹配。仅保留分配了单个散列标签和 $\beta$ -链克隆型的细胞用于下游分析。

#### [0222] (批量TCR测序)

用QIAzol溶解 $1 \sim 3 \times 10^5$ 个PBMC,然后使用SMARTer Technology(TakaraBio)合成全长cDNA,使用TRAC/TRBC特异性引物,扩增TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 基因的可变区。将可变区扩增子测序后,使用MiXCR软件(Bolotin,D.,Poslavsky,S.,Mitrophanov,I.et al.MiXCR:software for comprehensive adaptive immunity profiling.Nat Methods 12,380-381(2015).<https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>),将克隆型(定义为TR(A/B)V和TR(A/B)J基因和互补性决定区(CDR)3)分配给读取的各配对。对于每个 $\alpha/\beta$ 克隆型,将其克隆的读取的比例除以 $\alpha/\beta$ 链的读取总数,以此来定义扩增,为进行绘图和统计分析,将比例转换为 $\log_{10}$ 。

[0223] 通过UMAP图和单细胞基因表达,确认循环Tfh聚类由表达CD200、PDCD1、ICOS、CXCL13、CD40LG等的Tfh相关基因的细胞构成(图1A)。进而,在Tfh聚类中特定了120对的TCR(表3)。

#### 【表3-1】

TRBV	CDR3 $\beta$ 氨基酸	TRB J	TRAV	CDR3 $\alpha$ 氨基酸	TRA J	CLUS TER	患者	刺激	4-1BB 表达水平	IFENG 表达水平	CD69 表达水平	Seiuat条形码 (barcode)
TRBV2 0-1	CSASPGLNDDTQ YF	TRB J2-3	TRAV8-3	CAVLTGGYNKLI F	TRA J4	47605	健康对照	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB1_TGGTTAGAGC GCCTTG
TRBV2 0-1	CSASGTGEVGE FF	TRB J2-2	TRAV4	CLVARGGYQKV TF	TRA J13	48063	健康对照	M+N肽池	低/阴性	低/阴性	高	DB1_AACTCCCCGTC CTGCTT
TRBV3 0	CAWKQGWTEAFF	TRB J1-1	TRAV8-4	CAVSDLYGNRR LAF	TRA J7	25270	健康对照	S肽池	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB1_AGCCTCGTCA GCTCTC
TRBV7-7	CASSTSGNTGELF F	TRB J2-2	TRAV8-4	CAVSDSGAGSY QLTF	TRA J28	35098	健康对照	灭活病毒	高	中	中	DB1_ATGTGTGAGG AGTACC
TRBV7-6	CASLTGLPIYNE QFF	TRB J2-1	TRAV25	CAGLGAGNMLT F	TRA J39	22074	健康对照	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB1_TTGCCCGTCAT GTCCTC
TRBV2 0-1	CSATDRANYGYT F	TRB J1-2	TRAV35	CAASGINAGKST F	TRA J27	47996	健康对照	M+N肽池	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB1_TGTTCCGGTC CTCCAT
TRBV2 7	CASSPGQGAYN EQFF	TRB J2-1	TRAV2	CAVPPGFNKF YF	TRA J21	22783	健康对照	M+N肽池	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB1_CATCGAACAC GGTAGA
TRBV6-5	CASRTVNTEAFF	TRB J1-1	TRAV25	CAISGNARLMF	TRA J31	27505	健康对照	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	中	DB1_CCAATCCAGT GGTAGC
TRBV1 8	CASSLGQVYEQY F	TRB J2-7	TRAV26-2	CILRESKAGNM LTF	TRA J39	45929	健康对照	S肽池	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB1_CCAGCGATCT ATCCCG

【表3-2】

TRBV2	CATEAGETQYF	TRB J2-5	TRAV1-2	CAVRALTGCGN KLTF	TRA J10	28997	健康对照	S肽池	中	低/阴性	低/阴性	DBL_TGCGCAGGTT GCTCCT
TRBV5-1	CASSLVSDYEQYF	TRB J2-7	TRAV17	CATDEGDYKLS F	TRA J20	43708	健康对照	M+N肽池	低/阴性	高	低/阴性	DBL_CTCTTAGCAC TGCCAG
TRBV6-5	CASSQTTGVVEQ YF	TRB J2-7	TRAV8-4	CAVSDRIKAAG NKLTF	TRA J17	37974	健康对照	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_GCTTCCATCG TAGGAG
TRBV2-0-1	CSARAFEGELFF	TRB J1-4	TRAV12-2	CAVRRTDYKLS F	TRA J20	26900	健康对照	M+N肽池	中	低/阴性	低/阴性	DBL_TCGGGACCAC TTACGA
TRBV9	CASSVWGGGNE QFF	TRB J2-1	TRAV17	CATEGSGYSTLT F	TRA J11	11503	患者#1	S肽池	低/阴性	低/阴性	高	DBL_TGAGAGGTCC GCATCT
TRBV1-2-4	CASSLGLQGNQP QHF	TRB J1-5	TRAV17	CASRASGRSLTF	TRA J58	20367	患者#1	S肽池	高	低/阴性	低/阴性	DBL_AACGTTGCAC AAGACG
TRBV2-0-1	CSAKTSGRGETQ YF	TRB J2-5	TRAV13-2	CAENSGGSNYK LTF	TRA J53	47690	患者#1	S肽池	高	低/阴性	低/阴性	DBL_GGCTCGACAC CTATCC
TRBV6-5	CASSISGLNQPQ HF	TRB J1-5	TRAV12-3	CAMSAGSGTYK YIF	TRA J40	20204	患者#1	S肽池	中	低/阴性	低/阴性	DBL_CGCGTTTGTA AACCTC
TRBV1-9	CASSIRSSYEQYF	TRB J2-7	TRAV27	CAGVGGGSGN LIF	TRA J42	46110	患者#1	M+N肽池	低/阴性	高	低/阴性	DBL_CACATTTGTA GCTCCG
TRBV2	CASSPGGNSPL HF	TRB J1-6	TRAV8-4	CAVSAASARQLT F	TRA J22	30803	患者#1	S肽池	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_ATTGGACGTA GCGCAA
TRBV1-1-2	CASSWDGDN SPL HF	TRB J1-6	TRAV3	CAVRDKTGRRA LTF	TRA J5	30866	患者#1	S肽池	高	低/阴性	低/阴性	DBL_TAAAGAGAGTG TAATGA

【表3-3】

TRBV7-7	CASSLRVGGELFF	TRB J2-2	TRAV36 /DV7	CAVDSGTYKYIF	TRA J40	40982	患者#2	重组S蛋白	中	低/阴性	低/阴性	DB2_GTAGGCCCAA TGGTCT
TRBV3-1	CASSHDRAEQYF	TRB J2-7	TRAV30	CGTEIGTDKLIF	TRA J34	26138	患者#2	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CACTCCAGTA TAGGGC
TRBV9	CASERTSGNGE QFF	TRB J2-1	TRAV12 -2	CAVSPPPGGSYIP TF	TRA J6	11505	患者#2	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GATCTAGCAT TCCTGC
TRBV3-1	CASSPRAGAGGE LFF	TRB J2-2	TRAV38 -1	CAFMYNNND MRF	TRA J43	14496	患者#2	M+N肽池	低/阴性	高	低/阴性	DB2_AGCTCTCGTT GACGTT
TRBV2-4-1	CATSRTGGGTAE QYF	TRB J2-7	TRAV5	CAERGAAGNKL TF	TRA J17	8497	患者#2	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CGTGTCTTCT TGTA
TRBV5-4	CASSLGAGGPYN EQFF	TRB J2-1	TRAV9-2	CALTLTGNQFY F	TRA J49	22442	患者#2	重组S蛋白	中	低/阴性	低/阴性	DB2_ACCGTAATCG CTAGCG
TRBV2-0-1	CSASRGAGWMET QYF	TRB J2-5	TRAV12 -1	CVVNRGSNYKL TF	TRA J53	48660	患者#2	灭活病毒	低/阴性	中	中	DB2_CTAATGGTCG CGTAGC
TRBV2-8	CASSLPPRQGSE SPLHF	TRB J1-6	TRAV14 /DV4	CAMREGRTGGF KTIF	TRA J9	7178	患者#2	S肽池	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GAAGCAGCAA GCGCTC
TRBV5-1	CASSSSSVSYEQY F	TRB J2-7	TRAV38 -1	CAFVSTGANSK LTF	TRA J56	36273	患者#2	灭活病毒	低/阴性	高	低/阴性	DB2_GACGTGCTCA GCTGGC
TRBV1-9	CASSIAGAGKQFF	TRB J2-1	TRAV12 -2	CAFEHGSSNTG KLIF	TRA J37	45762	患者#3	M+N肽池	高	低/阴性	低/阴性	DB2_GAGCAGAAG GCATTGG
TRBV1-1-2	CASSRTYEQYF	TRB J2-7	TRAV12 -1	CVVNMNYGGS QGNLIF	TRA J42	29298	患者#3	S肽池	中	低/阴性	中	DB2_GAGCAGACAT GCATGT

【表3-4】

TRBV5-1	CASSSVQMNT AFF	TRB J1-1	TRAV22	CAVEGSGTYKYI F	TRA J40	14219	患者#3	重组S蛋白	高	低/阴性	低/阴性	DB2_GCATAACAGT TGAATA
TRBV2-7	CASSVTGVSLRE QFF	TRB J2-1	TRAV21	CAVNQRSYDKV IF	TRA J50	21747	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GCCAAAATAGT TGTCGT
TRBV6-6	CASNNRAGNTIY F	TRB J1-3	TRAV3	CAVRDPGSGAR QLTF	TRA J22	39348	患者#3	灭活病毒	中	高	低/阴性	DB2_GCGACCATCA AACCGT
TRBV5-1	CASSLPGAWNTE AFF	TRB J1-1	TRAV23	CAASYGGATNK LIF	TRA J32	14278	患者#3	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GCTTGAATCC CGACTT
TRBV5-6	CASSQAVEQYF	TRB J2-7	TRAV36	CAVAVQGAQKL VF	TRA J54	29063	患者#3	灭活病毒	低/阴性	高	中	DB2_TGTATTTCAGG TGACCA
TRBV9	CASSVGVGSDTQ YF	TRB J2-3	TRAV12	CAVRAVGDKIIF	TRA J30	36451	患者#3	S肽池	中	中	低/阴性	DB2_GGCTGGTAGT ATGACA
TRBV1-0-3	CAISEGVNLLG NQPQHF	TRB J1-5	TRAV35	CAGGVTGTASK LTF	TRA J44	1470	患者#3	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GGTGAAGGTT AAGAAC
TRBV1-2-5	CASGLVASPGAGE LFF	TRB J2-2	TRAV12	CAVKKSWASYD KVIF	TRA J50	8006	患者#3	重组S蛋白	高	低/阴性	低/阴性	DB2_GTCATTTGTC TGCCAG
TRBV3-0	CAWSVLSGRPFG GGANVLTf	TRB J2-6				1261	患者#3	灭活病毒	中	低/阴性	中	DB2_GTGCAGCCAG TCTTCC
TRBV2-4-1	CATSDLSGNQPQ HF	TRB J1-5	TRAV23	CAASKYNTDKL IF	TRA J34	30566	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GTTAAGCGTG AACCTT
TRBV1-8	CASSPDSTDTQYF	TRB J2-3	TRAV21	CALKGSDYKLS F	TRA J20	45926	患者#3	灭活病毒	低/阴性	高	中	DB2_TCATTACAGA AGGTTT
TRBV2-5-1	CASSEGDNYGY TF	TRB J1-2				40481	患者#3	S肽池	中	高	低/阴性	DB2_TGAGCCGGTA GAGCTG

【表3-5】

TRBV5-1	CASSLTGVRDGE QFF	TRB J2-1	TRAV25	CAGPLGSNFGN EKLTF	TRA J48	10652	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CTGTTTACAA GTCTAC
TRBV7-6	CASSITEGGYTF	TRB J1-2				31840	患者#3	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_TTAACTCCAA GTTCTG
TRBV7-8	CASSLGGVRADT QYF	TRB J2-3	TRAV9-2	CASDPSAGNRR KLIW	TRA J38	18009	患者#3	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	高	DB2_TTCTTAGAGT TCGCAT
TRBV1-5	CATSQDRVGSPL HF	TRB J1-6	TRAV9-2	CALSGSGSARQ LTF	TRA J22	30315	患者#3	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	高	DB2_TTTGGTTTCAT CGGTTA
TRBV5-1	CASSLPGAWNTE AFF	TRB J1-1	TRAV3	CAVRDPSGSAR QLTF	TRA J22	14278	患者#3	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GGAATAATCA GCGATT
TRBV1-3	CASSLVQVGRRY NEQFF	TRB J2-1				5459	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	高	DB2_CTGAAAACCCAT GTCGAT
TRBV2-0-1	CSASLARGQGNS PLHF	TRB J1-6	TRAV12-1	CVVNYNFKFY F	TRA J21	48327	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GCTCTGTAGG TTACCT
TRBV7-3	CASSRAGGTVDI QYF	TRB J2-3	TRAV2	CAANNAGNMLT F	TRA J39	17392	患者#3	S肽池	低/阴性	低/阴性	高	DB2_CTCGTACTCG CTTAGA
TRBV7-8	CASSDRGPGTG ELFF	TRB J2-2	TRAV12-3	CAMKRGGSQG NLIF	TRA J42	23585	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	中	DB2_CTCCTACGCAT GCATGT
TRBV1-2-3	CASSIWDILAKNI QYF	TRB J2-4	TRAV29/DV5	CAAPGYQKVTF	TRA J13	22111	患者#3	M+N肽池	低/阴性	低/阴性	中	DB2_AAAGTAGCAA TAACGA
TRBV1-8	CASSPPGLMNTE AFF	TRB J1-1	TRAV8-1	CAVNAGGNRL AF	TRA J7	39092	患者#3	S肽池	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_AAAGTAGGTA CGAAAT

【表3-6】

TRBV1 2-5	CASGLFRFGSLEK LFF	TRB J1-4	TRAV6	CALGSNARLMF	TRA J31	14643	患者#3	M+n肽池	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_ACGGAGAGTA ATCACC
TRBV1 8	CASSPGGDTQY F	TRB J2-3	TRAV13 -1	CASLRNNARL MF	TRA J31	45925	患者#3	重组S蛋白	低/ 阴性	中	低/ 阴性	DB2_ATAAGAGGTG TCCTCT
TRBV5- 6	CASSPLGRSYGYT F	TRB J1-2	TRAV5	CAESLLDGQKL LF	TRA J16	40230	患者#3	S肽池	低/ 阴性	低/ 阴性	高	DB2_ATTGGACTCG CCATAA
TRBV1 5	CATSRDPGIGETQ YF	TRB J2-5	TRAV3	CAVSALYNTDK LIF	TRA J34	9815	患者#3	灭活病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CAACCCAAAGTA TGAAAC
TRBV5- 1	CASSRMTGSTDT QYF	TRB J2-3	TRAV12 -1	CVVNP HARLMF	TRA J31	16197	患者#3	S肽池	高	高	低/ 阴性	DB2_CAAGAAAAGTG CGGTAA
TRBV2 0-1	CSADRLAGLST TQYF	TRB J2-3	TRAV9- 2	CALIPNNARLM F	TRA J31	47295	患者#3	灭活病毒	高	高	低/ 阴性	DB2_CACACTCGTG AGGGTT
TRBV5- 1	CASNQQGAGDTE AFF	TRB J1-1	TRAV13 -1	CAASKQGTGFQ KLVF	TRA J8	14285	患者#3	灭活病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CAGATCATCT GACCTC
TRBV1 1-2	CASSQTYEQYF	TRB J2-7	TRAV12 -1	CVVNRGSSYKLI F	TRA J12	29298	患者#3	重组S蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	中	DB2_CAGGTGCTCT CCGGTT
TRBV1 1-3	CASSLRGVEQYF	TRB J2-7	TRAV38 -1	CAFMKHVDGSA GSYQLTF	TRA J28	31105	患者#3	M+n肽池	低/ 阴性	低/ 阴性	中	DB2_ACGCCGATCT CGTATT
TRBV1 1-2	CASSLRGRNIQYF	TRB J2-4	TRAV26 -1	CIVKKLTTGGGN KLTFF	TRA J10	44828	患者#3	灭活病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CAITTCGCAGT CATCCA
TRBV6- 2	CASSSTSGSTYPT EQFF	TRB J2-1	TRAV13 -1	CAASISNTGNQF YF	TRA J49	2571	患者#3	灭活病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	中	DB2_CAITTCGCAGT ACGCC
TRBV1 1-2	CASSLDPVSETQY F	TRB J2-5	TRAV26 -1	CIVKKLTTGGGN KLTFF	TRA J10	38007	患者#3	灭活病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CGTTCTGTCA TCTGTT

【表3-7】

TRBV7-9	CASSLGDGSGNTIY F	TRB J1-3	TRAV8-4	CAVINSGGYQK VTF	TRA J13	36754	患者#3	M+N肽池	中	低/阴性	低/阴性	DB2_CTCGTACCAG GGTACA
TRBV28	CASSLAEGGHGN TIYF	TRB J1-3	TRAV8-4	CAVRAGTASKLT F	TRA J44	50955	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CGGAGTCTCG GCGGTT
TRBV6-1	CASSVYYGYTF	TRB J1-2	TRAV29/DV5	CAASRLGTASKL TF	TRA J44	26565	患者#3	灭活病毒	中	低/阴性	低/阴性	DB2_CGGAGTCCAG CCAGAA
TRBV7-9	CASSLVGEQYF	TRB J2-7				29162	患者#3	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CGTCTACAGA GTACCG
TRBV18	CASSRSLGLMNT EAF	TRB J1-1				15086	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CCCTCCTAGA GCAATT
TRBV4-2	CASSQADRGESP LHF	TRB J1-6	TRAV8-4	CAVSDRGSARQ LTF	TRA J22	19609	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CCAGCGAAGC TAACTC
TRBV14	CASSRTSGWTD QYF	TRB J2-3	TRAV8-3	CAVGARTGRRR LTF	TRA J5	8189	患者#3	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CCAATCCGTT CACGGC
TRBV28	CASSTMSGVETQ YF	TRB J2-5	TRAV19	CALSANTGRRR LTF	TRA J5	37164	患者#3	S肽池	中	低/阴性	低/阴性	DB2_CGCCAAGCAT ATACGC
TRBV5-4	CASRAAGTGAWG YTF	TRB J1-2	TRAV38-1	CAFMYNNND MRF	TRA J43	20875	患者#4	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_GCTTGAAAGG CTAGCA
TRBV5-5	CASSRGLAGIPTG ELFF	TRB J2-2	TRAV29/DV5	CAASPMNRDDK IIF	TRA J30	5395	患者#4	M+N肽池	高	中	低/阴性	DB3_GCACATACAT AGGATA
TRBV20-1	CSARLLGGQASY EQYF	TRB J2-7	TRAV8-3	CQKLLF	TRA J16	47226	患者#4	M+N肽池	中	中	低/阴性	DB3_GGAGCAACAA ACGTGG
TRBV6-1	CASSEFGTGEQFF	TRB J2-1	TRAV26-1	CIVRVKGGGSN YKLLTF	TRA J53	42080	患者#4	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_GGCCGATCAC ATCCAA

【表3-8】

TRBV6-2	C ASTRGVTDYQY F	TRB J2-3	TRAV36 /DV7	CADLTQGGSEK LVF	TRA J57	45445	患者#4	M+N肽池	低/阴性	低/阴性	高	DB3_GGCTGGTGTA GTGAAT
TRBV2	CASSPHDYEQFF	TRB J2-1	TRAV22	CAVKGLGSTGN QFYF	TRA J49	27381	患者#4	M+N肽池	低/阴性	低/阴性	中	DB3_GGGTTGCTCC GTACAA
TRBV2-0-1	CSALPAGGRNEQ YF	TRB J2-7	TRAV36 /DV7	CAVASQGGSEK LVF	TRA J57	47821	患者#4	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	高	DB3_GTAGGCCAGA TGTTAG
TRBV1-1-2	CASPTYEQYF	TRB J2-7	TRAV12 -1	CVVNRGSSYKLI F	TRA J12	29298	患者#4	S肽池	低/阴性	高	低/阴性	DB3_GTCACAAAGTG AAAGAG
TRBV7-2	CASSLDGARSYN EQFF	TRB J2-1	TRAV21	CAVGSNYQLIW	TRA J33	23764	患者#4	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	中	DB3_TAGTGGTCAG CGATCC
TRBV5-1	CASAVGGLTNEK LFF	TRB J1-4	TRAV20	CAVGFQGGSEK LVF	TRA J57	10942	患者#4	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_TACGGTAAGG AGCGAG
TRBV1-0-3	CAITRDTDGYTF	TRB J1-2	TRAV12 -1	CVVNNARLMF	TRA J31	41543	患者#4	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_TACTTGTGTA GTACCT
TRBV1-2-3	CASSLVTGSTEAF F	TRB J1-1	TRAV12 -3	CAMSRPGAGSY QLTF	TRA J28	34575	患者#4	重组S蛋白	高	低/阴性	低/阴性	DB3_TAGCCGGCAT GGGACA
TRBV7-3	CASSLAGGSTDT QYF	TRB J2-3	TRAV2	CASHNAGNMLT F	TRA J39	17390	患者#4	S肽池	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_TCAGGTAGTG GCAAAAC
TRBV7-2	CASSPMGDSADT QYF	TRB J2-3	TRAV8-1	CAVNAGRRLT F	TRA J5	17435	患者#4	S肽池	低/阴性	低/阴性	中	DB3_TCCACACCGTG ATGCC
TRBV2-5-1	CASSPGSGHNEQ FF	TRB J2-1	TRAV9-2	CALSGGWDSGY STLTF	TRA J11	34790	患者#4	重组S蛋白	低/阴性	高	低/阴性	DB3_TGACGGCCAA GTACCT

【表3-9】

TRBV1 1-2	CASSLGIDEQFF	TRB J2-1	TRAV23 /DV6	CAAKGGSQGNL IF	TRA J42	27964	患者#4	M+N肽池	中	高	低/ 阴性	DB3_TGCACCTAGC AATATG
TRBV4 3	CASSQERVSGYE QYF	TRB J2-7	TRAV13 -1	CAASISGSARQL TF	TRA J22	16803	患者#4	S肽池	中	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_GCACATACAG ACGCAA
TRBV2 0-1	CSARDIGGGTSPL HF	TRB J1-6	TRAV23 /DV6	CAATSATSGTYK YIF	TRA J40	19940	患者#4	S肽池	中	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_TTCTACAAAGT AGATGT
TRBV1 1-2	CASSPTYEQYF	TRB J2-7	TRAV12 -1	CVVNRGSSYKLI F	TRA J12	29298	患者#4	S肽池	低/ 阴性	中	低/ 阴性	DB3_TACAGTGCAG GAATCG
TRBV5 1	CASSAMVGQETQ YF	TRB J2-5	TRAV13 -1	CALGDSGYALN F	TRA J41	35856	患者#4	失活病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_GAGTCCGCAG ACGCAA
TRBV2	CASRKADRRQGLI RSYEQYF	TRB J2-7	TRAV1- 2	CARGKPGANNL FF	TRA J36	1220	患者#4	S肽池	低/ 阴性	高	高	DB3_CGATTGAAGG ATATAC
TRBV6 5	CASRPEKRSNGTI YF	TRB J1-3	TRAV9- 2	CALSPSILYGGQ NFVF	TRA J26	15305	患者#4	S肽池	中	高	中	DB3_GAAGCAGCAC CAGCAC
TRBV1 1-3	CASSLGGQETQY F	TRB J2-5	TRAV9- 2	CAPHTGGTSYG KLTF	TRA J52	31107	患者#4	S肽池	低/ 阴性	低/ 阴性	高	DB3_TTTGGTTGTT CGCGAC
TRBV2	CASSAHRGDEKL FF	TRB J1-4	TRAV12 -1	CVVNNPNAGN MLTF	TRA J39	32292	患者#4	重组S蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_ACGAGGAGTA GCGTGA
TRBV4 3	CASSQERVSGYE QYF	TRB J2-7	TRAV13 -1	CAASISGSARQL TF	TRA J22	16803	患者#4	S肽池	高	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_AGCATACAGT TAACGA
TRBV4 3	CASSQDIGESPLH F	TRB J1-6	TRAV8- 3	CAVTSQTYKYIF	TRA J40	30270	患者#4	失活病毒	低/ 阴性	高	低/ 阴性	DB3_AGTGTCACAG CTTAAC
TRBV1 1-2	CASSSPGTSQGTG TGELFF	TRB J2-2	TRAV8- 3	CAVGARWGTGNQ FYF	TRA J49	781	患者#4	S肽池	中	高	低/ 阴性	DB3_CAACTAGCAT TCCTCG

【表3-10】

TRBV4-2	CASSAQGEGTEA FF	TRB J1-1	TRAV17	CATGSYSTLTF	TRA J11	32454	患者#4	重组S蛋白	低/阴性	高	低/阴性	DB3_CATGCGGAGC AGCGTA
TRBV2 0-1	CSARSPRGGAYE QYF	TRB J2-7				48449	患者#4	S肽池	高	低/阴性	低/阴性	DB3_CGATGGCTCA GCCGATT
TRBV5-4	CASSFGPTSVEQ YF	TRB J2-7	TRAV12-1	CVVEDTGRRAL TF	TRA J5	15992	患者#4	灭活病毒	高	低/阴性	低/阴性	DB3_CGCCAAGAGC CAGTTT
TRBV6-1	CASTPDKEYNQP QHF	TRB J1-5	TRAV10	CVVSGNTGGFK TIF	TRA J9	19544	患者#4	M+N肽池	高	低/阴性	低/阴性	DB3_CCTCAGTGTT CAGTAC
TRBV1 9	CASSMRAGEGGE TQYF	TRB J2-5				51817	患者#4	灭活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_CGCGTTTTTCT GGAGCC
TRBV2	CASRPQNGGYT F	TRB J1-2				31602	患者#4	S肽池	低/阴性	低/阴性	高	DB3_CGGAGCTAGA TCCCCAT
TRBV1 2-4	CASRPDRSNSPL HF	TRB J1-6	TRAV9-2	CALSQNTGGFK TIF	TRA J9	20424	患者#4	灭活病毒	高	低/阴性	低/阴性	DB3_CGTAGCGGTT TGGCGC
TRBV3 0	CAWSPLGSGDEK LFF	TRB J1-4	TRAV9-2	CALSGQAGTALI F	TRA J15	24920	患者#4	S肽池	低/阴性	中	低/阴性	DB3_CGTCCATTCG TACGGC
TRBV5-1	CASSLRQGGTGE LFF	TRB J2-2				13710	患者#4	重组S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_CTACACCTCG TTTTAG
TRBV1 1-2	CASSLGTEETQYF	TRB J2-5	TRAV30	CGTERTGTSY GKLTTF	TRA J52	44725	患者#4	M+N肽池	高	高	低/阴性	DB3_CTACGTCCTCAT CTCCCA
TRBV6-5	CASSYSGQGRSPL HF	TRB J1-6	TRAV1-2	CAVKMDSYKLI F	TRA J12	20677	患者#4	M+N肽池	中	低/阴性	低/阴性	DB3_TTTGTACACAT GCCCTTC

【表3-11】

TRBV2 8	CASSGQKLAKNI QYF	TRB J2-4	TRAV27	CAGPRGSNYKL TF	TRA J53	21951	患者#5	S肽池	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_GAGCAGAGTA CTTAGC
TRBV4 1	CASSPGGQGRYQ PQHF	TRB J1-5	TRAV9- 2	CALSTNAGKST F	TRA J27	50390	患者#5	重组S蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_CAGCGACGTT ATTCTC
TRBV7- 3	CASSSTGGQETQ YF	TRB J2-5	TRAV13 -1	CAAFQGAQKLV F	TRA J54	38135	患者#5	灭活病毒	低/ 阴性	高	低/ 阴性	DB3_AGTCTTTTCAC CGAAAG
TRBV1 9	CASSPGRQVEAF F	TRB J1-1	TRAV8- 3	CARIGYSTLTF	TRA J11	34375	患者#5	灭活病毒	中	高	低/ 阴性	DB3_GCAGGCCATCA TGTCCC
TRBV3- 1	CASSPTLGGASYE QYF	TRB J2-7	TRAV29 /DV5	CAARATYSGAG SYQLTF	TRA J28	51305	患者#5	M+N肽池	高	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_ACTGCTCGTC TCCACT
TRBV1 1-3	CASSLHPGGGYE EQYF	TRB J2-7	TRAV13 -1	CAASRAGTALIF	TRA J15	31056	患者#5	灭活病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_TGCCCTAAGA GTAATC
TRBV6- 1	CASSTDSAARPQ HF	TRB J1-5	TRAV12 -1	CVVNMRRSNTG KLIF	TRA J37	38619	患者#5	重组S蛋白	低/ 阴性	中	低/ 阴性	DB3_CTGCGGATCT ATCCTA
TRBV5- 4	CASRTSLADPNE QFF	TRB J2-1	TRAV5	CAAEADAGNML TF	TRA J39	22454	患者#5	S肽池	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_GGTGAAGCAA GAGGCT

这些之中,检测了患者之间共有的TCR $\alpha\beta$ 对。

将这些TCR $\alpha\beta$ 对指定为来自患者X1和X2的克隆1和2,它们共享分别相同的Va,Ja,V

$\beta$ 和 $J\beta$ 的使用。进而,发现克隆1和2的CDR3 $\alpha$ 序列是相同的,CDR3 $\beta$ 除一个氨基酸以外是相同的(表4以及图2)。克隆1和2虽然来自不同的受试体,但从序列类似性推定其识别相同的表位。此外,该表位都自Tfh聚类得到确定,可期待该表位是容易诱导Tfh的表位。

【表4】

	TRBV	CDR3 $\beta$	TRBJ	TRAV	CDR3 $\alpha$	TRAJ	供者
克隆 1	TRBV11-2	CASSQTYEQYF	TRBJ2-7	TRAV12-1	CVVNRGSSYKLIF	TRAJ12	患者#3
克隆 2	TRBV11-2	CASSPTYEQYF	TRBJ2-7	TRAV12-1	CVVNRGSSYKLIF	TRAJ12	患者#4
克隆 2	TRBV11-2	CASSPTYEQYF	TRBJ2-7	TRAV12-1	CVVNRGSSYKLIF	TRAJ12	患者#4

[0224] 对于患者Ts-018,克隆2被检测为共享完全相同的TCR序列的两个不同的条形码细胞。为了检查TCR、克隆型1和2的抗原特异性,分别将TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链转染到TCR缺失T细胞杂交瘤,构建了TCR重组CD3<sup>+</sup>细胞(图1B)。

[0225] 在用来自对应的各患者的爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)转化的B细胞的存在下,用各种抗原刺激这些TCR转染子。

[0226] 克隆1和2虽然对重组S蛋白质和S肽池应答了,但未对M+N肽池应答。这与在单细胞分析中揭示的初始抗原特异性一致(图3A)。

[0227] 由于排除了在不存在抗原呈递细胞的情况下的活化,因此确认活化是以MHC分子为媒介的(图3B)。

[0228] 在成池了的2个池的小瓶(vial)#1(S1-643)和#2(S633-1273)中,只有后者的池刺激了克隆1和2,因而可知抗原肽被包含于S蛋白质633-1273的位置中(图3C)。

[0229] 然而,含有与304-338、421-475、492-519、683-707、741-770、785-802以及885-1273的位置对应的175个肽的可在其他方面利用的SARS-CoV-2S肽池(PepTivator(注册商标))(图4)却未活化克隆1和2(图3D)。

[0230] 这些结果启示了克隆1和克隆2的抗原表位位于S蛋白质的氨基酸633-682、708-740、771-784或803-884中(图4)。

[0231] 然后,为了进一步减少表位的候选肽的数量,确定了限制克隆1和2的HLA等位基因。

发现来自患者Ts-017和Ts-018这两者的抗原呈递细胞(APC)可以活化克隆1和2。这显示出APC可以相互交换(图3E)。

因此,将DRB1\*15:01、DPA1\*02:02-DPB1\*05:01、DQA1\*01:02-DQB1\*06等在Ts-017和Ts-018之间共有的MHC II类等位基因分别是HLA的候补。然后,为检查克隆1和2对S肽的识别,分别对这些等位基因进行转染。

[0232] 克隆1和2两者都在只有DRA\*01:01和DRB\*15:01存在的情况下应答S肽池#2,由于DRA是单形性的,因此表明应答性是由DRB\*15:01决定的(图5B)。

[0233] 因此,使用NetMHC服务器软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>),检索被预料为与DRA-DRB1\*15:01结合的候选肽(图5C)。

[0234] 预测一些强力的粘合剂( $S_{828-846}$ 以及 $S_{864-882}$ )为S蛋白质的被缩小的区域内的候选

者(图5D)。因此,通过合成2个肽刺激克隆1和2,将肽 $S_{864-882}$ 确定为克隆1和2这2者的表位(图5E)。

[0235] 虽然克隆1和2的TCR在CDR3中的一个氨基酸(第89位的Pro和Gln)是不同的,但由于两者的TCR是识别由相同的MHC分子呈递的相同的表位,并来源于不同的供者,因此启示了克隆1和2是公共克隆。该表位与其他流感病毒的对应的氨基酸序列之间的相同性较低。

[0236] 实际上,在表达DRA-DRB1\*15:01的APC存在下,克隆1和2都对来自HCoV-OC43S蛋白质的肽池和全蛋白质完全没有应答(图6A)。进而,由于包括重症急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)以及中东呼吸综合征相关冠状病毒(MERS-CoV)的其他HCoV都不具有相同的表位(图6B),因此表明克隆1/2与相关的人类冠状病毒发生交叉反应的可能性很低。

[0237] 接着,调查了除DRB1\*15:01以外的MHC II类等位基因是否可以呈递被克隆1/2识别的该抗原肽。

[0283] 其结果,也可将 $S_{864-882}$ 预测为对DRB1\*15:02和15:01的强力粘合剂(图6C)。此外,DRB1\*15:01和\*15:02之间的氨基酸序列同一性为99.6%。因此,推测DRB1\*15:02也是负责表位识别的等位基因,并对来自另一个人的APC进行测试,该APC具有DRB1\*15:02但不具有DRB1\*15:01。其结果,可知在 $S_{864-882}$ 的存在下DRB1\*15:02能够刺激克隆1和2这两者(图6D)。

[0239] 考虑到日本人群中的DRB1\*15:02(10.6%)和\*15:01(7.7%)的频率(<http://hla.or.jp/>),如果这些克隆型存在,则预料在18.3%的口中克隆1和2会对该肽应答。在本实施例中,在6人中的2人中确认到了克隆1/2。

[0240] 接着,调查在SARS-CoV-2大流行前的日本献血者样本中的克隆2/3的克隆型的发生,结果可知27人中的9人不具有克隆1/2的TCR $\beta$ 克隆型。这与本实施例的比例相同。

[0241] 其次,考虑到克隆1/2是显示Tfh概貌(profile)的SARS-CoV-2特异性T细胞,为了促进防御性体液免疫,假定克隆1/2在感染时克隆性地增殖,进行如下调查。

[0242] 由于DRB1\*15:01/15:02在全世界并非为小众的等位基因(参照<http://www.allelefrequencies.net/tools/Report.aspx>),在美国市民的公开数据库(COVID-19事件的免疫应答活动;ImmuneRace,<https://immunerace.adaptivebiotech.com/>)中,调查了健康的个人( $n=786$ )和从COVID-19感染中恢复的个人( $n=1,413$ )中的克隆1/2的克隆型的发生频率。克隆型在健康组和恢复组中分别被检测到了17%和24%(图6E上)。特别是,由于观察到与健康对照相比,各个人之间的这种克隆型的频率在COVID-19恢复组中显著增加( $p=0.0028$ ),这表明该S蛋白质特异性克隆在感染时在不同个体中克隆性地扩增了(图4E下)。有趣的是,克隆1/2的克隆类型在恢复患者中的发生频率大于世界中的DRB1\*15:01或15:02等位基因频率(11.3%),因此认为克隆1/2可能会识别被其他HLA等位基因所呈递的来自其他的SARS-CoV-2的表位。

[0243] 总之,识别SARS-CoV-2及其表位的公共T细胞克隆的最初的特定被认为有助于诊断策略或选择项和下一代疫苗的开发。

[0244] (实施例3)

通过实施例1进行的肽的外周血单个核细胞(PBMC)的再刺激测定

将从实施例1的实验参与者所得到的PBMC  $1.0 \times 10^5$  cells悬浮于RPMI1640培养基(添加5%人类血清、青霉素/链霉素)100 $\mu$ L中,加入实施例1的肽使之成为1 $\mu$ g/ml,在96孔板(U底)培养(Day0)。

[0245] 接着,在Day4和Day7添加IL-2使之成为10IU/ml。适当进行培养基传代 (passage)。

[0246] 在Day10使用细胞分选机 (cell sorter) SH-800S (SONY) 对细胞进行如下分选。使用CD3、CD4抗体以及PI染色,按照FSC SSC gating、PI negative gateing、CD3positive gating、CD4positive cells的顺序进行分选。此时,使用CXCR5、CD45RA、PD-1抗体染色,还进行FCM分析。

[0247] 将分选得到的CD4 positive cells  $2.0 \times 10^4$  cells以及因EBV感染无限增殖化的来自患者的B细胞 $3.0 \times 10^3$  cells悬浮于RPMI1640培养基 (5%人类血清) 50 $\mu$ L中,在用96孔板 (U底) 培养多个孔 (well)。对其中半数中添加SARS-CoV-2S<sub>864-882</sub>肽,使成为1 $\mu$ g/ml。

[0248] 24小时后,回收培养基的上清液,使用ELISA对人类IL-21进行测定。

[0249] 测定的结果,可知通过实施例1的肽刺激的情况时,与不施加刺激的情况相比较,培养基中的IL-21浓度高。根据该结果,表明通过实施例1的肽的刺激,滤泡性T细胞促进生发中心的形成以及抗亲和性抗体的产生。

[0250] (实施例4)

通过SARS-CoV-2S<sub>864-882</sub>进行的外周血单个核细胞 (PBMC) 的再刺激测定

使从实验参与者所得到的PBMC  $1.0 \times 10^5$  cells悬浮于RPMI1640培养基 (添加5%人类血清、青霉素/链霉素) 100 $\mu$ L中,添加SARS-CoV-2S<sub>864-882</sub>肽至成为1 $\mu$ g/ml,在96孔板 (U底) 培养 (Day0)。

[0251] 接着,在Day4和Day7添加IL-2至成为10IU/ml。适当进行培养基的传代。

[0252] 在Day10使用细胞分选机 (cell sorter) SH-800S (SONY) 对细胞进行如下分选。使用CD3、CD4抗体以及PI染色,按照FSC SSC gating、PI negative gateing、CD3positive gating、CD4positive cells的顺序进行分选。此时,使用CXCR5、CD45RA、PD-1抗体染色,还进行FCM分析。

[0253] 将分选得到的CD4positive cells  $2.0 \times 10^4$  cells以及因EBV感染无限增殖化的来自患者的B细胞 $3.0 \times 10^3$  cells悬浮于RPMI1640培养基 (5%人类血清) 50 $\mu$ L中,在96孔板 (U底) 的多个孔中培养。对其中半数中添加SARS-CoV-2S<sub>864-882</sub>肽至成为1 $\mu$ g/ml。

24小时后,回收培养基上清液,用ELISA对人类IL-21进行测定。测定结果如图7所示。

[0254] 测定的结果,可知通过SARS-CoV-2S<sub>864-882</sub>肽刺激的情况时,与不施加刺激的情况相比较,培养基中的IL-21浓度高。根据该结果,表明通过SARS-CoV-2S<sub>864-882</sub>肽刺激,利用滤泡性T细胞的生发中心的形成以及抗亲和性抗体的产生得到促进。

[0255] (实施例5:感染履历的评价)

本实施例中,对感染履历进行评价。

虽然根据抗体评价感染履历经常进行,但由于特异性免疫细胞与抗体相比维持更长时间,在调查感染履历方面,确定感染源特异性的免疫细胞是有益的。使用含有感染源特异性表位的探针的T细胞检测法,作为能简便地检测感染后成立并维持的免疫细胞的方法是有益的。有无与探针反应的T细胞,可通过使用外周血单个核细胞 (PBMC) 的ELISPOT或使用流式细胞仪的体系容易地检测。若检测出探针反应性的T细胞,则判定为过去有过感染。

[0256] (材料和方法)

(材料)

流感病毒的情况时

作为抗原使用Influenza A,Hemagglutinin,Brisbane (funakoshi)。

肠出血性大肠杆菌感染症的情况时

作为抗原使用来自大肠杆菌0157的脂多糖 (Wako)。

真菌性肺炎的情况时

作为抗原使用标准菌株 (KWIK-STIK 2pack) 来自ATCC 204305 01021P (AS ONE) 的烟曲霉。

[0257] (实验步骤)

通过ELISPOT测试来检查受试体的外周血中是否有感染源特异性免疫细胞。此处所用的ELISPOT测试中,使用了涂覆了可检测滤泡性T细胞产生的IL-21的抗体的板。将外周血单个核细胞(PBMC)添加入孔中,用上述抗原刺激36小时。所分泌的IL-21与处于产生细胞的周边的捕获用抗体结合。通过清洗去除细胞后,添加用于检测的细胞因子抗体,检测斑点。作为阴性对照,在不进行利用来自感染源的抗原的刺激的情况下进行测定。

(结果)

确认IL-21的分泌时,可判断存在感染履历。

[0258] (实施例6:疫苗有效性评价、再感染防御能力的评价)

本实施例中,进行疫苗有效性评价、再感染防御能力评价。

由于特异性免疫细胞与抗体相比维持更长时间,在再感染时能迅速应答,因此可评价免疫细胞的防御能力。此外,由于滤泡性T细胞在众多T细胞分级分离中为对体液免疫的诱导与强化(亲和性成熟)重要的分级分离,因此特别是对于具有与含有诱导滤泡性T细胞的该感染源表位的探针进行反应的T细胞的受试体,可判断为具有更强的或具有质的优势性的感染防御能力。因此,作为感染后或摄取疫苗后成立的免疫评价法,检查在PBMC中是否有探针反应性细胞被认为是有效的。评价方法与上述同样地可使用ELISPOT或流式细胞仪。这些方法可变更检测的细胞因子,或通过使表面抗原探针组合,从而也可检测与表位探针反应的T细胞实际上是否为滤泡性T细胞,或有多少程度的比例是这样的,可根据检测灵敏度或判定基准来设计实验体系。

[0259] (材料和方法)

(材料)

流感病毒的情况时

作为抗原使用Influenza A,Hemagglutinin,Brisbane (funakoshi)。

肠出血性大肠杆菌感染症的情况时

作为抗原使用来自大肠杆菌0157的脂多糖 (Wako)。

真菌性肺炎的情况时

作为抗原使用标准菌株 (KWIK-STIK 2pack) 来自ATCC 204305 01021P (AS ONE) 的烟曲霉。

(实验步骤)

通过ELISPOT测试来检查受试体的外周血中是否有感染源特异性免疫细胞。此处所用的ELISPOT测试中,使用涂覆了可检测滤泡性T细胞产生的IL-21的抗体的板。将外周血单个核细胞(PBMC)添加入孔中,用上述抗原刺激36小时。所分泌的IL-21与处于产生细胞的周

边的捕获用抗体结合。通过清洗去除细胞后,添加用于检测的细胞因子抗体,检测斑点。作为阴性对照,在不进行利用来自感染源的抗原的刺激的情况下进行测定。

(结果)

确认IL-21的分泌时,可判断免疫细胞的防御能力是有效的。

[0260] (实施例7:癌症免疫药物(免疫检查点等)有效性评价)

本实施例中,对癌症免疫药物(免疫检查点等)有效性进行评价。

若针对癌症抗原的体液免疫应答被引发,则可期待更高的抗肿瘤性。因此,被更多地检测出诱导抗肿瘤体液免疫应答的滤泡性T细胞的受试体,其抗肿瘤免疫容易活化,免疫检查点抑制剂等强化受试体的抗肿瘤免疫的药物被认为会更有效。

认为通过评价自肿瘤活检样本或外周血得到的T细胞与表位探针的反应性,评价受试体的抗肿瘤免疫的活跃度,有助于治疗方法的选择。此外,通过结合表位探针和流式细胞仪,评价给药时的表位特异性滤泡性T细胞(肿瘤特异性T细胞)的活化或耗竭度,期待检查抗肿瘤免疫的活动是否得以维持。这对于免疫检查点抑制剂在今后是否有效,判断是否应中断治疗摸索其他治疗方法等是有效的。

[0261] (材料和方法)

(材料)

肺癌的情况时

作为抗原使用肺癌标志物CEA。

胃癌的情况时

作为抗原使用胃癌标志物CA19-9。

[0262] (实验步骤)

通过ELISPOT测定来检查受试体的外周血中是否有抗原特异性免疫细胞。此处所用的ELISPOT测定中,使用了涂覆有可检测滤泡性T细胞产生的IL-21的抗体的板。将外周血单个核细胞(PBMC)添加入孔中,用上述抗原刺激36小时。所分泌的IL-21与处于产生细胞的周边的捕获用抗体结合。通过清洗去除细胞后,添加用于检测的细胞因子抗体,检测斑点。作为阴性对照,在不进行基于抗原的刺激的情况下进行测定。

[0263] (结果)

与阴性对照相比较,确认了IL-21分泌增加时,可判断癌症免疫药物有效地发挥作用。

[0264] (实施例8:伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险评价(未患病时)、病情评价)

本实施例中,对伴随自身抗体的自身免疫性疾病的风险(未患病时)、病情进行评价。

伴随自身抗体的自身免疫性疾病很多,但其中在被认为自身抗体具有病原性的疾病(例如ANCA相关性血管炎)中,与产生自身抗体的B细胞相互作用的滤泡性T细胞的有无、增减,被认为与伴随B细胞的成熟的发病和病情恶化/复发有关。因此,认为通过检测呈递来自疾病特异性的自身抗原的表位的滤泡性T细胞,可评价疾病风险(发病前)或疾病活跃度。

作为试验方法,对取自受试体的PBMC的探针反应性细胞,使用ELISPOT或流式细胞仪来检查。

[0265] (材料和方法)

(材料)

过敏性皮炎的情况时

作为抗原使用引起过敏性皮炎的自身抗体。

过敏性鼻炎的情况时

作为抗原使用引起过敏性鼻炎的自身抗体。

哮喘的情况

抗原使用引起哮喘的自身抗体。

[0266] (实验步骤)

通过ELISPOT测定来检查受试体的外周血中是否有抗原特异性免疫细胞。此处所用的ELISPOT测试中,使用了涂覆有可检测滤泡性T细胞产生的IL-21的抗体的板。将外周血单个核细胞(PBMC)添加入孔中,用上述抗原刺激36小时。所分泌的IL-21与处于产生细胞的周边的捕获用抗体结合。通过清洗去除细胞后,添加用于检测的细胞因子抗体,检测斑点。作为阴性对照,在不进行基于抗原的刺激的情况下进行测定。

[0267] (结果)

与阴性对照相比较确认到IL-21分泌增加时,可判断癌疾病风险(发病前)或疾病活跃度高。

[0268] (实施例9:数字健康应用例)

如以上实施例所述,表位特异性T细胞应答可适用于各种疾病。一方面,表位或抗原自身不清楚的疾病存在也是事实,因而在研究期间共享对包含各种患者的已知的疾病相关表位的各种表位的滤泡性T细胞应答的数据,作为用于获得新发现的基盘作为大数据来运用。作为试验方法考虑使用ELISPOT或流式细胞仪对自受试体取样的PBMC的探针反应性细胞进行检查。

(材料和方法)

(材料)

将抗原不清楚的全身性红斑狼疮作为对象疾病考虑。

对此,将来自已知的感染症等的抗原的表位或随机准备的表位面板(panel)化而使用,评价滤泡性T细胞对各个表位的应答或水平。

(实验步骤)

通过ELISPOT测定来检查受试体的外周血中是否有抗原特异性免疫细胞。此处所用的ELISPOT测试中,使用了涂覆有可检测滤泡性T细胞产生的IL-21的抗体的板。将外周血单个核细胞(PBMC)添加入孔中,用上述抗原刺激36小时。所分泌的IL-21与处于产生细胞的周边的捕获用抗体结合。通过清洗去除细胞后,添加用于检测的细胞因子抗体,检测斑点。作为阴性对照,在不进行基于抗原的刺激的情况下进行测定。

[0269] (结果)

将阴性对照与各表位的IL-21分泌量信息与临床信息作为数据共享、保管,用于将来的诊断方法开发或疾病的细分化、治疗方法选择法的开发。

[0270] 此外,本发明不限于上述实施例,在本发明的宗旨的范围内可进行各种变形来实施。

[0271] (备注)

如上所述,虽然使用本发明的优选的实施方式示例了本发明,但是本发明不应当限定为这些实施方式来解释。可理解本发明应仅通过权利要求书解释其范围。可理解本领域技术人员可从本发明的具体的优选的实施方式的记载内容,根据本发明的记载和技术常识,在等同范围实施。可理解本说明书中所引用的专利、专利申请以及文献,其内容应当与具体地记载于本说明书中的同样地援引,以作为对本说明书的参考同。本申请主张2021年3月16日提出的日本专利申请特愿2021-42670的优先权,其内容整体在本申请中作为参考引用。

**【产业上的可利用性】**

[0272] 本发明可在疫苗开发、细胞疗法、诊断技术等领域中应用。

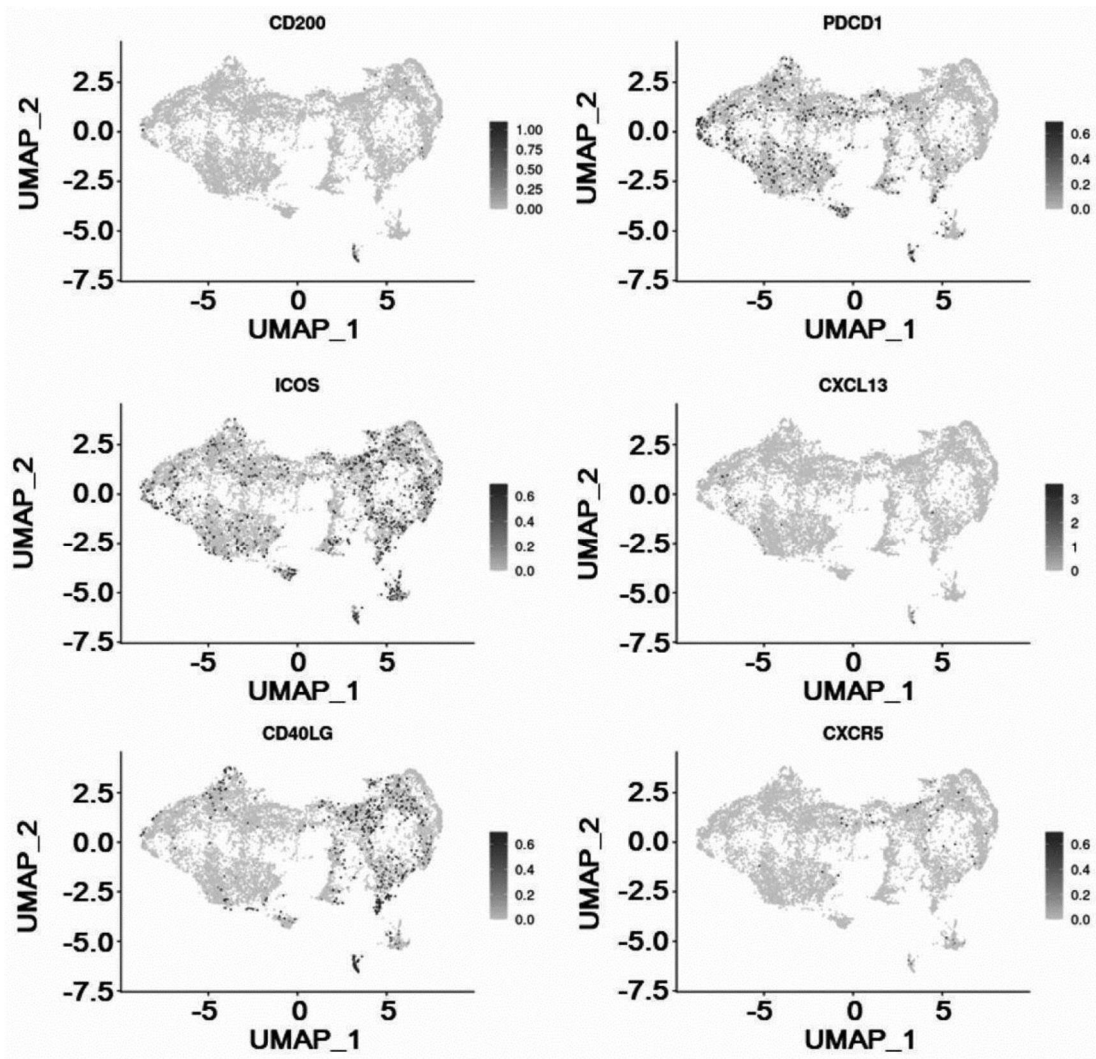


图1

克隆1	TRAV12-1	TGTGTTGGTGAACCGGGGGAGCAGCTATAAATTGATCTTC	TRAJ12
		C V V N R G S S Y K L I F	
克隆2	TRAV12-1	TGTGTTGGTGAACAGAGGTAGCAGCTATAAATTGATCTTC	TRAJ12
		C V V N R G S S Y K L I F	
克隆1	TRBV11-2	TGTGCCAGCAGTCAFAACCTACGAGCAGTACTTC	TRBJ2-7
		C A S S Q T Y E Q Y F	
克隆2	TRBV11-2	TGTGCCAGCAGTCCCTAACCTACGAGCAGTACTTC	TRBJ2-7
		C A S S P T Y E Q Y F	

图2

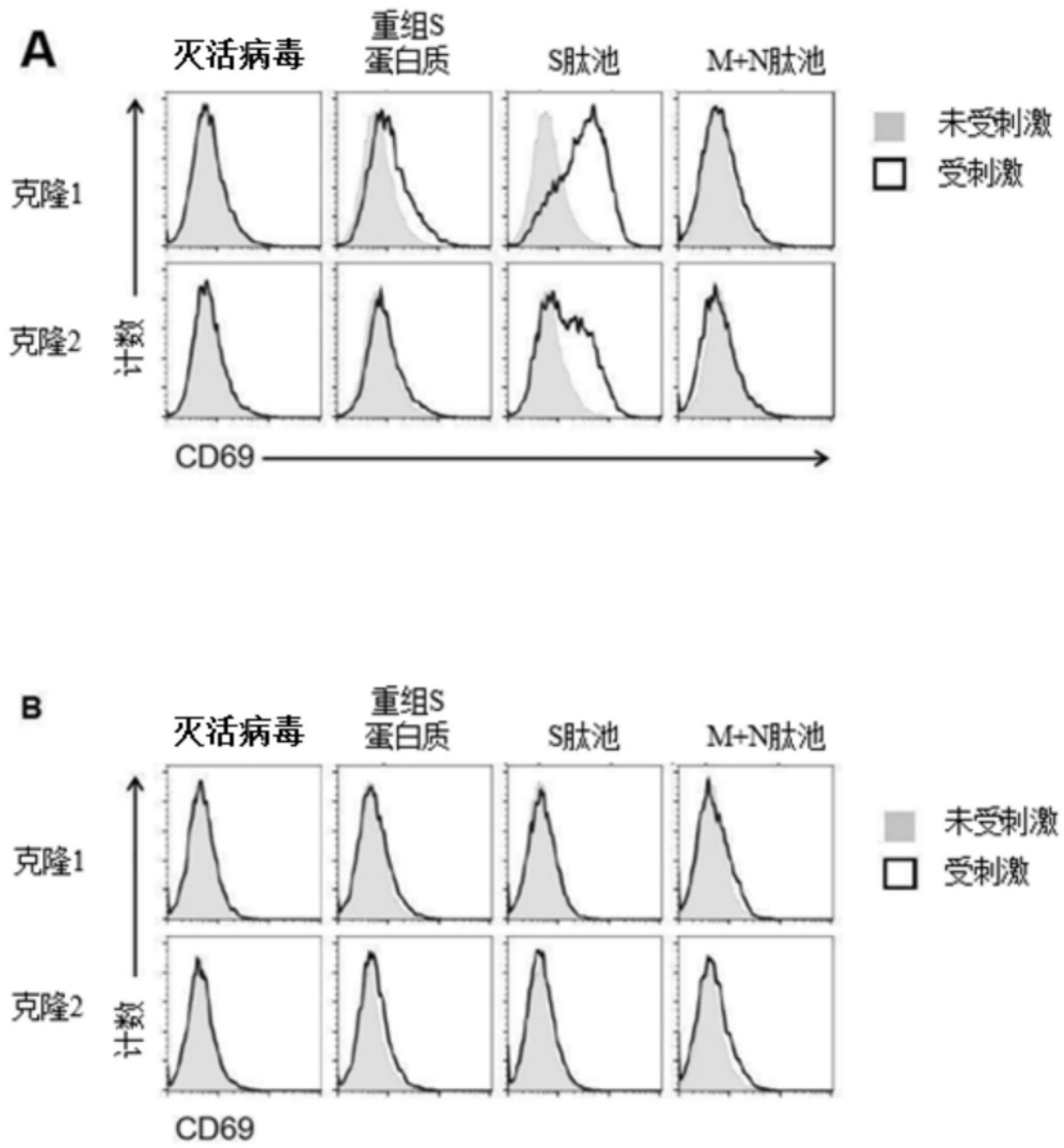


图3-1

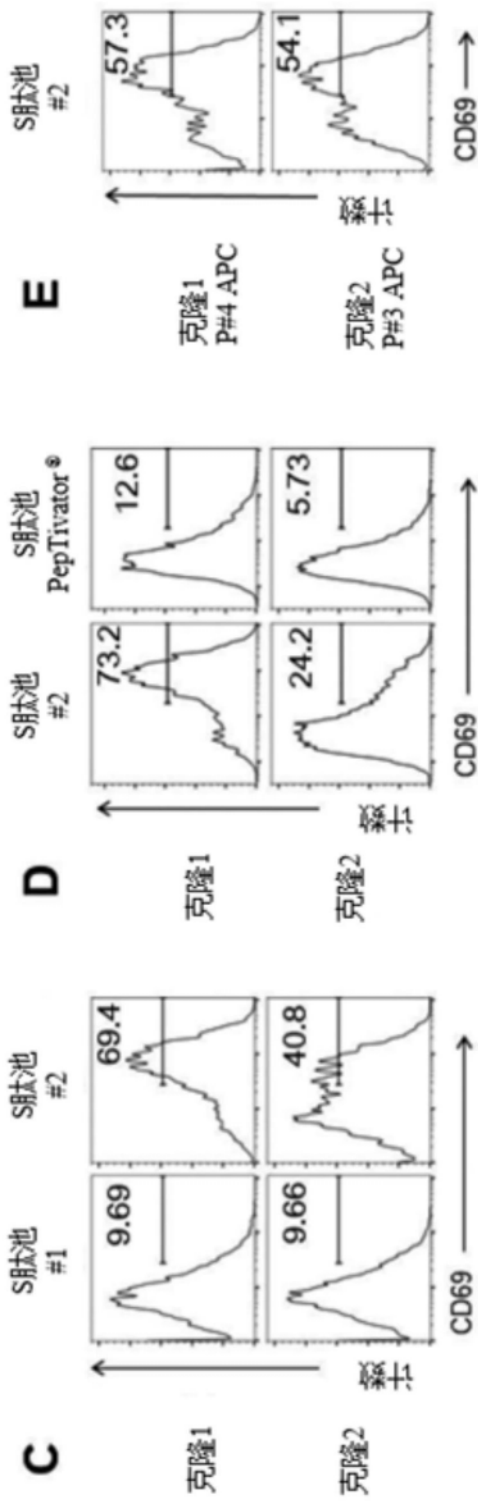


图3-2



图4

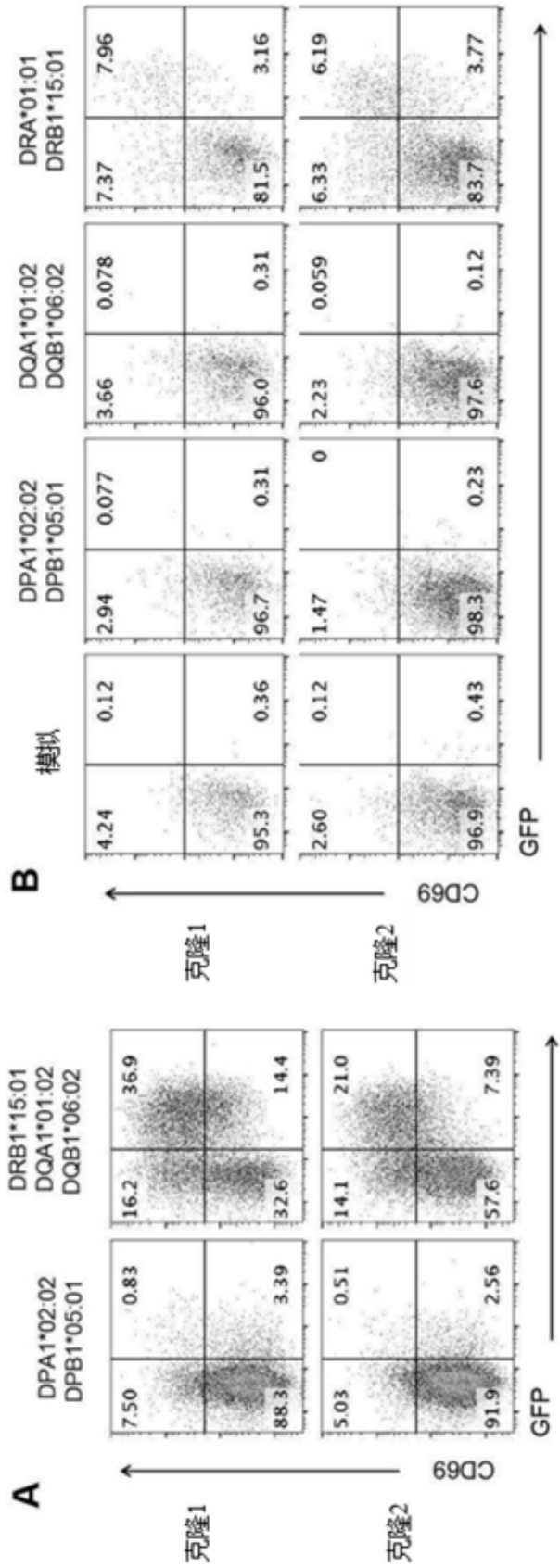


图5-1

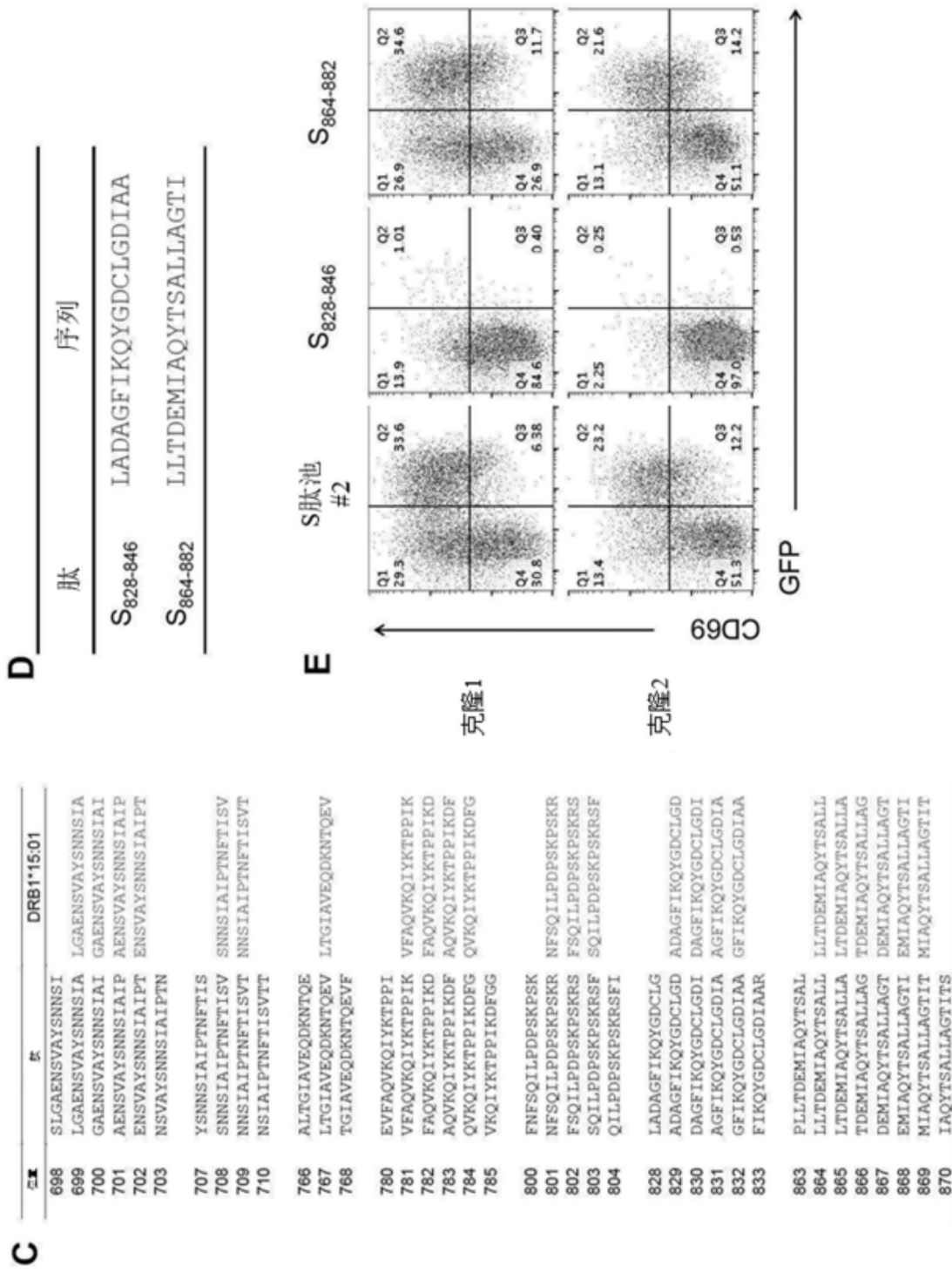


图5-2

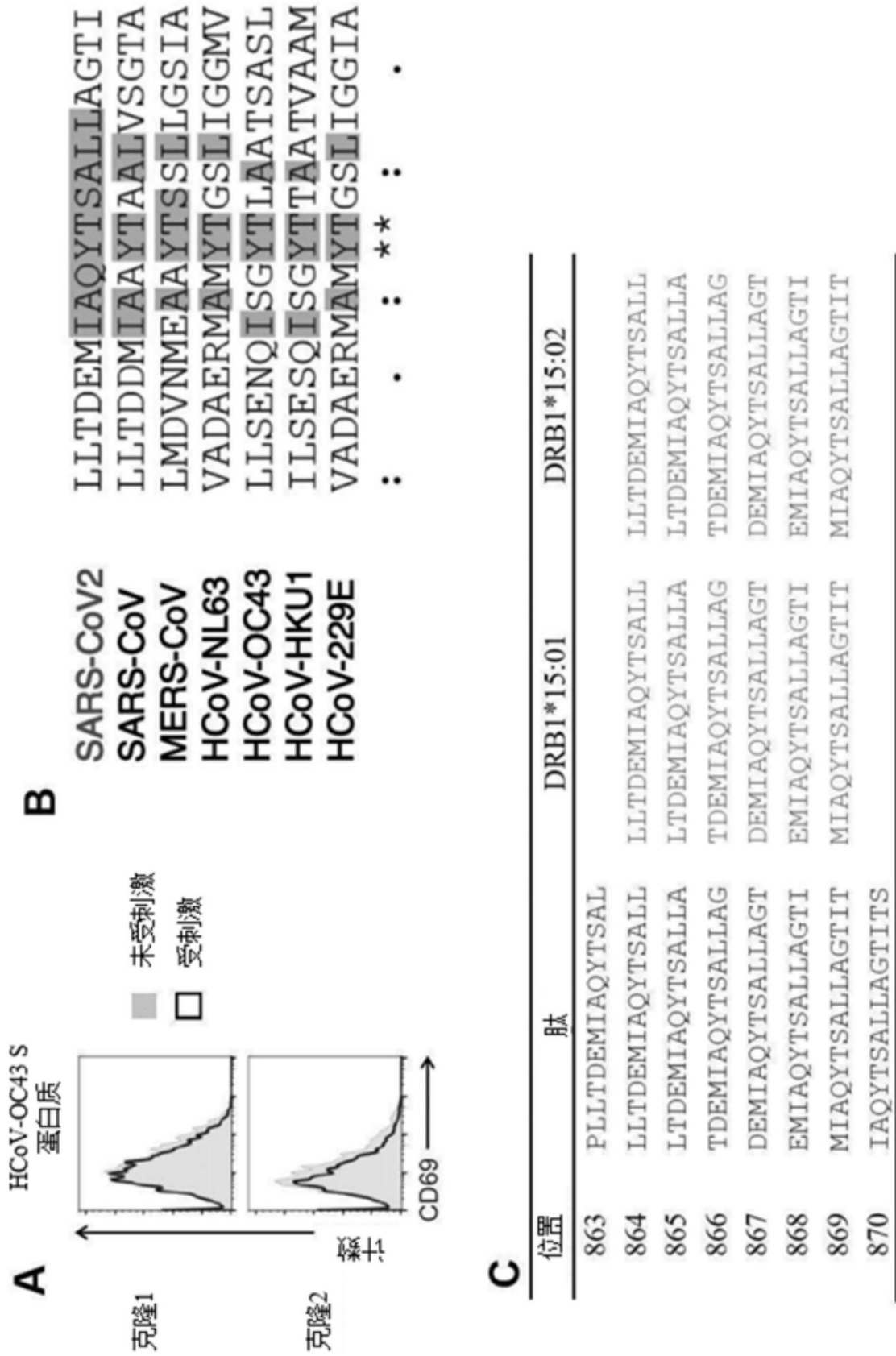


图6-1

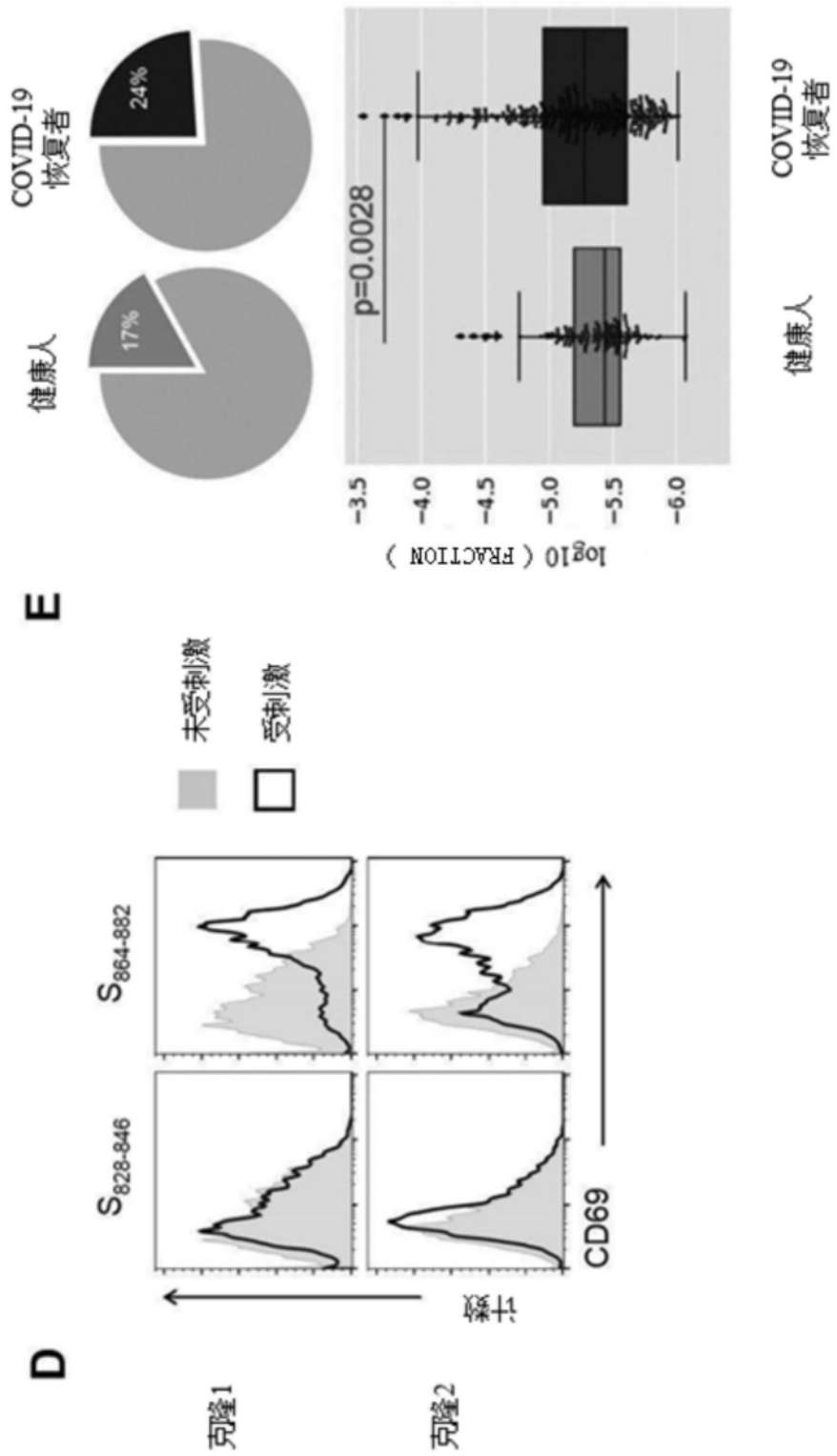


图6-2

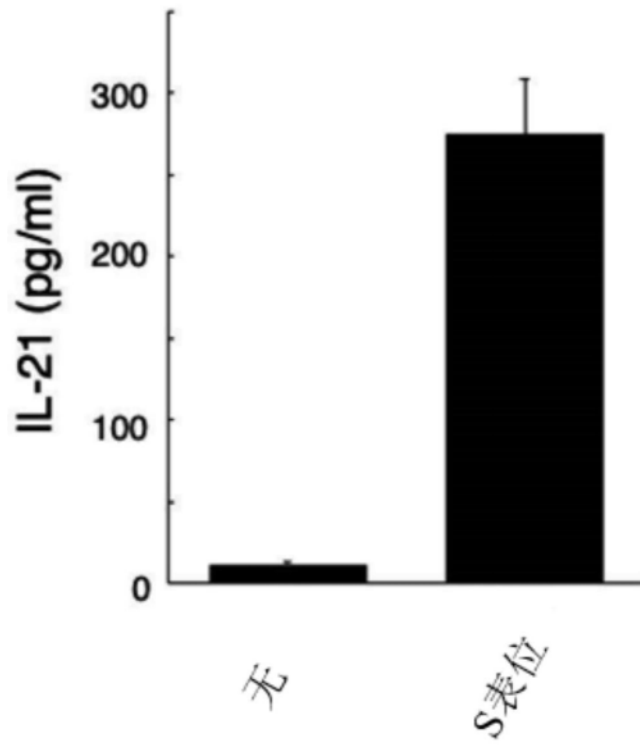


图7

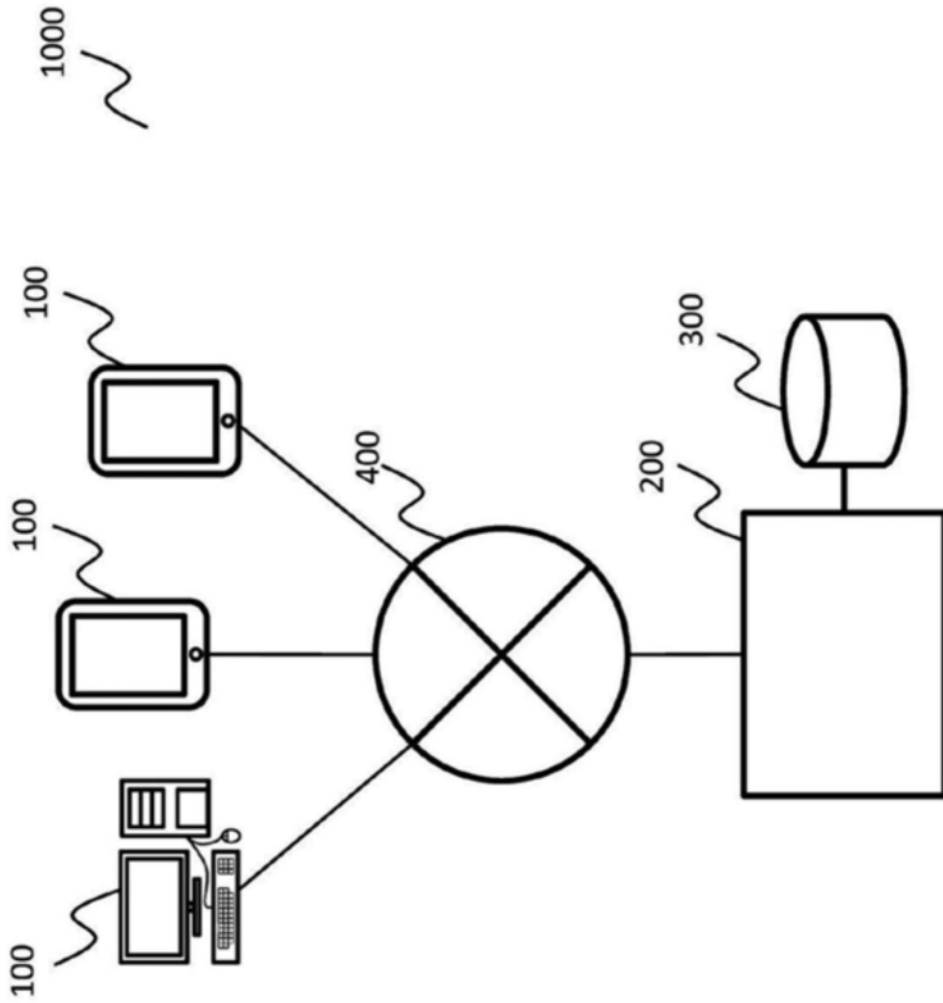


图8

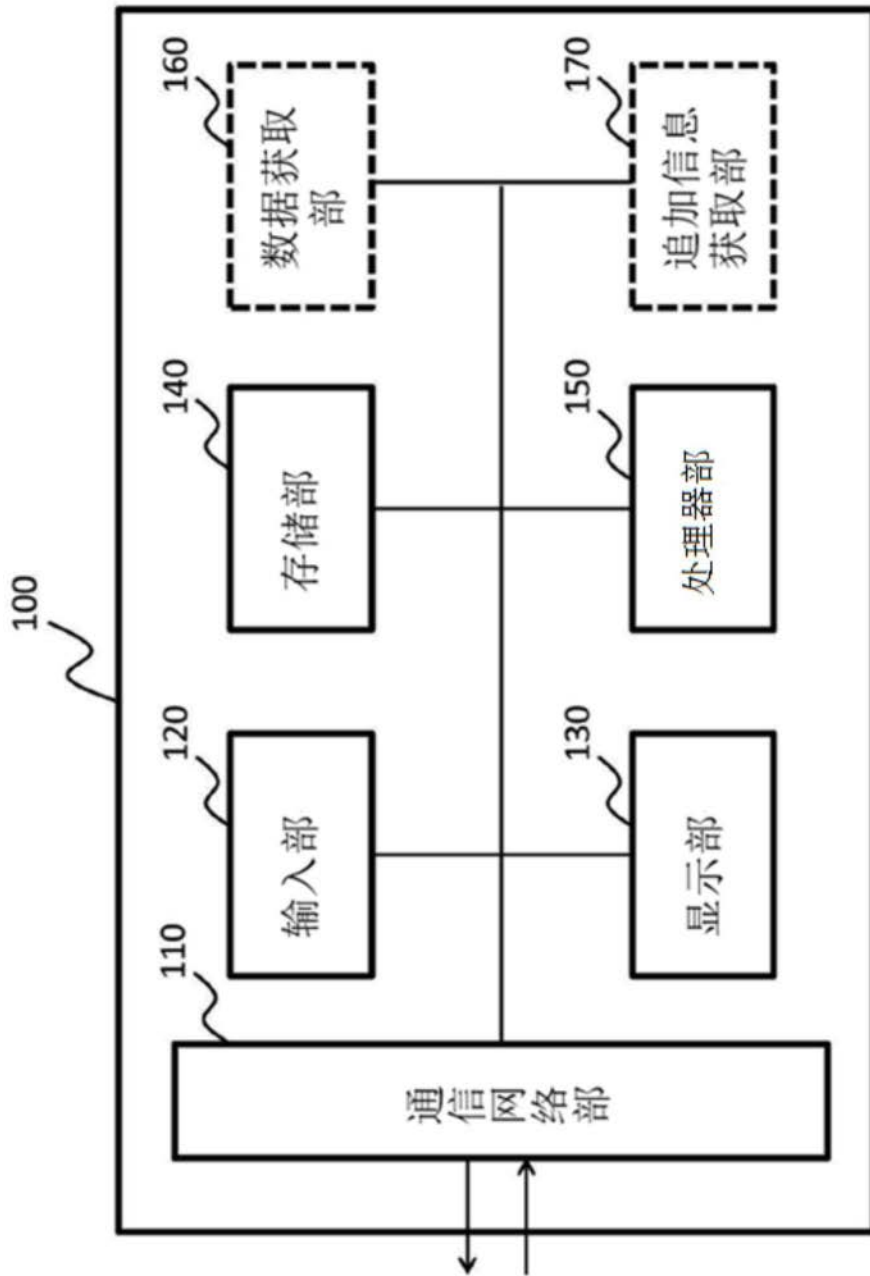


图9

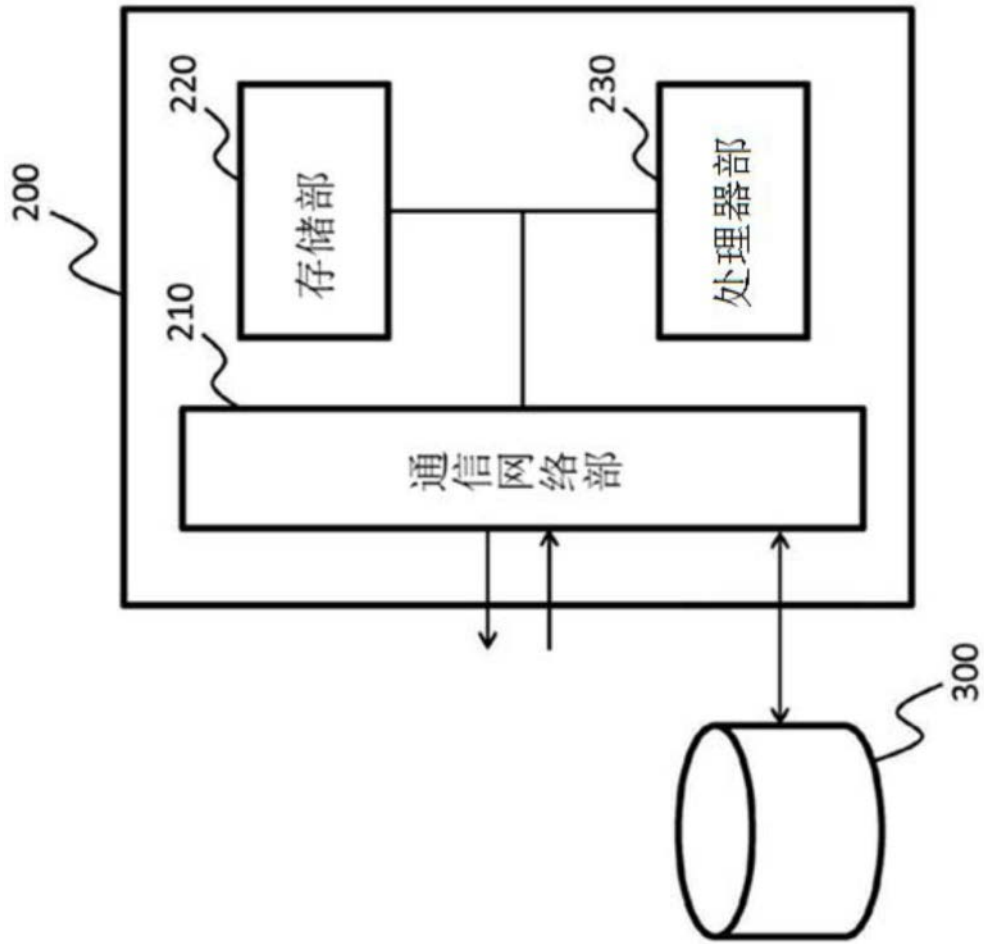


图10