

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6431484号  
(P6431484)

(45) 発行日 平成30年11月28日(2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日(2018.11.9)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 Q 1/02 (2006.01)** C 1 2 Q 1/02  
**G O 1 N 33/68 (2006.01)** G O 1 N 33/68

請求項の数 20 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2015-549901 (P2015-549901)	(73) 特許権者	509260112
(86) (22) 出願日	平成25年12月20日(2013.12.20)		セルステイス リミテッド
(65) 公表番号	特表2016-504036 (P2016-504036A)		オーストラリア 3 1 4 8 ヴィクトリア
(43) 公表日	平成28年2月12日(2016.2.12)		チャドストーン ダンデノンダ ロード
(86) 国際出願番号	PCT/AU2013/001509		1 3 4 1
(87) 国際公開番号	W02014/100853	(74) 代理人	100092093
(87) 国際公開日	平成26年7月3日(2014.7.3)		弁理士 辻居 幸一
審査請求日	平成28年12月2日(2016.12.2)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	61/746,965		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成24年12月28日(2012.12.28)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 箱田 篤
(31) 優先権主張番号	13167355.0	(74) 代理人	100093300
(32) 優先日	平成25年5月10日(2013.5.10)		弁理士 浅井 賢治
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100119013
			弁理士 山崎 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞媒介免疫応答アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞媒介免疫応答活性を測定する方法であって、前記方法が、(a) 抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成することができる免疫細胞を含むサンプルを少なくとも1つの抗原及び少なくとも1つの非還元糖と接触させることによってインキュベーション組成物を提供する工程、及び(b) 少なくとも1つの免疫エフェクター分子の存在又はレベルを検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 2】

該非還元糖が、非還元二糖類である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

該インキュベーション組成物中の非還元糖の濃度が少なくとも1.5mg/mLである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

工程(a)で、該サンプルが抗原及び非還元糖を含む組成物と接触される、請求項1から3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

該組成物が、さらに抗凝固剤を含み、該サンプルが全血サンプルである、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

該サンプルが以下の特徴の1つ以上を有する、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法

:

- i) サンプルはヒト対象動物から入手された；
- ii) サンプルは免疫抑制又は免疫不全のヒト対象動物から入手された；
- iii) サンプルは、NK細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ及び単球から成る群から選択される免疫細胞を含む；及び/又は
- iv) サンプルは全血である。

## 【請求項7】

該抗原が以下の特徴の1つ以上を有する、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法：

- i) 1つ以上のペプチドが抗原として用いられ、該1つ以上のペプチドは5から100アミノ酸から選択される長さを有する；
- ii) 抗原は1つ以上の合成ペプチドによって提供される；
- iii) 抗原は少なくとも2セットのペプチドによって提供され、第一のセットは長さが7から14アミノ酸残基の少なくとも1つのペプチドを含み、第二のセットは15アミノ酸残基以上の少なくとも1つのペプチドを含み、ペプチドはタンパク質抗原の全部又は部分を包含する；
- iv) 抗原は、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞によって認識される1つ以上のペプチドによって提供される；及び/又は
- v) 抗原は、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞によって認識される1つ以上のペプチドによって提供され、該1つ以上のペプチドは15アミノ酸未満の長さを有する。

## 【請求項8】

工程(a)で2つ以上の異なる抗原が用いられるか、及び/又は工程(b)で2つ以上の異なるエフェクター分子が検出される、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項9】

該抗原が疾患特異的抗原である、請求項1から8のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項10】

該抗原が以下の特徴の1つ以上を有する、請求項1から9のいずれか1項に記載の方法：

- i) 抗原は、ある疾患又は症状について細胞媒介免疫応答が試験されようとしている当該疾患又は症状に付随しているか又は当該疾患又は症状を表象する；
- ii) 抗原は、ある病態に付随する病原体由来抗原から誘導されて、その結果当該病原体由来抗原と交差反応するか、又は、ある腫瘍に付随する腫瘍関連抗原である；
- iii) 抗原は、病原体特異的抗原であり、該病原体は細菌、ウイルス、寄生生物、酵母又はカビである；
- iv) 抗原は、細菌特異的抗原であり、該細菌は、グラム陽性及びグラム陰性微生物から選択される；
- v) 抗原は、ウイルス特異的抗原であり、該ウイルスは、肝炎ウイルス（例えばB型肝炎ウイルス及びC型肝炎ウイルス）、ヘルペスウイルス、CMVウイルス及びヒト免疫不全ウイルス（HIV）から選択される；及び/又は
- vi) 抗原は、ウイルス由来であるか又は当該ウイルスに特異的であり、7から14アミノ酸残基の長さを有する1つ以上のペプチドによって提供される。

## 【請求項11】

(a) ヒト対象動物から入手した全血サンプルを少なくとも1つのペプチド抗原及び少なくとも1つの非還元二糖類を含む組成物と接触させることによりインキュベーション組成物を提供し、該インキュベーション組成物を少なくとも2時間インキュベートする工程；及び(b) 該抗原による刺激のために放出されるIFN-ガンマの存在又はレベルを測定する工程を含み、検出されるIFN-ガンマの存在又は量が該ヒト対象動物の細胞媒介免疫応答性のレベルの指標である、請求項1から10のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項12】

該非還元糖が、トレハロース、マンニトール、シュクロース及びラフィノースから選択される、請求項1から11のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項13】

10

20

30

40

50

生体外 (ex vivo) で細胞媒介免疫応答を誘発するための組成物であって、

- a) 少なくとも1つの5 ~ 50アミノ酸の長さから選択されるアミノ酸長さを有するペプチド抗原であって、該抗原が疾患特異的抗原である前記抗原；及び  
 b) 少なくとも1つの非還元糖を含む、組成物。

【請求項14】

以下の特徴の1つ以上を有する、請求項13に記載の組成物：

- i) 非還元糖は非還元二糖類である；  
 ii) 非還元糖は該抗原の安定化剤としては用いられない；  
 iii) 非還元糖は、トレハロース、マンニトール、シュクロース及びラフィノースから選択される；  
 iv) 非還元糖はトレハロースである；  
 v) 抗原は、請求項7から10のいずれか1項で規定される特徴の1つ以上を有する；  
 vi) 抗原は1つ以上のペプチドによって提供され、15アミノ酸未満の長さを有する；  
 vii) 組成物はさらにヘパリンである抗凝固剤を含む；及び/又は  
 viii) 組成物は噴霧乾燥組成物である。

10

【請求項15】

請求項13又は14に記載の組成物を含む、サンプル収集容器。

【請求項16】

対象動物で細胞媒介免疫応答活性を測定するキットであって、少なくとも1つの抗原、少なくとも1つの非還元糖、少なくとも1つのサンプル収集容器、及び少なくとも1つの免疫エフェクター分子のための少なくとも1つの検出手段を含む、前記キット。

20

【請求項17】

該サンプル収集容器が請求項15に記載のサンプル収集容器の特徴を有する、請求項16に記載のキット。

【請求項18】

細胞媒介免疫応答活性を測定する免疫学的アッセイにおける非還元糖の使用であって、サンプルと抗原とのインキュベーション中の非還元糖の添加が、前記アッセイで被検抗原に反応する免疫細胞の免疫エフェクター分子の放出を増進する、前記使用。

【請求項19】

病原性因子による感染、自己免疫疾患、癌、炎症症状、有害因子への曝露、治療薬剤への応答、免疫不全及び免疫抑制から成る群から選択される疾患又は症状の有無、レベル又は病期を追跡監視又は決定するために使用される、請求項13又は14に記載の組成物。

30

【請求項20】

病原性因子による感染、自己免疫疾患、癌、炎症症状、有害因子への曝露、治療薬剤への応答、免疫不全及び免疫抑制から成る群から選択される疾患又は症状の有無、レベル又は病期を追跡監視又は決定するために使用される、請求項16又は17に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、概して免疫学系アッセイの分野に関し、細胞媒介免疫応答性を測定する方法を述べる。本開示は、感度が強化されかつ貯蔵安定性が改善された、細胞媒介免疫応答性を測定する方法、組成物及びキットを教示する。

40

【背景技術】

【0002】

免疫学系診断アッセイは医療分野で広い使い方を有する。特に、それらは、多様な症状の検出及び追跡監視の補助として重要なツールである。これらのアッセイタイプの有効性は、部分的には該免疫系中の成分（例えばT-リンパ球）の特異性にある。この特異性にもかかわらず、免疫学系診断法は必ずしも、軽度の感染（持続的な低レベルの感染の存在）の検出、活動性若しくは潜伏性感症を有する対象動物又は免疫不全若しくは何らかの免疫抑制型を示す対象動物での感染の検出に常に十分に鋭敏であるとは限らない。特に、

50

抗原特異的T細胞応答を検出する細胞媒介免疫応答アッセイの所望される性能の特徴には、適切な感度、特異性、信頼性及び再現性が含まれ、さらにまた実施が簡単及び迅速であるべきである。

#### 【0003】

ある免疫学系診断アッセイの完成形は、T細胞又は他の免疫系の細胞の抗原による刺激と抗原刺激に応答して生成される免疫エフェクター分子（例えばIFN-ガンマ又は他のサイトカイン）のその後の検出を伴う。免疫エフェクター分子は、周知の技術（例えば酵素免疫アッセイ、多重ビーズ分析、ELISA、ELISpot及びフローサイトメトリー）を用いて検出される。免疫エフェクター分子の存在又はそのレベルの上昇はまたRNAレベルを基準に決定できる。そのようなアッセイは、例えば疾患特異的免疫応答、特に病原体特異的免疫応答の検出に有用である。対応するアッセイは、商標Quantiferon（登録商標；Cellestis Limited）の下に市場で入手でき、例えば病原体感染の診断又は疾患に対する細胞媒介免疫の追跡監視のために用いることができる。

対応する細胞媒介免疫応答アッセイの他の使い方には、ワクチン又は免疫療法（例えば癌免疫療法）に対する細胞免疫応答の分析又は追跡監視が含まれる。

#### 【0004】

感度が強化された対応するアッセイに対する強い要望が存在する。以前に、細胞媒介免疫応答を測定する方法は、サンプル（例えば全血サンプル）を抗原とともに単純糖（例えばデキストロース）の存在下でインキュベートすることによって改善された（例えばWO2004/042396を参照されたい）。単純糖（例えばデキストロース及びグルコース）は免疫細胞によるIFN-ガンマの生成を増進し、それによって該アッセイの感度を改善することが見出された。単純糖（例えばグルコース及びデキストロース）の使用は、細胞に当該エネルギー源を利用させるために必須であり、したがって抗原とのインキュベーション中に当該糖を添加することは有益であると考えられた。抗原に加えて単純糖がサンプルに直接添加されたとき、IFN- レベルの顕著な上昇が観察された。しかしながら、当該方法の実施を単純化するために、準備不要の試薬組成物を提供し、手動操作工程を回避することが好ましい。したがって、抗原及び単純糖を含む単一組成物を提供することが所望されよう。前記組成物はサンプル収集チューブ中で提供され、それによってサンプルは抗原及び最適濃度の単純糖と直接接触し、したがって操作過誤を回避できる。しかしながら抗原及び単純糖を含む対応するサンプル収集チューブが室温又は上昇温度で保存されるとき、アッセイの活性は時間の経過中に低下することが見出された。このことはある種の抗原に関しても見出された。したがって、これらのキット成分の保存期限は制限され、一定の保存期間後にもっぱら低感度を提供するか、又はアッセイの活性が完全に失われることすらある。したがって、便利のように抗原が1つの組成物中で単純糖と一緒に提供される場合は、対応するキット/アッセイ材料は貯蔵安定性がなく、したがって時間経過中にアッセイ感度が低下するか又は活性が失われることすらあるというリスクに直面する。このことは、単純糖がサンプル収集チューブ中に抗原と一緒に含まれず、抗原とのインキュベーションのためにサンプルに別個に添加されるときには観察されなかった。

本発明の目的は、従来技術における方法の少なくとも1つの欠点を克服することを目的とする。特に、細胞媒介免疫応答性を測定する鋭敏で信頼できる方法と同様に貯蔵安定性を有するキット及びキット成分を提供することが本発明の目的である。

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

本発明者らは、驚くべきことに、サンプルと抗原をインキュベートする間に非還元糖を添加することにより応答レベル（したがって本方法の感度）が、単純糖（例えばデキストロース及びグルコース）をインキュベーション中に添加したときに観察されたのと同様な態様で上昇することを見出した。これは予想に反することであった。なぜならば、感度の増進は、単純糖、したがって単糖類（前記は還元糖の代表である）により達成され得ると以前には考えられていたからである。さらにまた、驚くべきことに、非還元糖及び抗原が単一組成物の形で提供されたとしても、本方法は該アッセイ材料の貯蔵期間の延長中ずっ

10

20

30

40

50

とその増進感度を維持できることが見出された。したがって、本発明者らは、驚くべきことに、単純糖の代わりに非還元糖を使用することによってアッセイ成分の貯蔵安定性が顕著に増進するが、一方で応答レベルもまた上昇し、したがってアッセイ感度が増進し得ることを見出した。理論に拘束されないが、非還元糖は、正の細胞媒介免疫応答の事例では放出される免疫エフェクター分子の量を増加させ、それによってアッセイ感度を改善すると考えられる。明らかに免疫エフェクター分子の生成は強化される。したがって、本明細書に記載する非還元糖の使用はまた、他の方法で可能となる時期よりも早期に免疫細胞刺激を検出することを可能にし得る。細胞媒介免疫応答アッセイの感度を増進させる能力はまた、より感度の低いエフェクター分子検出手段の使用及び/又はより小さなサンプルサイズの使用を可能にし得る。さらにまた、これらの有益な作用はまたアッセイ材料の貯蔵を延長させた後も達成され、したがって本アッセイの信頼性及び再現性が改善される。

10

#### 【0006】

第一の特徴にしたがえば、細胞媒介免疫応答活性を測定する方法が提供され、前記方法は以下の工程を含む：

- (a) 抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成することができる免疫細胞を含むサンプルを少なくとも1つの抗原及び少なくとも1つの非還元糖と接触させることによってインキュベーション組成物を提供する工程、及び
- (b) 免疫エフェクター分子の存在又はそのレベルを検出する工程。

前記方法は、例えば対象動物（例えば患者）で細胞媒介免疫応答活性を測定するために用いることができる。検出された免疫エフェクター分子の有無又はレベルは、対象動物のレベル又は被検抗原に対して細胞媒介免疫応答を上昇させる許容能力の指標である。

20

第二の特徴にしたがえば、細胞媒介免疫応答を誘発する組成物が提供され、前記組成物は以下を含む：

- a) 少なくとも1つの抗原、
- b) 少なくとも1つの非還元糖、及び
- c) 場合によって少なくとも1つの抗凝固剤。

対応する組成物は、便利には本発明の第一の方法で用いられ、免疫細胞を含むサンプルを前記組成物と接触させることによってインキュベーション組成物を調製することができる。

#### 【0007】

第三の特徴にしたがえば、本発明の第二の特徴の組成物を含むサンプル収集容器が提供される。前記サンプル収集容器は、便利には本発明の第一の特徴の方法で用いることができる。好ましくは、該サンプル収集容器は真空血液収集チューブである。

30

第四の特徴にしたがえば、対象動物で細胞媒介免疫応答活性を測定するキットが提供され、前記キットは、少なくとも1つの抗原、少なくとも1つの非還元糖、好ましくは血液収集チューブである少なくとも1つのサンプル収集容器、及び少なくとも1つの免疫エフェクター分子のための少なくとも1つの検出手段を含む。対応するキットは、本発明の第一の特徴の方法を実施するために用いることができる。

第五の特徴にしたがえば、本発明は、細胞媒介免疫応答活性を測定する免疫学的アッセイでの非還元糖の使用に関し、ここで、該非還元糖の添加は、前記アッセイの被検抗原に反応する免疫細胞から少なくとも1つの免疫エフェクター分子（好ましくはIFN-ガンマ）の放出を増加させる。

40

本出願の他の目的、特色、利点及び特徴は、以下の説明及び添付の請求の範囲から当業者には明白となろう。しかしながら、以下の説明、添付の特許請求の範囲及び具体的な実施例は、本出願の好ましい実施態様を示すが、単に例示手段として提供されることは理解されるべきである。本開示の趣旨及び範囲内の多様な変更及び改変が以下を読み取ることにより当業者には容易に明らかになるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0008】

【図1】QFN-CMVアッセイにおけるIFN-ガンマ応答に対するトレハロース添加の効果（\*\*

50

p < 0.01 ; \*\*\* p < 0.001 )

【図2】QFN-TBアッセイにおけるIFN-ガンマ応答に対するトレハロース添加の効果

【図3】4つの異なる還元糖は定量的QFN-CMVの結果を増大させる

【発明を実施するための形態】

【0009】

本出願を通して、文脈が特段に要求しない場合には、“comprise”という語又はその変形（例えば“comprises”又は“comprising”）は、記述されている成分又は整数又は方法の工程、又は成分若しくは整数若しくは方法の工程の集合物を含むだけでなく、他の任意の成分又は整数又は方法の工程、又は成分若しくは整数若しくは方法の工程の集合物を排除しないことを含蓄していることは理解されるであろう。

10

本明細書で用いられるように、単数形“a”、“an”及び“the”は、文脈が明瞭にそうでないことを示していない場合には複数の局面を含む。したがって、例えば“a T-cell”と言えば、ただ1つのT細胞と同様に2つ以上のT細胞を含み、“an antigen”と言えば、ただ1つの抗原と同様に2つ以上の抗原を含む。同様に、a “agent（因子）”、“reagent（試薬）”、“molecule（分子）”及び“compound（化合物）”と言えば、単一の実体及び2つ以上のそのような実体の集合物を含む。“the disclosure（開示）”と言えば、本開示によって教示されるただ1つ又は多数の局面を含む、等である。本明細書で教示される局面は“発明”という用語によって包含される。本発明の全ての局面が特許請求の範囲の請求項の範囲の中で可能になる。

【0010】

20

第一の特徴にしたがえば、細胞媒介免疫応答活性を測定する方法が提供され、前記方法は、(a) 抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成することができる免疫細胞を含むサンプルを少なくとも1つの抗原及び少なくとも1つの非還元糖と接触させることによってインキュベーション組成物を提供する工程、及び(b) 免疫エフェクター分子の存在又はレベルを検出する工程を含む。

前記方法の有利な実施態様及び使い方は本明細書に記載されている。第一の特徴のある実施態様にしたがえば、対象動物で細胞媒介免疫応答活性を測定する方法が提供され、前記方法は、(a) 抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成することができる免疫細胞を含むサンプルを少なくとも1つの抗原及び少なくとも1つの非還元糖と接触させることによってインキュベーション組成物を提供する工程、及び(b) 免疫エフェクター分子の存在又はレベルの上昇を検出する工程を含む。

30

【0011】

免疫エフェクター分子の有無又はレベルの上昇は、該対象動物の細胞媒介免疫応答性のレベル又は許容能力の指標である。特に、前記方法は、前記対象動物が当該抗原又は当該被検抗原が表象する抗原に以前に遭遇したことがあるか否かを決定することを可能にする。それによって、該対象動物が前記抗原に対して細胞媒介免疫応答を誘引することができるか否かを決定することができる。ある種の実施態様では、細胞媒介免疫応答性の定量的レベルもまた決定できる。本開示のアッセイで検出される細胞媒介免疫応答の規模は、ある種の実施態様ではある疾患の症状、進行及び/又は重篤度に相関させることができる。したがって、本開示は対象動物で細胞媒介免疫応答性を決定する手段を提供する。記載の方法は、とりわけ疾患（特に感染症）、病態の診断を可能にするか及び/又は促進し、免疫能のレベルの決定を可能にし、さらにタンパク質性有害物質と同様に内因性又は外因性因子に対する免疫細胞応答性の評価を可能にする。該アッセイはまた、特定の抗原（例えばある疾患に付随する抗原）、感染又は汚染物質に以前に曝露された対象動物のスクリーニング又は追跡監視を可能にする。他の重要な使い方及び前記方法の有用性は引き続き記載されるであろう。

40

【0012】

本発明の第一の特徴の方法における個々の工程及び好ましい実施態様をこれから詳細に説明する。

<工程(a)>

50

工程(a)では、抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成できる免疫細胞を含むサンプルが、少なくとも1つの抗原及び少なくとも1つの非還元糖と接触される。免疫細胞及び/又は全サンプルは、例えばその細胞媒介免疫応答性を決定しようとする対象動物から入手し得る。

“対象動物”と言えば、例えばヒト又は非ヒト種(霊長類、家畜動物(例えばヒツジ、乳牛、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ)、実験動物(例えばマウス、ウサギ、モルモット、ハムスター)、愛玩動物(例えばイヌ、ネコ)、鳥類種(例えば家禽類、飼鳥園の飼育鳥)、爬虫類動物及び両生類動物を含む)を含む。本明細書に開示する方法は、研究、人間の医療における適用性を有するとともに、家畜、獣医及び野生生物にも同様に適用される。好ましくは、対象動物はヒトであり、本明細書に記載する細胞媒介免疫応答に関する方法は、病原性微生物、ウイルス及び寄生動物に対する応答性、症状、進展の可能性のスクリーニングのため、又は自己免疫症状の追跡監視、腫瘍学的チャレンジ又は免疫療法に対する対象動物の追跡監視、疾患に対する細胞媒介免疫の追跡監視、及び何らかの免疫不全若しくは免疫抑制の存在を決定するために用いられる。後者は、例えばある種の医薬(多様な化学療法剤を含む)のために生じ得る。また別に、環境中のタンパク質性有害物質及び汚染物質への曝露は本発明の方法を用いて決定できる。

#### 【0013】

サンプルは、適切な抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成できる免疫細胞を含む。“免疫細胞”には以下が含まれる(ただしこれらに限定されない):リンパ球(ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、B細胞、マクロファージ及び単球を含む)、樹状細胞、又は直接的若しくは間接的な抗原刺激に反応して1つ以上の免疫エフェクター分子を生成できる任意の他の免疫細胞。好ましくは、サンプルはリンパ球を含み、より好ましくはTリンパ球を含む。“T細胞”及び“Tリンパ球”という用語は本明細書では互換的に用いられる。T細胞は、提供された抗原を認識すると強い免疫応答を誘引することができる。T細胞が以前に被検抗原又は被検抗原が表象する抗原に曝露されたことがあれば、当該抗原に関する固有の記憶によりT細胞の迅速な再刺激が生じる。これら抗原特異的T細胞は、免疫エフェクター分子(例えば特にインターフェロンガンマ)を分泌することによって応答する。放出されたインターフェロンガンマに反応して放出されるインターフェロンガンマ(又は免疫エフェクター分子)は、被検抗原に対する免疫応答性の特異的マーカーとして測定できる。したがって、ある実施態様にしたがえば、サンプルは、Tリンパ球(好ましくはCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞)を含む。好ましくは、サンプルはまた対応する刺激細胞(特に抗原提示細胞)を含む(抗原提示細胞はT細胞に対して被検抗原を提示することができる)。しかしながら、適切な抗原提示細胞はまたインキュベーション組成物に別個に添加してもよい。特に言えば、添加される抗原提示細胞(APC)には天然抗原或いは人工抗原提示細胞又は粒子が含まれる。例えば刺激細胞(例えば照射した自己又はHLA適合性抗原提示細胞)は、場合によって別個にインキュベーション組成物に添加でき、それら細胞は続いて抗原をT細胞に提示する。この実施態様は、例えばサンプルがT細胞応答を誘発するために必要な対応する刺激細胞を含まない場合にふさわしい。人工抗原提示物には、組換えMHC分子又はペプチド及び組換え共刺激分子を結合させた粒子又は脂質小胞が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

#### 【0014】

好ましくは、サンプルは対象動物から入手される。ある実施態様にしたがえば、サンプルは免疫細胞を含む体液であるか、又は対応する体液から誘導した部分を含む免疫細胞である。好ましい実施態様にしたがえば、サンプルは全血である。“全血”とは、実質的に希釈されていないか又は分画されていない対象動物由来血液を意味する。ある実施態様にしたがえば、全血サンプルは末梢血である。細胞媒介免疫応答活性の決定に全血は好ましくかつ最も便利なサンプルではあるが、免疫細胞を含む他のサンプルもまた用いることができる。例にはリンパ液、脳液、組織液(例えば骨髓液又は胸線液)及び気道液(鼻及び肺の液並びに気管支肺洗浄液を含む)が含まれる(ただしこれらに限定されない)。上述のサンプルの部分又は誘導物(例えば細胞媒介免疫応答を測定するためには必要でない

10

20

30

40

50

細胞を枯渇させたサンプル)もまたサンプルとして用いることができ、サンプルを加工処理することによって入手できる。例えば、全血は当業界で公知の方法によって処理してCM I応答に不要な成分(例えば赤血球及び/又は血小板)を除去することができ、或いは加工処理して白血球を濃縮できる。パuffyコート細胞又は末梢血単核球(PBMC)もまた当業界で公知の方法によって入手でき、サンプルとして用いることができる。ある実施態様にしたがえば、培養した免疫細胞をサンプルとして用いることができる。さらにまた、凍結保存細胞(例えば凍結保存PBMC細胞)もまた対象動物の免疫細胞供給源としてしたがってサンプルとして用いることができる。例えば融解PBMC細胞を培養液と接触させて免疫細胞を含むサンプルを提供でき、前記を抗原及び非還元糖(前記は好ましくは単一組成物の形態で添加される)と接触させインキュベートすることができる。ある実施態様にしたがえば、サンプルは細胞性免疫応答の媒介に必要な全ての免疫細胞を含む。しかしながら上記に記載したように、刺激細胞(特に抗原提示細胞)を別個に添加するのもまた本発明の範囲内である。ある実施態様にしたがえば、サンプルは、少なくともT細胞(Tリンパ球)及びNK細胞(NKリンパ球)を含む。ある実施態様にしたがえば、サンプルを抗原及び/又は非還元糖と接触させる前に、サンプルは50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%又は3%を超えて希釈されない。

10

分析しようとするサンプルを少なくとも1つの抗原及び少なくとも1つの非還元糖と接触させてインキュベーション組成物を提供する。

#### 【0015】

本明細書で用いられる“抗原”という用語は特に、免疫応答を刺激又は再刺激できる、特に細胞性免疫応答を刺激又は再刺激できる任意の分子又は因子を指す。したがって、“抗原”という用語は広い意味で用いられる。前記用語は特に、主要組織適合性複合体(MHC)と結合してT細胞受容体に提示され得るか、又は抗体と結合し得る任意の分子又は因子を指す。前記用語はまた、非古典的MHCタンパク質(例えばCD1d又は他のCD1ファミリーメンバー)と結合することができる任意の分子又は因子を指すことができる。ある実施態様にしたがえば、抗原は免疫原である。ある実施態様にしたがえば、抗原は免疫原ではない。抗原にはペプチド、タンパク質、ハプテン、アレルゲン若しくはトキシン、又は任意の天然に存在するか若しくは合成分子又は前記の部分が含まれるが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様にしたがえば、抗原は不活性な病原体又は前記の部分若しくは溶解物である。ある実施態様にしたがえば、抗原は、ペプチド、タンパク質(糖タンパク質を含む)、炭水化物、リン脂質、リントタンパク質、リン脂質タンパク質、及び前述のフラグメントから成る群から選択される。本明細書で用いられる“ペプチド”という用語はまた、文脈が明確にそうでないことを示さないかぎりポリペプチド及びタンパク質を含む。“タンパク質”という用語はまた改変された形態(例えば糖タンパク質及びリントタンパク質)を含む。ある実施態様にしたがえば、抗原は1つ以上の完全長又は部分長のペプチドを含む。ある実施態様にしたがえば、抗原はペプチドによって提供される。ある実施態様にしたがえば、抗原として用いられる1つ以上のペプチドは5から100アミノ酸、好ましくは7から50アミノ酸から選択される長さを有する。ある実施態様にしたがえば、抗原は、1つ以上の別個の完全長又は部分長のペプチドに由来するペプチドのセットによって提供される。ペプチドセットは少なくとも2つのペプチドを含み、ある実施態様では一連のオーバーラップする又はオーバーラップしないペプチドを含む。対応するペプチドセットは、天然に存在するタンパク質抗原の完全な長さ又は一部分をカバーすることができる。しかしながら、ペプチドは必ずしもオーバーラップする必要はなく、或いは1アミノ酸だけ若しくは多数のアミノ酸がオーバーラップしていてもよい。ある実施態様にしたがえば、天然に存在するペプチド又はタンパク質抗原の80-100%を包含するペプチドセットが用いられる。

20

30

40

#### 【0016】

ある実施態様にしたがえば、抗原は、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞によって認識される少なくとも1つのペプチドによって提供される。この実施態様の場合、好ましくは抗原は、15アミノ酸未満、好ましくは13アミノ酸以下、12アミノ酸以下、11アミノ酸以下又は10アミノ

50

酸以下の長さを有する少なくとも1つのペプチドによって提供される。CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞によって認識される対応するペプチドのための適切なサイズ範囲は、7 - 14アミノ酸残基、7 - 13アミノ酸残基、8 - 12アミノ酸残基、8 - 11アミノ酸残基及び8 - 10アミノ酸残基を含む。CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞によって認識されるペプチドを含むか、又は前記から成るペプチドセットもまた用いることができる。前記ペプチドは、タンパク質抗原（例えば天然に存在するタンパク質抗原）の全部又は部分を包含することができる。対応する短いペプチドを抗原として取り入れるアッセイは、単糖（例えばグルコース又はデキストロス）の存在下で保存中にアッセイ活性の顕著な低下を示すことが見出された。これは、本発明で教示するように非還元糖を用いたときには観察されなかった。アッセイの感度は、非還元糖を取り入れたためにアッセイ成分の貯蔵期間を延長させた後でさえ増進したまま

10

## 【0017】

ある実施態様にしたがえば、抗原は少なくとも2つのペプチドセットによって提供され、第一のセットは長さが約7から14アミノ酸残基の少なくとも1つのペプチドを含み、第二のセットは15アミノ酸残基以上の少なくとも1つのペプチドセットを含み、それらペプチドはタンパク質抗原の全部又は部分を包含する。対応するセットの各々は、少なくとも1つのペプチドから一連のオーバーラップ又は非オーバーラップペプチドを含む。試験される疾患又は症状を表象するタンパク質抗原から誘導される又は前記タンパク質抗原と一致する7から14アミノ酸のペプチド及び15アミノ酸以上のペプチドとサンプルに含まれる免疫細胞との共同インキュベーションはより高い感度をもたらし、それによって、そうでない場合に可能であり得る時期よりも早期の免疫細胞及び特にリンパ球の刺激検出を可能にする。細胞媒介免疫応答アッセイの感度を増進させる能力は有利には検出限界を低下させ、及び/又はエフェクター分子のより感度の低い検出手段の使用を可能にする。したがって、対応するペプチドの少なくとも2セットを非還元糖と一緒に使用することは有益である。理論又は作用態様に拘束されないが、2セットのペプチド（7から14マーのペプチド及び15マー以上のペプチド）は、CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>T細胞の両方による検出を可能にする。CD4<sup>+</sup>T細胞は15マーより大きいペプチドを認識し、CD8<sup>+</sup>T細胞は7から14マーのペプチドを認識する。これらのペプチドは本明細書では、“CD4<sup>+</sup>ペプチド”（15マー以上のペプチド）又は“CD8<sup>+</sup>ペプチド”（7から14マーのペプチド）と称することができる。各セットは少なくとも1つのペプチドを含み、ある実施態様では一連のオーバーラップペプチドを含む。したがって、第一のセットは、長さが7から14アミノ酸残基の一連のオーバーラップペプチドを含むことができる。これらのペプチドはCD8<sup>+</sup>T細胞によって認識される（CD8<sup>+</sup>ペプチド）。第二のセットは、長さが15アミノ酸残基を超える一連のオーバーラップペプチドを含むことができる。これらのペプチドは細胞傷害性CD4<sup>+</sup>T細胞によって認識される（CD4<sup>+</sup>ペプチド）。両ペプチドセットは、タンパク質抗原（例えば試験される疾患又は症状を表象する天然に存在するタンパク質抗原）の完全な長さ又は部分をカバーすることができる。該ペプチドは必ずしもオーバーラップされる必要はないが、1アミノ酸だけ又は多数のアミノ酸がオーバーラップしていてもよい。該ペプチドはペプチドポッドを含み、前記はタンパク質抗原の80 - 100%を包含する（したがってカバーする）。“80 - 100%”は、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%を意味する。ある実施態様でタンパク質抗原の全部又は部分を包含する長さが約7から14アミノ酸残基の一連のオーバーラップペプチドと言え、長さが約7アミノ酸残基から最大14アミノ酸残基で、全長がタンパク質抗原のそのN-末端からC-末端まで又は前記の部分のごとくいずれかのアミノ酸残基から6アミノ酸残基にまで広がるペプチドを意味する。したがって、あるペプチドの長さがxアミノ酸残基（xは約7から14である）の長さである場合は、2つの連続するペプチド間のオーバーラップの範囲はx - 1からx - 6である。ある実施態様では、各連続ペプチドのオーバーラップはx - 1である。長さが15アミノ酸残基以上の一連のオーバーラップペプチドはまたタンパク質抗原の全部又は部分に広がり、各ペプチドは長さが少なくとも15アミノ酸残基又は完全なタンパク質抗原の長さで

20

30

40

50

ある。ある実施態様では、長さが15アミノ酸残基以上のペプチドは15から50アミノ酸、例えば15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49又は50アミノ酸残基である。

#### 【0018】

本開示は、一連のペプチド又はペプチドセットの各ペプチドが同じ長さである（すなわち  $x$  である）事例を含む。しかしながら、一連のペプチド又はペプチドセットは  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_j$ 、 $\dots$ 、 $x_i$  ペプチドの混合物を含むことができ、ここで、ある実施態様にしたがえば  $x_i$  ペプチドの各々は長さが約7から14アミノ酸残基であるか、又は長さが15アミノ酸残基以上である。CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>ペプチドは別個のペプチドプールに分けることができる。それらは別個にサンプルに添加されても又は1つの組成物に、好ましくは非還元糖と一緒に含まれてもよい。この組成物を続いてサンプルと接触させてインキュベーション組成物を調製することができる。

10

#### 【0019】

いくつかの実施態様では、*in vivo*で免疫系に提示される抗原の作用を模倣する1つ以上の抗原が用いられる。ある実施態様にしたがえば、抗原は、自己抗原、病原性生物由来抗原から誘導されるか又は前記と交差反応する抗原、免疫応答を刺激する金属又は無機物質、及び腫瘍関連抗原から選択される。ある実施態様にしたがえば、抗原は、ある症状に付随する病原体から誘導されしたがって前記と交差反応するか、又は癌に付随する腫瘍関連抗原であるか、又は毒物であるか若しくは毒物から誘導される。ある実施態様にしたがえば、サンプルは、疾患又は症状について細胞媒介免疫を試験しようとしている当該疾患又は症状について特異的である抗原、例えば判定しようとしている疾患又は症状に付随しているか又は前記を表象する抗原と接触される。ある実施態様にしたがえば、抗原は疾患特異的抗原、特に病原体特異的抗原である。いくつかの実施態様では、病原体は細菌、ウイルス、寄生物又はカビである。ある例示的な実施態様では、抗原はマイコバクテリウム（特にヒト型結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*））由来抗原である。したがって、いくつかの実施態様では、抗原は結核症（TB）特異的抗原である。例えば、抗原はヒト型結核菌又はトリ型結核菌（*M. avium*）の精製タンパク質誘導体であり得る。いくつかの実施態様では、抗原はマイコバクテリアタンパク質、例えばESAT-6、CFP-10及びTB7、特に言えばTB7.7を刺激する。別の例示的な実施態様では、抗原はウイルス（例えばサイトメガロウイルス（CMV））由来であるか、前記に特異的である。

20

30

抗原、特に疾患特異的抗原のさらに別の例もまた引き続いて記載される。

#### 【0020】

さらにまた、工程a)でサンプルは非還元糖と接触される。特に“非還元糖”は、還元糖の検出試薬（例えばフェーリング液、ベネジクト試薬又はトレンス試薬）と反応しない糖を指す。非還元糖は遊離還元末端を含まず、したがって遊離アルデヒド又は遊離ケトン基を含まない。非還元糖は任意の長さを有することができ、直鎖でも分枝鎖でもよい。ある種の実施態様では、非還元糖は少なくとも2つの単糖類ユニットを含む。ある実施態様にしたがえば、非還元糖の単糖類ユニットのいずれか及び全てで、環構造の酸素原子の近傍の炭素原子はヒドロキシル基を含まず、したがってアノマーヒドロキシル基を含まない。ある実施態様にしたがえば、非還元オリゴ糖の単糖類ユニットの環構造はヘミアセタール又はヘミケタール基を含まない。ある実施態様にしたがえば、非還元糖は、10以下の単糖類ユニット、より好ましくは8以下の単糖類ユニット、6以下の単糖類ユニット、5以下の単糖類ユニット、4以下の単糖類ユニット、3以下の単糖類ユニット、又は2以下の単糖類ユニットを含むオリゴ糖である。好ましくは、非還元糖は二糖類である。ある実施態様にしたがえば、グリコシド結合は、1つの単糖類ユニットの還元末端を別の単糖類ユニットの還元末端に結びつけることによって単糖類ユニット間で形成される。非還元糖の好ましい例はシュクロース及びトレハロースである。さらにまた、実施例によって示されるように、マンニトール及びラフィノースもまた非還元糖として用いることができる。したがってある実施態様にしたがえば、非還元糖はトレハロース、マンニトール、シュクロース

40

50

及びラフィノースから選択される。実施例で示されるように、これらの例示的非還元糖は該応答の規模を増加させる。トレハロースが特に好ましい。なぜならば、実験は、トレハロースは応答の規模を増加させ、したがってアッセイの感度を増進させることを示し、さらにまたトレハロース及び抗原を含む組成物は優れた貯蔵安定性を示すからである。実施例によって示されるように、試験した非還元糖の中で応答増進効果はトレハロースがもっとも強かった。しかしながら、非還元糖はまた単糖類でもよく、ここで、還元末端は別の化学的実体と共役され、したがって前記実体によって封鎖される。したがって、非還元糖は誘導体を形成できる。糖誘導体の例はアミノ糖であり、前記では1つ以上のヒドロキシル基がアミノ基又はアセチルアミノ基によって置換される。好ましい実施態様では、非還元糖は置換されず、特に誘導体は形成されない。ある実施態様にしたがえば、非還元糖は多糖類ではない。ある種の実施態様では、非還元糖はタンパク質、ペプチド若しくは脂質又は他の巨大分子と結合しない。ある実施態様にしたがえば、非還元糖は細胞培養液又は他の媒体に含まれない。ある実施態様にしたがえば、非還元糖は液体に含まれない。非還元糖はサンプルに含まれる免疫細胞によって代謝される。ある実施態様にしたがえば、非還元糖は、サンプル及び抗原を含むインキュベーション組成物中で適切な濃度で存在するとき、再刺激T細胞によってインターフェロンガンマの放出を増進することができる非還元糖である。

#### 【0021】

サンプルを抗原、非還元糖及び場合によってさらに別の添加物と接触させることによって、インキュベーション組成物が提供される。好ましくは、前記インキュベーション組成物は室温より上（したがって上昇温度）でインキュベートされる。好ましくは、インキュベーション温度は30より上、好ましくは35より上である。インキュベーション温度の適切な範囲は30から40、好ましくは35から40を含む。便利には、インキュベーション組成物は $37 \pm 1$ でインキュベートされる。好ましくは、インキュベーション組成物をそのような上昇温度で少なくとも2時間インキュベートして、免疫細胞の抗原による刺激及び免疫エフェクター分子の生成を可能にする。インキュベーション工程は、2から50時間、例えば2から40時間、5から30時間、8から24時間、16から24時間、又は3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49又は50時間を含む期間であり得る。いくつかの実施態様では、抗原、非還元糖及びサンプルをインキュベーション組成物全体に行きわたらせる随意的初期混合工程の後、更なる混合を行わないでインキュベーションを実施する。

#### 【0022】

インキュベーション組成物で、非還元糖は、免疫系細胞の抗原による刺激（特に言えば再刺激）を強化するために有効な濃度で存在する。したがって、非還元糖は、陽性（すなわち抗原に対して免疫応答性）サンプルでインキュベーション組成物への非還元糖の添加が、非還元糖が添加されない場合と比較して生成される免疫エフェクター分子（好ましくはインターフェロンガンマ）のレベルを増進させる濃度で添加される。したがって、非還元糖は、細胞媒介免疫応答を示すサンプルでより多くの免疫エフェクター分子が生成されるように免疫エフェクター分子応答の規模を強化する濃度で添加される。好ましくは、非還元糖は、免疫エフェクター分子応答を少なくとも1.1倍、好ましくは少なくとも1.2倍、より好ましくは少なくとも1.3倍強化する濃度で用いられる。ある実施態様にしたがえば、非還元糖は、サンプルに含まれる免疫細胞が対応する応答を媒介する能力を延長期間にわたって維持する。ある実施態様にしたがえば、インキュベーション組成物中の非還元糖の濃度は、少なくとも1mg/mL、少なくとも1.5mg/mL、好ましくは少なくとも1.75mg/mL、より好ましくは少なくとも2mg/mLである。例示的な範囲には1mg/mLから20mg/mL、1.5mg/mLから17.5mg/mL、2mg/mLから15mg/mL、3mg/mLから15mg/mL、4mg/mLから12.5mg/mL、及び5mg/mLから10mg/mLが含まれるが、ただしこれらに限定されない。実施例によって示されるように、これらの範囲は例えばトレハロースについて適切である。それらはまた、実施例によって示されるように、他の非還元糖（例えばシュクロース、マンニトール及びラフィ

10

20

30

40

50

ノース)についても適切である。ある実施態様にしたがえば、インキュベーション組成物中の非還元糖の濃度は、1.5mg/mLから10mg/mL、例えば1.75mg/mLから7.5mg/mL、又は2mg/mLから5mg/mLの範囲にある。適切な濃度はまた、本明細書に記載の教示にしたがって当業者によって決定され得る。

#### 【0023】

1つ以上のさらに別の添加物がインキュベーション組成物に添加され得る(したがって前記に含まれ得る)。例えば、サンプルの調製及び/又はサンプルの保存のために必要又は有益である1つ以上の添加物(例えばサンプルが血液の場合は適切な抗凝固剤)を添加できる。好ましくは、抗凝固剤はヘパリンである。添加物は、それらが細胞媒介免疫応答に干渉する可能性がある濃度で含まれるべきではない。ある実施態様にしたがえば、非還元糖以外に還元糖はインキュベーション組成物に添加されない。ある実施態様にしたがえば、非還元糖以外に還元糖(特に還元単糖類)はインキュベーション組成物に添加されない。

10

ある実施態様にしたがえば、サンプルは、抗原及び非還元糖を含む組成物と接触される。この実施態様は、使用者が非還元糖を別個にインキュベーション組成物に添加する必要がないので特に有益である。そのような準備不要組成物を提供することは、操作過誤を回避し適切に手間を省く。場合によって、抗原及び非還元糖を含む組成物に希釈剤又は溶媒が含まれる。さらにまた、1つ以上の添加物が、それらをインキュベーション組成物に加えようとする場合には前記組成物に加えられ得る。該添加物は細胞媒介免疫応答に干渉すべきではない。ある実施態様にしたがえば、組成物はさらにまた抗凝固剤(好ましくはヘパリン)を含む。ある実施態様にしたがえば、組成物は単純糖を含まない。ある実施態様にしたがえば、組成物は還元糖を含まず、特に還元単糖類を含まない。

20

#### 【0024】

インキュベーション組成物を調製するために、抗原、非還元糖、及び場合によって1つ以上のさらに別の添加物(例えば血液サンプルの場合には抗凝固剤)を含む組成物をサンプルと接触させる。サンプルを組成物に添加するか、又はその逆に組成物をサンプルに添加できる。インキュベーション組成物を調製するために、サンプル、抗原、非還元糖、及び(もし存在する場合は)さらに別の添加物が好ましくは混合される。

適切な組成物の形態の例には、液状組成物、半液状組成物、ゲル様組成物、及び固体状組成物(特に乾燥組成物)が含まれる。ある実施態様にしたがえば、抗原、非還元糖、及び場合によってさらに別の添加物を含む組成物は、サンプル収集容器、好ましくはサンプル収集チューブ(例えば血液収集チューブ)に含まれる。これは、収集時にサンプルが直接組成物と接触するので特に便利である。ある実施態様にしたがえば、抗原、非還元糖、及び場合によってさらに別の添加物を含む組成物は、サンプル収集容器の内部に噴霧乾燥される。噴霧乾燥方法は当業界で周知であり、したがってここに詳細に記載することを全く要しない。

30

#### 【0025】

ある実施態様にしたがえば、サンプルは対象動物から入手され、非還元糖及び/又は抗原との接触前に例えば組織培養液、賦形剤又は他の液体因子で希釈されない。ある実施態様にしたがえば、インキュベーション組成物は少なくとも10%の体積のサンプルを含む。

40

“少なくとも10%の体積”という用語は、全インキュベーション組成物の体積の10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99及び100%のサンプル体積を含む。

実施例によって示されるように、工程a)の非還元糖の添加は驚くべきことに免疫エフェクター分子(例えば特にインターフェロンガンマ)の放出を増加させ、それによってアッセイ感度を増進させる。この作用は単純糖(したがって還元単糖類)によってのみ達成され得るとこれまで考えられていたので、前記作用は非常に驚くべきことであった。さら

50

にまた、抗原及び非還元糖を含む組成物は、上昇温度でさえも貯蔵安定性の改善を示すことが見出された。時間の経過でアッセイ感度及び品質は低下することがあるという還元糖に関して観察された作用は非還元糖に関しては観察されない。したがって、本発明は、延長された貯蔵期間にわたってもまたアッセイ性能を維持する鋭敏で貯蔵安定性を有するアッセイを提供することによって、従来技術に対して大きく貢献する。便利には、本発明の教示は、貯蔵安定性を有する組成物の形態で抗原及び非還元糖を提供することを可能にする。本発明では、非還元糖は抗原の安定化剤として用いられない。抗原（特にペプチド抗原）は非常に貯蔵安定性を有することが実験で示された。したがって、抗原が糖の非存在下で保存されてもアッセイ性能の低下は観察されない。したがって、非還元糖は、特に免疫エフェクター分子（特にサイトカイン、例えばインターフェロンガンマ）の生成及び/又は放出を強化することによってアッセイ感度を強化するために用いられる。

10

【0026】

&lt;工程(b)&gt;

工程(b)では、免疫エフェクター分子の存在又はそのレベルの上昇が検出される。上記に記載したように、免疫エフェクター分子の存在（存在しないことも含む）又はそのレベルは、被検抗原に対する対象動物の細胞媒介免疫応答性のレベル又は許容能力の指標である。特に、前記方法は、前記対象動物が、被検抗原又は被検抗原と交差反応性を示す抗原（例えば検出しようとしている病原体）と以前に遭遇したことがあるか否か決定することを可能にする。したがって、対象動物が、前記抗原に対して（特に言えば、被検抗原が表象する抗原、病原体又は疾患）細胞媒介免疫応答を誘引できるか否かを決定できる。

20

免疫エフェクター分子の検出は、ペプチド若しくはタンパク質レベルで、又は核酸レベルで（特に免疫エフェクター分子mRNA発現レベルで）実施し得る。したがって、免疫エフェクター分子の“存在又はレベル”と言えは直接的及び間接的データを含む。例えば、免疫エフェクター分子の存在又は量は、適切な検出方法（例えばELISA又はELISpot）を用いて直接的に決定できる。しかしながら、ある実施態様では、免疫エフェクター分子の存在又はレベルはそのRNA発現レベルに基づいて測定される。高レベルの免疫エフェクター分子mRNAは、免疫エフェクター分子のレベル増進を示す間接的データである。標的遺伝子のmRNA発現レベルを決定する適切な方法は従来技術で周知であり、したがって詳細な記載を全く必要としない。したがっていくつかの実施態様では、免疫エフェクター分子は、リガンド又は結合分子（例えば該エフェクター分子に特異的な抗体）を用いて、又は免疫エフェクター分子をコードする遺伝子の発現レベルを測定することによって検出され得る。

30

【0027】

検出される免疫エフェクター分子は、抗原による細胞の活性化、刺激又は再刺激に反応して生成される分子列のいずれかであり得る。サンプルと被検抗原との接触に際して放出される1つ以上の免疫エフェクター分子又は免疫エフェクター分子のパターンもまた工程(b)で検出できる。測定される免疫エフェクター分子は免疫細胞によって生成され、特にリンパ球（例えばT細胞、特にCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞）によって生成され得る。したがって、いくつかの実施態様では、該方法は、抗原刺激に反応する免疫系の細胞（特にT細胞）による1つ以上の免疫エフェクター分子の生成の測定を基準にする。しかしながら、非免疫細胞もまた、抗原による免疫細胞の刺激（特に言えば再刺激）に反応して免疫エフェクター分子を放出できる。なぜならば、それらは、免疫細胞によって放出される免疫エフェクター分子によって、特に再刺激されたT細胞によって放出される免疫エフェクター分子（例えばIFN-ガンマ）によって刺激されるからである。これらの免疫エフェクター分子もまた重要な情報源であり得る。したがって、ある実施態様にしたがえば、検出される免疫エフェクター分子は、抗原再刺激に反応してエフェクターT細胞によって生成される即座のエフェクター分子であり得る。他の実施態様では、下流の免疫エフェクター分子が測定される。例えば、被検抗原によって（再）刺激された免疫細胞（特にT細胞）によって生成されるIFN-ガンマ又は他の即座の免疫エフェクター分子を工程(b)で測定できる。しかしながら、上記で述べたように、これらの分子は、他の細胞によるさらに別の免疫エフェクター分子の生成をしばしば誘発又は強化する。これら

40

50

のさらに別の（下流の）免疫エフェクター分子の生成もまた工程（b）で測定され得る。本発明はまた、工程（b）での2つ以上のタイプの免疫エフェクター分子の検出を包含する。ある実施態様にしたがえば、免疫エフェクター分子のパターンの存在又はレベルが、単独で又は即座の免疫エフェクター分子（例えばIFN-ガンマ）に加えて工程（b）で検出される。それぞれのパターンは、3つ以上、好ましくは4つ以上の異なる免疫エフェクター分子を含む。それぞれのパターンの分析は対象動物における免疫状況の貴重な情報を提供できる。例えば、固有の免疫エフェクター分子又は免疫エフェクター分子のパターンは特定の疾患の特徴であり得る。

【0028】

ある実施態様にしたがえば、工程（b）で測定される免疫エフェクター分子は、サイトカイン（例えばリンホカイン、インターロイキン又はケモカイン）である。インターフェロン（例えばIFN-ガンマ）は、決定されるべき免疫エフェクター分子として特に有用である。免疫エフェクター分子の他の例は以下のサイトカイン列を含む（ただしこれらに限定されない）：例えばインターロイキン（IL）、例えばIL-2、IL-4、IL-6、IL-8（CXCL8）、IL-10、IL-12、IL-13、IL-16（LCF）若しくはIL-17、IL-1（IL-1F1）、IL-1（IL-1F2）、IL-1r（IL-1F3）、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- $\alpha$ ）、軽質転換増殖因子ベータ（TGF- $\beta$ ）、コロニー刺激因子（CSF）、例えば顆粒球（G）-CSF又は顆粒球マクロファージ（GM）-CSF、補体成分5a（C5a）、Gro（CXCL1）、sICAM-1（CD54）、IP-10（CXCL10）、I-TAC（CXCL11）、MCP-1（CCL2）、MIF（GIF）、MIP-1（CCL3）、MIP-1（CCL4）、セルピンE1（PAI-1）、RANTES（CCL5）又はMIG（CXCL9）。いくつかの実施態様では、本発明は、工程（b）で検出される免疫エフェクター分子が、サイトカイン、補体系の成分、ペルフォリン、デフェンシン、カテリシジン、グランザイム、Fasリガンド、CD-40リガンド、エキソタキシン、サイトトキシン、ケモカイン又はモノカインである方法を提供する。好ましい実施態様では、工程（b）で検出される免疫エフェクター分子はIFN-ガンマである。したがって、好ましい実施態様にしたがえば、本発明は対象動物で細胞媒介免疫応答を測定する方法を提供し、前記方法は、前記対象動物から収集容器にサンプルを収集する工程（ここで前記サンプルは抗原による刺激に続いてIFN-ガンマを生成できる免疫系の細胞を含む）、前記サンプルを抗原及び非還元糖とインキュベートする工程、及び続いてIFN-ガンマの存在又はレベルの上昇を測定する工程を含み、ここでIFN-ガンマの存在又はレベルは前記対象動物が細胞媒介免疫応答を惹起する許容能力の指標である。

免疫エフェクター分子の組み合わせもまた工程（b）で検出できる。したがって、工程（b）は、特に抗原による刺激に反応して放出されさらに分析される疾患又は症状に特徴的な免疫エフェクター分子又は免疫エフェクター分子の組み合わせ（特にサイトカイン）を検出する工程を含む。さらにまた、1つ以上の免疫エフェクター分子のレベルをそれだけスクリーニングするか、又は他のバイオマーカー又は疾患の指標と一緒にスクリーニングすることができる。

【0029】

ある実施態様にしたがえば、免疫エフェクター分子は、該エフェクター分子と特異的に結合するリガンドを用いて検出される。免疫エフェクターに対するリガンドは、これら分子の検出及び/又は定量に特に有用である。インキュベーション組成物に含まれる細胞は免疫エフェクター分子の検出前に除去される。工程（b）で用いることができる検出アッセイのための技術は当業界で公知であり、例えば放射能免疫アッセイ、サンドイッチアッセイ、ELISA及びELISpotが含まれる。免疫エフェクターに対する抗体がリガンドとして特に有用である。“抗体”と言え、免疫エフェクター分子と特異的に結合する抗体の部分、例えばFabフラグメント、哺乳動物化（例えばヒト化）抗体、脱免疫化抗体、組換え体又は合成抗体並びにハイブリッド及び単鎖抗体を含む。ポリクローナル及びモノクローナル抗体の両方が免疫エフェクター分子又はその抗原性フラグメントによる免疫で入手でき、どちらかのタイプを免疫アッセイで利用できる。両タイプの抗体を入手する方法は当業界で周知である。ポリクローナル抗体はあまり好ましくないが、有効な量の免疫エフェクター又はその抗原性部分の適切な実験動物への注射、該動物の血清の収集及び公知の免疫

10

20

30

40

50

吸着技術のいずれかによる特異的血清の単離によって比較的容易に調製される。この方法によって作製される抗体は実質的にいずれのタイプの免疫アッセイでも利用可能であるが、それらは生成物の潜在的な不均質性のために概して好ましさは劣る。免疫アッセイにおけるモノクローナル抗体の使用は、それらを大量に作製できること及び生成物の均質性のために特に有用である。不朽細胞株及び免疫原性調製物感作リンパ球の融合により誘導されるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株の調製は、当業者に周知の技術によって実施できる。固有の免疫エフェクター分子に対する抗体もまた市場で入手可能である。

#### 【0030】

ある実施態様にしたがえば、工程(b)は、インキュベーション組成物又はその部分(例えばその細胞枯渇部分)を、検出されるべき免疫エフェクター分子に特異的な抗体又はその部分と抗体-エフェクター複合体が形成されるために十分な時間及び条件下で接触させ、さらに前記複合体を検出する工程を含む。上記に記載したように、インキュベーション組成物に含まれる細胞は、検出前に例えば遠心分離によって除去することができる。例えばサンプルとして血液を用いるときは、検出前に、細胞はインキュベーションの後で(したがって免疫エフェクター分子の生成及び放出後に)インキュベーション組成物から分離され、それによって基本的には血漿サンプルを提供できる。

#### 【0031】

米国特許第4,016,043号、4,424,279号及び4,018,653号を参照することによって理解され得るように、広範囲の免疫アッセイ技術を利用できる。生成される免疫エフェクター分子を検出するために本明細書に記載する細胞媒介免疫応答試験と一緒に用いることができる対応するアッセイはまた、WO2004/042396、WO2008/113119、WO2010/009494及びWO2011/075773に記載されている(前記文献は参照により本明細書に組み入れられる)。Clayらもまた細胞性免疫応答を追跡監視するいくつかの方法を記載し(Clay et al., Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer; Clinical Cancer Research, 2001; 7:1127-1135)、それによって抗原(再)刺激に反応して生成される免疫エフェクター分子を検出する適切なアッセイを述べている。前記には、例えばELISA系アッセイ、ELISpotアッセイ及び核酸系アッセイ(例えばリアルタイム定量RT-PCRによるサイトカインmRNAレベルの測定)が記載されている。場合によって、そのRNA発現レベルを基準にして免疫エフェクター分子レベルを決定するとき、入手データをコントロール遺伝子(例えばCD8)の発現に対して標準化することができる。対応する方法をまた本発明と一緒に用いて生成免疫エフェクター分子を検出することができる。ある実施態様にしたがえば、免疫エフェクター分子の存在又はレベルの検出に核酸系アッセイが用いられる。核酸(特にRNA)は、当業界で周知の標準的な方法を用いて、インキュベーション組成物又はその細胞性部分から単離できる。好ましくは、免疫エフェクター分子の発現の存在又は上昇は、この実施態様では増幅系アッセイ(好ましくはPCR系アッセイ)を用いて検出される。単離RNAは、先ず初めに検出されるべき免疫エフェクター分子に特異的なプライマー及び/又はプローブを用いて増幅前にcDNAに逆転写される。好ましくは、この検出は定量的である。ある適切な方法は定量的リアルタイムRT(逆転写)PCRである。

好ましくは、工程(b)の免疫エフェクター分子の検出は定量的検出である。

#### 【0032】

<具体的な実施態様>

本発明の方法の具体的かつ好ましい実施態様及び前記で用いられる成分が以下に記載されるであろう。

上記で述べたように、工程(a)では、1つ以上の追加の添加物がインキュベーション組成物に含まれ得る。ある実施態様にしたがえば、調節性T細胞(T-reg細胞)の活性を調節するために因子が添加される。該活性は、T-reg細胞のサプレッサー機能の阻害を包含する。本明細書に包含されるT-reg細胞を調節する因子には、CD25リガンド、JAK1又はTYK2をコードする遺伝物質に対するセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、中和抗体、CpG含有オリゴヌクレオチド、Toll様受容体(TLR)調節因子として作用するオリゴヌクレオチド、及び他のTLR調節因子が含まれるが、ただしこれらに限定されない。個々の実施

10

20

30

40

50

態様では、T-reg細胞は、その活性が該調節因子によって阻害される免疫応答サプレッサー細胞である。“CpG分子”はCpG配列又はモチーフを含むオリゴヌクレオチドを意味する。T-reg機能の阻害因子又は調節因子の例にはCD25リガンドが含まれ、前記にはCD25のポリクローナル若しくはモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント、CD25に対するヒト化若しくは脱免疫化ポリクローナル若しくはモノクローナル抗体、又は該ポリクローナル若しくはモノクローナル抗体の組換え体又は合成形が含まれるが、ただしこれらに限定されない。他の因子の例には、ジャヌス（Janus）チロシンキナーゼ1（JAK1）又はチロシンキナーゼ2（TYK2）をコードするmRNA若しくはDNAに対するセンス又はアンチセンス核酸分子、又はJAK1若しくはTYK2タンパク質の小分子阻害因子が含まれる。“小分子”と言えば、国際特許出願公開WO2005/118629に記載された免疫グロブリン新抗原受容体（IgNAR）が含まれる。さらにまた別の適切な因子の例は、刺激因子、例えばToII様受容体及び/又は他のメカニズムを介して作用するCpG分子である。したがって、CpG含有オリゴヌクレオチド及びTLR調節因子として作用するオリゴヌクレオチドはまた本開示の部分形成する。T-reg細胞の調節のために、単一タイプの因子を用いることができ、或いは2つ以上のタイプの因子を用いることもできる。例えば、アッセイは、CD25リガンド及びJAK1/TYK2センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド；CD25リガンド及びTLR調節因子；JAK1/TYK2センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド及びTLR調節因子；又はCD25リガンド、JAK1/TYK2センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド及びTLR調節因子を用いて実施できる。また別には、1タイプだけの因子が用いられる。別の選択肢では、CpG含有オリゴヌクレオチド及びTLR調節因子が用いられる。それぞれのT-reg調節因子はサンプル及び/又はインキュベーション組成物に別個に添加されるか、又は抗原及び非還元糖を含む組成物に含まれ得る。

10

20

### 【0033】

ある実施態様にしたがえば、本発明の方法は、（a）ヒト対象動物から入手した全血サンプルを、少なくとも1つのペプチド抗原及び少なくとも1つの非還元二糖類（好ましくはトレハロース又はシュクロース）を含む組成物と接触させることによってインキュベーション組成物を調製する工程、及び該インキュベーション組成物を室温より上で少なくとも2時間インキュベートする工程；及び（b）IFN-ガンマの存在又はレベルを検出する工程を含み、ここでIFN-ガンマの存在又はレベルは、該ヒト対象動物の細胞媒介免疫応答性の指標である。

30

好ましくは、ペプチド抗原は疾患又は病原体に特異的な抗原である。病原体の非限定的な例は本明細書に記載される。ある実施態様にしたがえば、病原体はウイルスであり、該方法は、ヒト対象動物が抗ウイルス細胞媒介免疫応答を惹起する許容能力を有するか否かを決定することを可能にする。

ある実施態様にしたがえば、該方法は、（c）検出された免疫エフェクター分子レベル又は前記から誘導される値を参照レベルと比較する工程を追加的に含む。

工程（c）は、決定された免疫エフェクター分子レベル又は前記から誘導される値を参照レベルと比較する工程を含む。この実施態様は、該抗原が表象する病原体感染の診断に特に有用である。前記対象動物が該病原体に感染していれば、決定された免疫エフェクター分子レベル又は前記から誘導された値は参照レベルより高く、前記対象動物が該病原体に感染していなければ、決定された免疫エフェクター分子レベル又は前記から誘導された値は参照レベルより低い。該抗原が表象する病原体に対して前記対象動物が細胞媒介免疫応答を惹起することができるか否かの決定に、同じ原理が当てはまる。

40

### 【0034】

ある実施態様にしたがえば、サンプルは少なくとも2つの分画に分割され、工程（a）で、サンプルの第一の分画は抗原及び非還元糖と接触されて応答サンプルが作成され、さらにサンプルの第二の分画は不活性溶液と接触されて陰性コントロール（ゼロ）サンプルが作成される。この実施態様の工程（b）では、免疫エフェクター分子の存在又はレベルは該2つの分画で決定される。工程（c）では、サンプルの抗原依存免疫エフェクター分子応答は、陰性コントロールサンプルで決定された免疫エフェクター分子レベルを応答サンプ

50

ルで決定された免疫エフェクター分子レベルから差し引くことによって決定される。続いて抗体依存免疫エフェクター分子応答又は前記から誘導された値を参照レベルと比較し、それによって該対象動物が以前に該抗原と遭遇したことがあるか否かの決定を補助する。したがって、例えば、対象動物が該抗原に対して免疫学的反応性を生じさせているか否か、疾患を進行させるリスクがあるか否か、及び/又はある病原体に対して感受性を有しているか否かを決定できる。

#### 【0035】

場合によって、該方法はさらにサンプルを少なくとも3つの分画に分割し、さらに該サンプルの第三の分画をT細胞活性化因子（例えばマイトジェン）とインキュベートして陽性コントロールサンプルを作成する工程を含むことができる。免疫細胞は例えば3つの別個の集団（陰性コントロールサンプル（例えば食塩水）、抗原で刺激される応答サンプル、及び陽性コントロールサンプル（例えばT細胞活性化因子（例えばマイトジェン、例えばフィトヘマグルチニン）を用いる））でインキュベートされ得る。したがって、ある実施態様にしたがえば、サンプルは少なくとも3つの分画に分割される。工程（a）で、サンプルの第一の分画は抗原及び非還元糖と接触されて応答サンプルが作成され、サンプルの第二の分画は不活性溶液と接触されて陰性コントロールサンプルが作成され、サンプルの第三の分画は刺激溶液（例えばマイトジェンを含む）と接触されて陽性コントロールサンプルが作成される。この実施態様の工程（b）で、免疫エフェクター分子の存在又はレベルが3つの分画で決定される。工程（c）では、応答サンプルの抗原依存免疫エフェクター分子応答は、陰性コントロールサンプルで決定された免疫エフェクター分子レベルを応答サンプルで決定された免疫エフェクター分子レベルから差し引き、さらに抗原依存免疫エフェクター分子応答又は前記から誘導された値を参照レベルと比較することによって決定される。陽性コントロールサンプルの免疫エフェクター分子応答は、陰性コントロールサンプルで決定された免疫エフェクター分子レベルを陽性コントロールサンプルで決定された免疫エフェクター分子レベルから差し引き、得られた免疫エフェクター分子応答を参照レベル又は前記から誘導された値と比較することによって決定される。したがって、対象動物が被検抗原又は前記と交差反応を示す抗原と以前に遭遇したか、したがって該抗原に対して免疫学的反応性を生じたか否かを決定できる。これは、対象動物が活動的感染、最近のものである感染又は潜伏感染を有しているか否か、又は対象動物が治療に応答しているか否か、感染若しくは疾患を進行させようとしているか否か、又は免疫が抑圧されているか否かを決定する上で貴重な助けとなる。例えば、抗原依存免疫エフェクター分子応答が参照レベルより高い場合には、結果は陽性であると、すなわち対象動物は前記抗原に対して細胞媒介応答を示すことができると判定できる。抗原依存免疫エフェクター分子応答が参照レベルより低くかつ陽性コントロールの抗原依存免疫エフェクター分子応答が参照レベルより高い場合には、結果は陰性であると、すなわち対象動物は前記抗原に対して細胞媒介応答を示すことができないと判定できる。

陽性コントロールとして本発明で用いることができるマイトジェンは当業者に公知の全てのマイトジェンを包含し、フィトヘマグルチニン（PHA）、コンカナバリンA（conA）、リポ多糖類（LPS）、及びヤマゴボウマイトジェン（PWM）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。陽性コントロールを提供するために用いることができるマイトジェン以外の免疫刺激物質の他の例には化学的化合物（例えばR848）が含まれるが、ただし前記に限定されない。

#### 【0036】

上記に記載したように、いくつかの実施態様では、サンプル、抗原及び非還元糖が共同インキュベートされる容器はまた対象動物からサンプルを収集するために用いられる収集容器である。多数の利用可能な種々の容器のいずれも、それらが適切なサンプル容積を提供することを条件に用いることができる。いくつかの実施態様では、容器は、サンプル（例えば血液）の対象動物からの収集を容易にするために真空状態を含むチューブである。対応する真空血液収集チューブは従来技術で周知であり、本明細書における詳細な説明を全く必要としない。他の実施態様では、容器はキャピラリーチューブである。いくつかの

10

20

30

40

50

実施態様では、キャピラリーチューブが毛細管作用によって皮膚表面から血液を収集するために用いられる。いくつかの実施態様では、サンプルは、少なくとも1つの抗原、少なくとも1つの非還元糖及び少なくとも1つの抗凝固剤（好ましくはヘパリン）を含むか、又はそれに抗原、非還元糖及び抗凝固剤（好ましくはヘパリン）が続いて添加される収集容器へ対象動物から収集される。いくつかの実施態様では、血液はキャピラリーサンプリング装置（例えばピン穿刺装置）を用いてサンプル採取され、血液はヘパリン化収集容器に収集され、続いて抗原及び非還元糖との共同インキュベーションのために適切な容器に移される。好ましくは、上記に記載したように抗原、非還元糖及び場合によって抗凝固剤が単一組成物の形態で提供される。いくつかの実施態様では、全血は対象動物から抗原、非還元糖及び場合によって抗凝固剤を含む容器に収集される。他の実施態様では、抗原、非還元糖及び/又は抗凝固剤は収集後に全血に添加される。

10

#### 【0037】

本発明は、特に病原体（特にマイコバクテリア、例えばヒト型結核菌）への曝露についてのスクリーニングに有用である。したがって、本開示は対象動物で細胞媒介免疫応答活性を測定する方法を教示し、前記方法は、抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成できる免疫細胞を含むサンプルを結核症特異的抗原及び非還元糖と接触させる工程を含む。抗原として用いられるペプチドはヒト型結核菌のタンパク質抗原の全部又は部分を包含することができる。インキュベーション後に、免疫細胞によって生成された免疫エフェクター分子（好ましくはインターフェロンガンマ）のレベルが決定され、ここで、免疫エフェクター分子レベルは、該対象動物のヒト型結核菌に対する細胞媒介免疫応答性レベルの指標である。

20

ESAT-6は6kDaのヒト型結核菌の初期分泌抗原標的である。ESAT-6タンパク質（early secreted antigenic target 6）は、ヒト型結核菌の短期培養液から精製された主要な分泌抗原である。本明細書で言及するように、ESAT-6、CFP-10（培養液タンパク質10：culture filtrate protein 10）及び85Bは、細胞溶解物及び精製から入手されるか、組換え体技術によって又は合成ペプチドとして生成され得る。例えば、ESAT6はスタテンス・シーラム・インスチチュート（Statens Serum Institute）（SSI, Copenhagen Denmark）から組換えタンパク質として入手できる。ヒト型結核菌の他の適切な標的抗原にはTB7.7及びTB37.6が含まれる。CFP10はまたESAT-6様タンパク質eesxB及び分泌抗原タンパク質MTSA-10としても知られている。

30

#### 【0038】

ツベルクリン又はPPD（精製タンパク質誘導体：purified protein derivative）は、ヒト型結核菌ゲノム中にのみ存在する（RD-1領域内）遺伝子によってコードされ、BCG（Bacille of Calmette et Guerin）には含まれていないESAT-6（初期分泌抗原標的6）、CFP-10（培養液タンパク質10）及びTB7.7とは異なる。BCGはPPDとは異なる。なぜならば、PPDはまた、例えばBCG亜株及び病原性が全く無いか又は病原性が低いいくつかの非結核性マイコバクテリア種と共有される他の抗原を含むからである。ある実施態様にしたがえば、PPDが抗原として用いられる。特に本明細書で用いられるように、精製タンパク質誘導体（PPD又はツベルクリン）という用語は非種特異性分子の沈殿物である。PPD又はツベルクリンは、ヒト型結核菌又は他のマイコバクテリア（例えば鳥型結核菌（*M. avium*））の混合物に由来するタンパク質を抽出することによって入手される。PPDは、BCGに対して又はヒト型結核菌に対して生じる細胞性免疫又はTh1応答の存在についての試験で一般的に用いられる。例えば、PPDは、Tubersol B（Connaught Laboratories Limited）（大量のマスターバッチであるコンノートツベルクリン（Connaught Tuberculin（CT68））から調製される）又はRT23（スタテンス・シーラム・インスチチュート（SSI, Copenhagen Denmark）から入手される）の形で入手できる。

40

好ましくは、抗原はヒト型結核菌由来のCFP10、ESAT-6、TB7.7及びTB37.6から選択される。ある実施態様にしたがえば、抗原は、これらのタンパク質抗原に一致するか及び/又はそれらに対して交差反応性を示すペプチドによって提供される。

ある実施態様では、サンプルはCD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>ペプチドの混合物と接触される。前記ペプ

50

チドは上記で詳細に記載した。上記開示を参照できる。

【0039】

免疫系の細胞は、対象動物の採血から長期間後に全血で細胞媒介免疫応答を惹起する許容能力を失い、介入を施さない場合の応答は採血から24時間でしばしば激しく低下するか又は応答は生じない。本発明における手間及び特殊装置の必要性の減少は、抗原による細胞媒介免疫応答刺激を医療現場（例えば医師の診察室、診療所、外来診療施設及び獣医の診療所又は農場）で実施することを可能にする。いったん抗原刺激が完了したら、新鮮で活動的な細胞の必要性はもはや存在しない。抗原の刺激により放出されたIFN-ガンマ及び他のサイトカイン又は免疫エフェクター分子は、無細胞液又は細胞枯渇液（例えば血漿）で安定であり、したがって特殊な条件又は緊急を要することなく、他の感染症又は他の疾患の診断のために用いられる標準的な血漿又は血清と同様な態様でサンプルを貯蔵又は輸送することができる。したがって、実際の放出免疫エフェクター分子を検出することが好ましい。しかしながら、免疫エフェクター分子の存在又はレベルが該免疫エフェクター分子のRNA発現レベルに基づいて決定される場合は、インキュベーション組成物に含まれる細胞又は全インキュベーション組成物をインキュベーション後に核酸安定化組成物（RNA発現パターンを安定化させる試薬を含む）と接触させることができる。いくつかの安定化組成物が市場で入手できる。例えばPreAnalytiXは、血液におけるRNA遺伝子発現プロファイルの即時安定化のための試薬を含む組成物を提供する。対応する組成物はまた、インキュベーション組成物に含まれる細胞のRNA遺伝子発現プロファイルを安定化させるために用いられ得る。前記対応する安定化組成物は、遺伝子誘導及び転写物分解によるRNAプロファイルの変化を生じるおそれがなく室温での輸送及び貯蔵を可能にする（例えば以下を参照されたい：US 6,617,170、US 7,270,953、Kruhoffer et al., 2007）。前記対応する組成物はPAXgeen血液RNAチューブ（PAXgeen Blood RNA Tube）の名称で販売されている。

【0040】

<適用、疾患及び症状>

非限定的な適用（用い方を含む）、疾患及び症状が以下に記載されるであろう。それらから明らかのように、本発明の方法並びに本明細書に記載の組成物及びキットは医療及び診断分野で広く用いることができ、例えば患者の細胞媒介応答性の分析に適切なin vitroアッセイで用いることができる。さらにまた、本発明の方法並びに本明細書に記載の組成物及びキットは、薬剤（例えば癌免疫療法薬）の細胞媒介免疫の刺激（したがって強化）の許容能力の試験のための貴重な分析ツールである。

本明細書で教示する方法は、対象動物における疾患又は症状（例えば病原性因子による感染、自己免疫疾患、癌、炎症性因子への曝露、医薬への曝露、有害なタンパク質性因子への曝露、及び免疫不全又は免疫抑制状態（例えば病態によって誘発又は薬剤によって誘発される））の有無又はレベル又は病期の検出を可能にする。細胞媒介免疫を高い信頼性でかつ鋭敏に測定する能力は、例えば病原性因子（例えば微生物、ウイルス又は寄生生物）による感染への応答、自己免疫応答の惹起、ワクチン若しくは免疫療法薬への応答、癌若しくは他の腫瘍学的症状への防御に対する対象動物の能力の判定、炎症症状の検出、又は有害因子（例えばベリリウム又は環境性因子）への対象動物の曝露若しくは過敏性の検出のために重要である。本明細書に記載するアッセイは、免疫応答性の早期及び/又はより鋭敏な検出を可能にする。本明細書に記載するアッセイはまた、免疫抑制に至る病態の検出又は医薬により誘発される免疫抑制の検出を可能にするか又は補助する。結果として、本明細書で教示する“対象動物における細胞媒介免疫応答の測定”は医療分野で多くの有用な適用を有し、非限定的な使い方及び適用が続いて記載されるであろう。

【0041】

例えば、本明細書に記載する方法は、免疫能力のためのマーカーとして、或いは炎症性疾患、アレルギー、癌、免疫療法薬の効果のためのマーカーとして、及び有害因子のためのマーカーとして感染性及び自己免疫疾患の免疫診断のために用いることができる。さらにまた、該方法は、概して内因性及び/又は外因性抗原に対するT細胞応答の検出に有用である（ワクチンの有効性の測定を含む）。

細胞系の機能的免疫応答アッセイはまた、免疫応答に影響を与えるワクチン、免疫療法薬及び生物製剤の開発で有効性の代用マーカーとして受け入れられた。該アッセイは、学術環境で、調剤環境で、並びにワクチン及び生物製剤の研究開発で用いることができる。免疫細胞の機能的許容能力の評価は、いくつかの病態及びそれらに向けられる治療戦術の有効性の理解のために決定的に重要である。免疫細胞は、例えば感染症（例えばHIV）では予防又は治療に対応能力を有するか、又は症状そのもの（例えば自己免疫の病態）に対応能力を有する。自己抗原特異的反応性は、自己免疫疾患（例えば多発性硬化症）を罹患している患者で本発明の方法を用いて測定できる。本発明はこれらの目的に有用なアッセイを提供する。

#### 【0042】

癌免疫療法の多数の戦術が臨床試験においてこれまでのところ試験されている。臨床的な有効性はこれらのアプローチの最終試験であろうが、これらの項目についての長く複雑な開発経路では、もっとも成功しそうな候補物質の存在マーカーとして免疫学的応答の評価が必要である。前記は、T細胞媒介の抗原特異的免疫応答を実際に検出及び定量するアッセイの必要性を強調する。対応する免疫療法剤（例えば必ずしも腫瘍の退縮を引き起こすと期待はされないが当該疾患に対して有益な影響を有する）について、生物学的マーカーは活性の想定される態様に基づいて選択されねばならない。免疫療法については、そのようなマーカーは、1つ以上の免疫学的アッセイによって検出できる腫瘍抗原特異的免疫応答の刺激である。好ましくは、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞の機能（前記T細胞は直接的細胞溶解の引き金として腫瘍細胞表面でMHC分子によって提示される腫瘍ペプチドを直接認識する）及びCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞（特にTヘルパー1型）応答（細胞傷害性T細胞の発生をもたらす）を評価するアッセイが用いられる。本発明は、それらの感度及び信頼性によりそのような目的に有用なアッセイを提供する。したがって、本明細書に記載の方法、キット及び組成物を用いて、薬剤（例えば癌免疫療法剤）が細胞媒介免疫を強化することができるかを分析できる。これは、入手可能な（例えば標準化された）免疫細胞（例は上記に記載されている）を用いて一般的なレベルで試験してもよく、又は個々の患者で試験して、特定の免疫療法薬（例えば癌免疫療法薬）が前記患者で細胞媒介免疫を強化できるかを分析してもよい。そのようなアッセイは、臨床開発のためだけでなく、患者が免疫療法薬による治療から利益を得るか否かを分析するために後期の治療の設定でも貴重である。免疫療法薬の例には、生物製剤、例えばT細胞（特に細胞傷害性T細胞）の活性を強化する治療用抗体が含まれるが、ただし前記に限定されない。作用態様は、それが細胞媒介免疫の刺激/増進をもたらすか又はもたらすと考えられるかぎり無関係である。例えば、活性は、免疫細胞の直接刺激によって強化され得るか、又は前記T細胞の活性に負の影響を与える阻害性メカニズムを低下させるか若しくは停止させ、それによって間接的に細胞媒介免疫を刺激/増進することによって該活性は強化され得る。一例は癌免疫療法抗体イピリムマブである。

#### 【0043】

さらにまた、本発明の方法を用いて対象動物の疾患若しくは症状の有無、レベル若又は病期を検出でき、ここで、本発明の方法を用いて検出される免疫エフェクター分子の存在又はレベルは当該疾患若しくは症状の指標である。

さらにまた、本発明の方法を用いて、ある因子又は病態が対象動物の免疫抑制を誘発するか又は前記と一体であるかを決定でき、ここで、本発明の方法を用いて検出される免疫エフェクター分子の存在又はレベルは、当該因子により誘発されるか又は当該病態によって誘発され若しくは前記と一体である当該免疫抑制の程度の指標である。

本発明のある特徴は対象動物の細胞媒介免疫応答性を提示する方法を含み、前記方法は本発明の方法を用いて特定の抗原に対する応答性を測定する工程を含む。ある実施態様では、サンプル（例えば全血、濃縮白血球分画又は気管支肺胞洗浄液）は特定の疾患（例えば自己免疫疾患、病原性因子による感染によって引き起こされる疾患、又は有害因子への曝露）を進行させているか又はそのように疑われる対象動物から入手でき、免疫応答性は本発明の第一の特徴の方法を用いて、例えば該抗原による刺激に応答するエフェクターT

10

20

30

40

50

細胞（例えばCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞）から放出される免疫エフェクター分子を検出することによって測定される。

【0044】

本発明の方法は、対象動物で疾患若しくは症状のレベル又は病期を含む、疾患若しくは症状の検出又は追跡監視で特に有用であり、前記疾患若しくは症状は、例えば病原性因子による感染、自己免疫疾患、癌又は炎症症状である。他の症状には、有害因子（例えばベリリウム）への曝露が含まれる。本発明のアッセイはまた治療プロトコルの追跡監視に有用である。

被検抗原に応答して生成される免疫エフェクター分子の存在又はレベルは対象動物の細胞媒介応答性のレベルの指標である。特に、応答性のレベルは、病原性因子による感染、自己免疫疾患、癌、炎症症状、及び有害因子への曝露を含むリストから選択される疾患又は症状の有無又はレベル又は病期の指標である。特に、免疫エフェクター分子の存在又はレベルは、被検抗原が表象する疾患又は症状の有無、レベル又は病期の指標である。

該方法はまた、対象動物の疾患又は症状のための治療プロトコルに対する応答の追跡監視に用いることができる。生成される免疫エフェクター分子の存在、レベル又はパターンは該治療プロトコルの有効性の指標であり得る。

本発明の方法はまた“アッセイ”と称することができる。該方法はex vivoの方法である。本明細書に記載するアッセイは対象動物の一般的免疫応答性の評価でとりわけ有用であるか、又は特異的な病態（例えば自己免疫疾患、セリアック病、癌、又は病原性生物若しくは因子による感染、有害因子若しくは医薬への曝露、及び免疫不全若しくは免疫抑制症状（例えば病態又は治療薬剤によって誘発される））に対する応答性の検出に有用である。

【0045】

ある実施態様では、対象動物はヒトであり、細胞媒介免疫応答アッセイは、病原性微生物、ウイルス及び寄生生物への応答性のスクリーニングに、自己免疫症状、セリアック病の進行の可能性のスクリーニング又は追跡監視に、腫瘍学的チャレンジに対する対象動物の応答の追跡監視に、及び何らかの免疫不全又は免疫抑制の存在を決定するために用いられる。後者は、例えばある種の医薬（多様な化学療法剤を含む）により生じ得る。また別には、環境性有害物質及び汚染物質への曝露を試験することができる。ある実施態様では、免疫抑制に至る病態には慢性感染症及び癌が含まれる。免疫抑制に至る他の病態には炎症性病態が含まれる。免疫抑制をもたらし得る医薬には、慢性関節リウマチ、癌及び炎症性腸疾患の治療に用いられるもの又は器官移植に併用して投与されるものが含まれる。

ある実施態様では、本明細書に記載する方法は、結核が疑われる（例えば活動性、潜伏性又は最近のTB感染）対象動物、特に潜伏性から活動性結核へ進行するリスクが高まっている患者、例えば免疫抑制医薬（すなわちモノクローナル抗体治療（抗CD20抗体（例えばリツキシマブ（Rituximab））又はTNF-アルファ封鎖治療（例えばレミケード（Remicade））、エンブレル（Enbrel）、ヒミラ（Humira））又はステロイド若しくは癌化学療法を与られている患者、又は免疫抑制症状（例えばHIV感染、癌、IDDM又は非インスリン依存真性糖尿病（NIDDM）、自己免疫症状、栄養失調、高齢、静脈薬剤使用（IVDU）又は遺伝性免疫異常）に罹患している患者、及び最近感染した個体の診断又は追跡監視のために又はその補助として用いることができる。

【0046】

ある実施態様では、本明細書に記載の方法は、感染症又は他の病態と診断された対象動物の追跡監視に用いることができる。これは、例えば治療の間又は治療後に、例えば該感染症の再発可能性を追跡監視及び予想することによって治療の有効性の判定に役立ち得る。

ある実施態様にしたがえば、該方法は、対象動物が感染するか否か、及び/又は該抗原が表象する病原体に対して対象動物が細胞媒介免疫応答を惹起できるか否かを決定できる。

病原性又は感染性因子には、細菌、寄生生物及びウイルスが含まれる。細菌の例にはグ

10

20

30

40

50

ラム陽性及びグラム陰性微生物、例えば、とりわけマイコバクテリウム (Mycobacterium) 種、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 種、ストレプトコッカス種 (Streptococcus)、大腸菌 (Escherichia coli)、サルモネラ (Salmonella) 種、クロストリジウム (Clostridium) 種、シゲラ (Shigella) 種、プロテウス (Proteus) 種、バシルス (Bacillus) 種、ヘモフィルス (Hemophilus) 種、ボレリア (Borrelia) 種が含まれる。ヒト型結核菌は、前記菌による感染から生じる病態 (例えば結核症 (TB)) と同様に特に有用な標的である。ウイルスの例には、肝炎ウイルス (B型肝炎ウイルス及びC型肝炎ウイルス)、ヘルペスウイルス、及びCMVウイルス及びヒト免疫不全ウイルス (HIV) がそれらから生じる疾患とともに含まれる。寄生生物には、プラズモジウム (Plasmodium) 種、白癬、肝臓寄生生物などが含まれる。他の病原性因子には、真核細胞、例えば酵母菌及びカビが含まれる。これらの感染性実体に曝露された対象動物の潜在的な又は実際の細胞媒介応答性を判定することは一般的に重要である。本開示の方法はまた、これら感染症の有無とともに該疾患経過のレベル又は病期の検出に用いることができる。

#### 【 0 0 4 7 】

該方法はまた、ある種の疾患及び/又は感染性因子に対する細胞媒介免疫のレベルを、対応する疾患を進行させるリスクがある人で追跡監視するために用いることができる。一例は、免疫抑制患者 (例えば器官移植患者) のCMV感染である。CMV感染はしばしば免疫抑制の合併症として (特に移植後に) 生じ、移植片レシピエントの有病率及び死亡率に大きな影響を与える。移植器官の拒絶を防止するために用いられる従来の免疫抑制療法はTリンパ球 (したがって細胞媒介免疫応答) に有害な作用を有し、移植後のウイルス感染に対し感受性の増進をもたらす。T細胞機能及びCMV複製抑制の重要性は、CD8<sup>+</sup>CMV特異的細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) がウイルス関連病理発生を防御できるという事実によって強調される。免疫が抑制される患者の別の例はHIV感染患者である。本発明の方法を用いて、疾患に対する免疫 (例えば抗CMV免疫) のレベルを、対応する疾患を進行させるリスクがある人で連続的に追跡監視することができる (なぜならば、この免疫機能の低下は当該疾患 (例えばCMV疾患) の進行と一体であり得るからである)。好ましくは、インターフェロンガンマがエフェクター分子として対応する試験で決定される。移植片レシピエントの免疫状況は、移植片レシピエントのCMV (再) 活性化に影響を及ぼすことができる。例えば、CMV特異的抗原によって誘発される激しいインターフェロンガンマ応答はCMV疾患のリスク低下を示す。なぜならば、当該患者は強力な細胞媒介応答を有する (したがってウイルスを防御する) からである。わずかなインターフェロンガンマ応答は、細胞媒介免疫が存在しないか又は非常に低いのでCMV疾患のリスクの増進を示す。データは、CMV試験が陽性の患者は、抗ウイルス予防処置停止後に試験が陰性の患者よりもはるかに頻繁にかつ長期間にわたってCMV疾患を示さないことを示している。したがって、予防処置の終了後にCMVに対する細胞性免疫応答を有する患者は、検出可能な免疫応答がない患者よりもCMV疾患を進行させるリスクが顕著に低い。したがって、本発明の方法は、移植片レシピエントの後期開始CMV疾患の進行を予測することができ、したがって患者の管理に非常に有用である。

#### 【 0 0 4 8 】

また別に対象動物は以下から選択される病態を有していてもよく、又はそれらについて試験することができる: セリアック病、自己免疫性糖尿病、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫アジソン病性多発性硬化症、副腎の自己免疫、自己免疫溶血性貧血、自己免疫肝炎、自己免疫卵巣炎及び精巣炎、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー皮膚炎、慢性疲労症候群 (CFIDS)、慢性炎症性脱髄、慢性炎症性多発神経症、チャグ-ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素病、クローン病、疱疹状皮膚炎、円板状狼瘡、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛症、糸球体腎炎、グレーヴズ病、ギラン-バレン症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、IgA腎症、インスリン依存糖尿病 (I型)、扁平苔癬、狼瘡、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋炎、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多発性腺症候群 (poly

10

20

30

40

50

glanular syndrome)、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎と皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー病、ライター症候群、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、類肉腫症、皮膚硬化症、ショーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、白斑、及び炎症性腸疾患。

【0049】

対象動物はまた別に癌であってもよく、又は癌について試験することができる。癌療法はまた細胞免疫に幾らか依存し、癌そのもの又は癌を治療するために用いられる薬剤は免疫抑制をもたらし得る。本明細書で意図する癌には、特殊化細胞及び分化細胞へ全く分化しない無制御細胞増殖(例えば腫瘍の形成)を特徴とする一群の疾患及び異常が含まれる。そのような疾患及び異常には以下が含まれる: ABL1プロトオンコジーン、AIDS関連癌、聴神経腫、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、腺嚢胞癌腫、副腎皮質癌、原因不明の骨髄転移、脱毛症、肺胞軟部肉腫、肛門癌、血管肉腫、再生不良性貧血、星状細胞腫、毛細血管拡張性運動失調、基底細胞癌腫(皮膚)、膀胱癌、骨癌、腸癌、脳幹神経膠腫、脳及びCNSの腫瘍、乳癌、CNS腫瘍、癌様腫瘍、子宮頸癌、小児脳腫瘍、小児癌、小児白血病、小児軟組織肉腫、軟骨肉腫、絨毛癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸直腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、隆起性皮膚線維肉腫、癒着性小円形細胞腫、管の癌、内分泌腺の癌、子宮内膜癌、脳室上衣細胞腫、食道癌、ユーイング肉腫、肝臓外胆管癌、眼の癌、眼におけるメラノーマ、網膜芽細胞腫、ファロピウス管の癌、ファンコニー貧血、線維肉腫、胆嚢癌、胃癌、胃腸管の癌、胃腸管の癌様腫、泌尿生殖器の癌、胚細胞腫、妊娠時栄養膜疾患(gestational-trophoblastic-disease)、神経膠腫、婦人科の癌、血液学系悪性疾患、ヘアリー・セル白血病、頭部及び頸部の癌、肝細胞癌、遺伝性乳癌、組織球症、ホジキン病、ヒトパピロームウイルス、胞状奇胎、高カルシウム血症、下咽頭癌、眼内メラノーマ、膵島細胞癌、カボジ肉腫、腎臓癌、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭癌、平滑筋肉腫、白血病、リー-フラウメニ症候群、舌癌、脂肪肉腫、肝臓癌、肺癌、リンパ水腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、男性の乳癌、腎臓の悪性杆状腫瘍、髓芽細胞腫、メラノーマ、メルケル細胞癌、中皮腫、転移癌、口の癌、多発性内分泌腺の新形成、菌状息肉腫、脊髄形成異常症候群、骨髄腫、骨髄増殖異常、鼻の癌、鼻咽頭癌、腎芽細胞腫、神経芽細胞腫、神経線維腫症、ナイミーヘン症候群、非メラノーマ皮膚癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、眼の癌、食道癌、口腔の癌、口腔喉頭部の癌、骨肉腫、オストミー卵巣癌(ostomy ovarian cancer)、膵臓癌、副鼻腔癌(paranasal cancer)、上皮小体癌、耳下腺癌、陰茎癌、末梢神経外胚葉腫瘍、下垂体癌、真性赤血球増加症、前立腺癌、稀少癌と関連疾患、腎細胞癌腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、ロートムント-トムソン症候群、唾液腺癌、肉腫、神経鞘腫、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌(SCLC)、小腸癌、軟組織肉腫、脊髄腫瘍、扁平上皮癌(皮膚)、胃癌、滑膜肉腫、精巣癌、胸線癌、甲状腺癌、移行細胞癌(膀胱)、移行細胞癌(腎-骨盤-/尿管)、栄養膜癌、尿道癌、泌尿系の癌、ウロプラキン、子宮肉腫、子宮癌、膣癌、陰門癌、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、及びウィルムス腫瘍。

また別に対象動物をタンパク質性有害物質に曝露するか、タンパク質性有害物質への曝露について試験することができる。

【0050】

検出及び/又は追跡監視のために本明細書で意図される自己免疫疾患にはとりわけ以下が含まれる: 円形脱毛症、強直性脊髄炎、抗リン脂質症候群、自己免疫アジソン病性多発性硬化症、副腎の自己免疫、自己免疫溶血性貧血、自己免疫肝炎、自己免疫卵巣炎及び精巣炎、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄、慢性炎症性多発性神経症、チャージ-ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素病、クローン病、疱疹状皮膚炎、円板状狼瘡、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛症、糸球体腎炎、グレーヴズ病、ギラン-バレン症候群、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、インスリン依存糖尿病(1型)、扁平苔癬、狼瘡、メニエール病、混合結合組織

10

20

30

40

50

病、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋炎、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多発性腺症候群（polyglandular syndrome）、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎と皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー病、ライター症候群、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、類肉腫症、皮膚硬化症、ショーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、及び白斑。

#### 【0051】

意図される他の病態には炎症性病態が含まれる（それらは免疫抑制をもたらす得るからである）。本開示で意図される炎症性病態の例には、発赤、腫脹、痛み、及び一定領域の熱感の応答（損傷又は異常を被った組織の防御を意味する）をもたらす疾患及び異常が含まれるが、ただし前記に限定されない。本開示の方法を用いて治療し得る炎症性疾患には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：ざ瘡、狭心症、関節炎、吸引性肺炎、疾患、蓄膿症、胃腸炎、炎症、腸流感、NEC、壊死性腸炎、骨盤炎症疾患、咽頭炎、PID、胸膜炎、咽頭炎、発赤、潮紅、咽頭痛、胃流感及び尿管感染症、慢性炎症性脱髄性多発性神経症、慢性炎症性脱髄性多発性神経根神経症、慢性炎症性脱髄性多発性神経症、慢性炎症性脱髄性多発性神経根神経症。非ヒトへの適用に関しては、本開示は、ウマのEIPH及び動物の多様な症状（例えばタスマニアデビルの顔面腫瘍疾患）の検出に及ぶ。

上記の特徴では、抗原は病原性因子から誘導されるか、該病態若しくは癌に付随するか、又は有害物質であり得る。また別には、感染症、病態、癌又は有害物質が細胞媒介免疫を抑制することがあり、そのような事例では、該対象動物が以前に曝露された任意の抗原を利用することができよう。

#### 【0052】

第一の特徴の方法に関する説明及び特許請求の範囲に記載される、特に有益な実施態様を以下で再度述べる。第一の特徴にしたがえば、本開示は、細胞媒介免疫応答活性を測定する方法を提供し、前記方法は、（a）抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成することができる免疫細胞を含むサンプルを少なくとも1つの抗原及び少なくとも1つの非還元糖と接触させることによってインキュベーション組成物を提供する工程、及び（b）少なくとも1つの免疫エフェクター分子の存在又はレベルを検出する工程を含む。

ある実施態様にしたがえば、該非還元糖は非還元二糖類であり、好ましくはトレハロース及びシュクロースから選択される。インキュベーション組成物中の非還元糖の濃度は、ある実施態様にしたがえば少なくとも1.5mg/mL、好ましくは少なくとも2mg/mLである。インキュベーション組成物中の非還元糖の濃度の適切な範囲はまた上記に記載されており、上記開示を参照できる。

ある実施態様にしたがえば、非還元糖は、トレハロース、マンニトール、シュクロース及びラフィノースから選択される。実施例で示されるように、これら非還元糖は応答レベルを増進させる。トレハロースは、ここで応答レベルの最大増進が観察されたので特に好ましい。さらにまた、該強化作用は貯蔵中にも保たれ得る。

#### 【0053】

ある実施態様にしたがえば、工程（a）で、サンプルは、抗原及び非還元糖を含む組成物と接触される。サンプルが全血サンプルである、ある実施態様にしたがえば、該組成物は抗凝固剤（好ましくはヘパリン）を追加されて含む。ある実施態様にしたがえば、抗原、非還元糖及び場合によって抗凝固剤を含む組成物はサンプル収集容器に含まれる。本明細書に開示するように、そのようなサンプル収集容器は、例えば真空血液収集容器であり得る。ある実施態様にしたがえば、組成物は噴霧乾燥組成物である。適切な実施態様は本明細書に記載されている。

ある実施態様にしたがえば、サンプルは以下の特徴の1つ以上を有する：

- i) サンプルはヒト対象動物から入手された；
- ii) サンプルは免疫抑制又は免疫不全のヒト対象動物から入手された；
- iii) サンプルは、NK細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ及び単球から成る群から選択される免疫細胞を含む；及び/又は

10

20

30

40

50

iv) サンプルは全血である。

【0054】

ある実施態様にしたがえば、抗原は、ペプチド、タンパク質（糖タンパク質、リンタンパク質及びリン脂質タンパク質を含む）、炭水化物、リン脂質、及び前述のフラグメントから成る群から選択され、好ましくは1つ以上のペプチドによって提供される。

ある実施態様にしたがえば、2つ以上の異なる抗原が工程(a)で用いられ、及び/又は2つ以上の異なるエフェクター分子が工程(b)で検出される。

ある実施態様にしたがえば、5から100アミノ酸又は7から50アミノ酸から選択される長さを有する1つ以上のペプチドが抗原として用いられる。ある有益な実施態様にしたがえば、抗原は、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞によって認識される1つ以上のペプチドによって提供される。好ましくはこの実施態様では、抗原は、15アミノ酸未満の長さを有する、好ましくは7-14アミノ酸から選択される長さを有する1つ以上のペプチドによって提供される。対応するペプチドの詳細は上記に記載されており、上記の開示を参照できる。

10

ある実施態様にしたがえば、抗原は少なくとも2つのペプチドセットによって提供され、第一のセットは長さが約7から14アミノ酸残基の少なくとも1つのペプチドを含み、第二のセットは15アミノ酸残基以上の少なくとも1つのペプチドを含み、前記ペプチドはタンパク質抗原の全部又は部分を包含する。対応するペプチドセットの詳細は上記に記載されており、上記の開示を参照できる。

有益な実施態様にしたがえば、抗原は1つ以上の合成ペプチドによって提供される。該ペプチドの詳細は上記に記載されており、対応する開示を参照できる。

20

【0055】

ある実施態様にしたがえば、サンプルは、該細胞媒介免疫応答が試験されようとしている疾患又は症状に付随しているか又は前記を表象する抗原と接触される。有益な実施態様にしたがえば、該抗原は、疾患特異的抗原、特に病原体特異的抗原である。例えば、該抗原は、ある病態に付随する病原体に由来する抗原から誘導され、したがって前記と交差反応し得るか、又は癌に付随する腫瘍関連抗原である。上記に記載したように、該病原体は細菌、ウイルス、寄生生物、酵母又はカビであり得る。非限定的な例が以下に記載されるであろう。例えば、細菌は、グラム陽性及びグラム陰性微生物、特にマイコバクテリウム種（例えばヒト型結核菌）、スタフィロコッカス種、ストレプトコッカス種、大腸菌、サルモネラ種、クロストリジウム種、シゲラ種、プロテウス種、バシルス種、ヘモフィルス種、及びボレリア種から選択できる。ウイルスは、肝炎ウイルス（例えばB型肝炎ウイルス及びC型肝炎ウイルス）、ヘルペスウイルス、CMVウイルス及びヒト免疫不全ウイルス（HIV）から選択できる。寄生生物は、プラスモジウム種、白癬、及び肝臓寄生生物から選択できる。

30

ある実施態様にしたがえば、該抗原は、ウイルス（好ましくはサイトメガロウイルス（CMV））に由来するか又は前記に特異的である。好ましくは、前記抗原は、7から14アミノ酸残基、7から13アミノ酸残基、又は8から12アミノ酸残基の長さを有する1つ以上のペプチドによって提供される。上記に記載したように、該1つ以上のペプチドは合成ペプチドでもよい。

【0056】

40

ある実施態様にしたがえば、工程(b)で検出される免疫エフェクター分子は1つ以上の以下の特徴を有する：

i) サイトカインである；

ii) ケモカインである；

iii) 抗原による細胞の活性化、刺激又は再刺激に反応して生成される；

iv) インターロイキン、腫瘍壊死因子アルファ（TNF- $\alpha$ ）、軽質転換増殖因子ベータ（TGFB- $\beta$ ）、コロニー刺激因子（CSF）、例えば顆粒球（G）-CSF又は顆粒球マクロファージ（GM-CSF）、補体成分5a（C5a）、Gro $\alpha$ （CXCL1）、sICAM-1（CD54）、IP-10（CXCL10）、I-TAC（CXCL11）、MCP-1（CCL2）、MIF（GIF）、MIP-1 $\alpha$ （CCL3）、MIP-1 $\beta$ （CCL4）、セルペンE1（PAI-1）、RANTES（CCL5）又はMIG（CXCL9）から成る群から選択される；及び/又

50

は

v) 免疫エフェクター分子はIFN-ガンマである。

該方法のある実施態様にしたがえば、免疫エフェクター分子の存在又はレベルは、当該免疫エフェクター分子を基準にして決定されるか、又は当該免疫エフェクター分子のRNA発現レベルを基準にして決定される。適切な実施態様は上記に記載した。

【0057】

ある実施態様にしたがえば、前述の実施態様のいずれかの方法は、病原性因子による感染、自己免疫疾患、癌、炎症症状、有害因子への曝露、治療薬剤への応答、免疫不全及び免疫抑制から成る群から選択される疾患又は症状の有無、レベル又は病期の追跡監視又は決定のためである。好ましくは、細胞媒介免疫応答の規模は病態の病期、進行及び/又は重篤度と相関する。ある実施態様にしたがえば、前述の実施態様のいずれかの方法は、疾患、感染、及び/又は治療法（特に免疫療法又は免疫抑制剤による治療）に対する応答の検出又は追跡監視のためである。

10

ある実施態様にしたがえば、前述の実施態様のいずれかの方法は、(a) ヒト対象動物から入手した全血サンプルを少なくとも1つのペプチド抗原及び少なくとも1つの非還元二糖類（好ましくはトレハロース又はシュクロース）を含む組成物と接触させることによりインキュベーション組成物を提供し、さらに該インキュベーション組成物を少なくとも2時間インキュベートする工程；及び(b) 該抗原による刺激のために放出されるIFN-ガンマの存在又はレベルを測定する工程を含み、ここで、検出されるIFN-ガンマの存在又は量は該ヒト対象動物の細胞媒介免疫応答性のレベルの指標である。

20

ある実施態様にしたがえば、前述の実施態様のいずれかの方法は、(c) 決定された免疫エフェクター分子レベル又は前記から誘導された値を参照レベルと比較する工程を含む。

【0058】

さらにまた本開示は、病原性感染症、自己免疫異常若しくは癌、又はそのような症状若しくは異常を進行させる傾向を有する対象動物を治療する方法を提供し、前記方法は、本発明の第一の特徴の細胞媒介免疫応答活性を測定する方法を実施する工程、及び続いて該症状又は異常を治療する工程を含み、ここで、決定された免疫エフェクター分子の存在又はレベルは対象動物の細胞媒介免疫応答性のレベルの指標であり、前記免疫応答性のレベルは該症状又は異常の存在、レベル又は病期の指標である。第一の特徴の方法の詳細は上記に記載されており、上記開示を参照できる。

30

【0059】

< 組成物、キット及び使用 >

第二の特徴にしたがえば、本発明はサンプルで細胞媒介免疫応答を誘発する組成物を提供し、前記組成物は、a) 少なくとも1つの単離抗原；b) 少なくとも1つの非還元糖；c) 場合によって少なくとも1つの抗凝固剤を含む。

該組成物、組成物の形態、適切な抗原、非還元糖及び抗凝固剤に関する詳細は、本発明の方法と一緒に上記に記載されており、上記開示を参照できる。そのような組成物は、例えば第一の特徴の方法で用いることができる。適切な適用（使用/目的を含む）、そのような組成物を用いて分析できる疾患及び症状、したがって前記組成物の適切な使用は上記に詳細に記載されており、上記開示を参照できる。第二の特徴の組成物は、上記記載の方法、適用及び使用で用いるために特に適切である。ある実施態様にしたがえば、該組成物は単純糖を含まない。ある実施態様にしたがえば、該組成物は還元糖を含まない。好ましくは、該組成物は、半液状、ゲル様又は固体状組成物である。好ましくは、前記は乾燥組成物である。ある実施態様にしたがえば、該組成物は噴霧乾燥組成物である。

40

【0060】

有益な非限定的実施態様を再度下記に記載する。

非還元糖は、第一の特徴の方法と一緒に上記に記載した特徴を有し、対応する開示を参照できる（前記開示はここでも当てはまる）。上記に記載したように、非還元糖は抗原の安定化剤としては用いられないが、応答レベルの増進に用いられる。実施例に示すように

50

、非還元糖（例えばトレハロース、マンニトール、シュクロース及びラフィノース）は応答レベルを増進させる。ある実施態様にしたがえば、非還元糖は非還元二糖類である。還元二糖類はトレハロース及びシュクロースから選択できる。第二の特徴の組成物中の非還元糖の濃度は、ある実施態様にしたがえば、前記組成物を目的の量のサンプルと接触させたときに、得られたインキュベーション組成物が少なくとも1.5mg/mL、好ましくは少なくとも2mg/mLの濃度の非還元糖を含むものである。インキュベーション組成物中の非還元糖の適切な濃度範囲もまた、第一の特徴の方法と一緒に上記に記載されており、上記開示を参照できる。適切で好ましいサンプル材料もまた第一の特徴の方法と一緒に上記に記載され、上記開示を参照できる。ある実施態様にしたがえば、サンプルは以下の特徴の1つ以上を有する：

10

- i) サンプルはヒト対象動物から入手された；
- ii) サンプルは免疫抑制又は免疫不全のヒト対象動物から入手された；
- iii) サンプルは、NK細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ及び単球から成る群から選択される免疫細胞を含む；及び/又は
- iv) サンプルは全血である。

#### 【0061】

ある実施態様にしたがえば、組成物中に含まれる抗原は、ペプチド、タンパク質（糖タンパク質、リンタンパク質及びリン脂質タンパク質を含む）、炭水化物、リン脂質、及び前述のフラグメントから成る群から選択され、好ましくは1つ以上のペプチドによって提供される。

20

ある実施態様にしたがえば、組成物は2つ以上の異なる抗原を含む。

ある実施態様にしたがえば、組成物は1つ以上のペプチドを抗原として含み、該1つ以上のペプチドは5から100アミノ酸又は7から50アミノ酸から選択される長さを有する。ある有益な実施態様にしたがえば、組成物は抗原として1つ以上のペプチドを含み、該ペプチドはCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞によって認識される。好ましくはこの実施態様では、抗原は、15アミノ酸未満の長さを有する、好ましくは7 - 14アミノ酸から選択される長さを有する1つ以上のペプチドによって提供される。対応するペプチドの詳細は、第一の特徴の方法と一緒に上記に記載されており、上記の開示を参照できる。

ある実施態様にしたがえば、組成物は、少なくとも2つのペプチドセットによって提供される抗原を含み、第一のセットは長さが約7から14アミノ酸残基の少なくとも1つのペプチドを含み、第二のセットは15アミノ酸残基以上の少なくとも1つのペプチドを含み、前記ペプチドはタンパク質抗原の全部又は部分を包含する。対応するペプチドセットの詳細は第一の特徴の方法と一緒に上記に記載されており、上記の開示を参照できる。

30

#### 【0062】

有益な実施態様にしたがえば、組成物は、1つ以上の合成ペプチドによって提供される抗原を含む。該ペプチドの詳細は上記に記載されており、対応する開示を参照できる。

ある実施態様にしたがえば、組成物は、細胞媒介免疫応答を試験しようとする疾患又は症状に付随するか、又は前記を表象する抗原を含む。

有益な実施態様にしたがえば、組成物に含まれる抗原は疾患特異的抗原、特に病原体特異的抗原である。例えば、該抗原は、ある病態に付随する病原体に由来する抗原から誘導され、したがって前記と交差反応し得るか、又は癌に付随する腫瘍関連抗原である。上記に記載したように、該病原体は細菌、ウイルス、寄生生物、酵母又はカビであり得る。非限定的な例が以下に記載されるであろう。例えば、細菌は、グラム陽性及びグラム陰性微生物、特にマイコバクテリウム種（例えばヒト型結核菌）、スタフィロコッカス種、ストレプトコッカス種、大腸菌、サルモネラ種、クロストリジウム種、シゲラ種、プロテウス種、バシルス種、ヘモフィルス種、及びボレリア種から選択できる。ウイルスは、肝炎ウイルス（例えばB型肝炎ウイルス及びC型肝炎ウイルス）、ヘルペスウイルス、CMVウイルス及びヒト免疫不全ウイルス（HIV）から選択できる。寄生生物は、プラスモジウム種、白癬、及び肝臓寄生生物から選択できる。

40

#### 【0063】

50

ある実施態様にしたがえば、組成物は、ウイルス（例えばサイトメガロウイルス（CMV））に由来するか又は前記に特異的である抗原を含む。好ましくは、前記抗原は、7から14アミノ酸残基、7から13アミノ酸残基、又は8から12アミノ酸残基の長さを有する1つ以上のペプチドによって提供される。上記に記載したように、該1つ以上のペプチドは合成ペプチドでもよい。

組成物はサンプル収集容器に含まれ得る。そのような容器の適切で有益な実施態様（例えば真空血液収集容器）は本明細書に記載され、対応する開示を参照できる。

本発明で提供されるものはまたインキュベーション組成物であり、前記は、少なくとも1つの単離抗原、少なくとも1つの非還元糖、抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を生成できる免疫細胞（好ましくはTリンパ球）、及び場合によって少なくとも1つの抗凝固剤を含む。好ましくは、インキュベーション組成物は全血サンプルから調製されたので、全血サンプルを含む。ある実施態様にしたがえば、インキュベーション組成物は、第二の特徴の組成物をサンプルと接触させることによって調製された。適切で好ましいサンプル材料は、第一の特徴の方法と一緒に上記に記載されており、上記開示を参照できる。ある実施態様にしたがえば、サンプルは以下の特徴の1つ以上を有する：

- i) サンプルはヒト対象動物から入手された；
- ii) サンプルは免疫抑制又は免疫不全のヒト対象動物から入手された；
- iii) サンプルは、NK細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ及び単球から成る群から選択される免疫細胞を含む；及び/又は
- iv) サンプルは全血である。

#### 【0064】

好ましくは、インキュベーション組成物は、本発明の第二の特徴の組成物を、対象動物から入手した（好ましくはヒトから入手した）全血サンプルと接触させることによって入手される。第二の特徴の組成物、インキュベーション組成物、その調製、適切な抗原、非還元糖及び抗凝固剤に関する詳細は、本発明の方法及び第二の特徴の組成物と一緒に上記に記載されており、上記開示を参照できる。抗凝固剤は好ましくはヘパリンである。ある実施態様にしたがえば、インキュベーション組成物は、非還元糖を少なくとも1.5mg/mL、好ましくは少なくとも2mg/mLの濃度で含む。インキュベーション組成物中の非還元糖の適切な濃度範囲もまた第一の特徴の方法と一緒に上記に記載され、上記開示を参照できる。ある実施態様にしたがえば、非還元糖は、トレハロース、マンニトール、シュクロース及びラフィノースから選択される。上記に記載したように、有益な実施態様にしたがえば、非還元糖は非還元二糖類であり、好ましくはトレハロース及びシュクロースから選択される。

提供されるものはまたサンプル収集容器、特にサンプル収集チューブであり、前記は以下を含む対応する組成物を含む：

- a) 少なくとも1つの単離抗原、
- b) 少なくとも1つの非還元糖、
- c) 場合によって少なくとも1つの抗凝固剤。

#### 【0065】

サンプル収集容器に含まれる組成物は、好ましくは第二の特徴の組成物である。組成物、適切な抗原、非還元糖及び抗凝固剤に関する詳細は上記に記載されており、上記開示を参照できる。そのようなサンプル収集容器を例えば第一の特徴の方法で用いることができる。適切な適用（使用/目的を含む）、そのようなサンプル収集容器を用いて分析できる疾患及び症状は上記に詳細に記載されており、上記開示を参照できる。第三の特徴のサンプル収集容器は、上記に記載した方法、適用及び使用で用いるために特に適切である。好ましくは、組成物は、好ましくは真空血液収集チューブである該容器の内側に噴霧される。そのような準備不要の収集容器を本発明の方法で用いることによって、当該方法の条件が最適化及び標準化され、取り扱いが単純化される。

#### 【0066】

本発明の方法は、好ましくはキットを用いて実施され、前記キットは当該方法の工程を

実行するために必要な材料を提供する。そのようなキットは、好ましくは当該方法が最適化された条件下で実施され、それによって種々のサンプル若しくは患者から又は様々な医師によって入手される結果が互いに比較可能であることを担保する標準化された材料を含む。したがって、第四の特徴では、本開示はまた対象動物で細胞媒介免疫応答活性を測定するキットを提供し、前記キットは、少なくとも1つの抗原、少なくとも1つの非還元糖、少なくとも1つのサンプル収集容器、及び少なくとも1つの免疫エフェクター分子を検出する少なくとも1つの検出手段を含む。好ましくは、抗原及び非還元糖は単一組成物の形態で提供される。この目的のために、本発明の第二の特徴の組成物を用いることができ、前記組成物の詳細について上記開示を参照できる。該組成物、抗原及び非還元糖に関する詳細はまた本発明の方法及び組成物と一緒に上記に記載されており、上記開示を参照できる。ある実施態様にしたがえば、該キットは、抗原及び非還元糖を含む組成物を含むサンプル収集容器（例えば血液収集チューブ）を含む。好ましくは、組成物は抗凝固剤（例えばヘパリン）を追加されて含む。記載したように、サンプル収集容器に含まれる組成物は第二の特徴の組成物であり得る。好ましくは、検出手段は免疫検出試薬（例えば標識抗体）である。しかしながら、mRNA発現レベルの検出を基準にするアッセイのためには、検出手段は、検出されるべき免疫エフェクター分子に特異的なプライマー及び/又はプローブによって提供され得る。適切なアッセイ及び検出手段は当業者に公知であり、前記もまた上記に記載した。

10

#### 【0067】

さらに別の特徴にしたがえば、本発明は、細胞媒介免疫応答活性を測定する免疫学的アッセイにおける非還元糖の使用に関し、ここで、サンプルと抗原とのインキュベーション中に非還元糖を添加することによって、前記アッセイで被検抗原に反応する免疫細胞の免疫エフェクター分子の放出が増進される。

20

非還元糖、好ましい濃度、免疫学的アッセイ及び医療分野におけるその適用、適切で好ましい抗原、免疫エフェクター分子並びに免疫細胞に関する詳細は、本発明の方法と一緒に上記に記載されており、上記の開示を参照できる。非還元糖は下記特徴の1つ以上を有することができる：

- i) 非還元糖は二糖類である、
- ii) 非還元糖はトレハロース及びシュクロースから選択される、
- iii) 非還元糖は、試験されるべきサンプル及び抗原を含むインキュベーション組成物中で少なくとも1mg/mL、好ましくは2mg/mLの濃度で用いられる、及び/又は
- iv) 非還元糖は、試験されるべき抗原及び場合によって抗凝固剤を追加されて含む組成物の形態で提供される。

30

ある実施態様にしたがえば、非還元糖はトレハロース、マンニトール、シュクロース及びラフィノースから選択される。

#### 【0068】

細胞媒介免疫の決定又は追跡監視のために本明細書に記載した非還元糖（例えばトレハロース）をアッセイで使用することは顕著な利点を有する。上記に記載したように、好ましくは、非還元糖は、サンプルと接触される単一組成物の形態で抗原と一緒に提供される。ある実施態様にしたがえば、非還元糖はインキュベーションの間に添加されるか、及び/又は非還元糖及び抗原を含む組成物に含まれる。上記に記載したように、非還元糖は抗原の安定化剤としては用いられない。有益な実施態様にしたがえば、抗原は、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞によって認識される1つ以上のペプチド（好ましくは合成ペプチド）によって提供される。好ましくは、この実施態様では、抗原は、15アミノ酸未満の長さを有する、好ましくは7-14アミノ酸から選択される長さを有する1つ以上のペプチド（好ましくは合成ペプチド）によって提供される。

40

#### 【0069】

さらに別の特徴にしたがえば、本開示は、細胞媒介免疫応答活性を測定するアッセイにおける、本発明の第二の特徴の組成物、本発明の第三の特徴のサンプル収集容器、及び/又は本発明の第四の特徴のキットの使用に関する。適切で好ましい使用及び適用に関する詳細

50

は上記に記載されており、上記開示を参照できる。ある実施態様にしたがえば、アッセイは、以下から成る群から選択される疾患又は症状の有無、レベル又は病期を追跡監視又は決定するためにある：病原因子による感染、自己免疫疾患、癌、炎症症状、有害因子への曝露、治療薬剤への応答、免疫不全及び免疫抑制。ある実施態様にしたがえば、アッセイは、疾患、感染、及び/又は治療法（特に免疫療法又は免疫抑制剤による治療法）への応答を検出又は追跡監視するためにある。ある実施態様にしたがえば、本発明の第二の特徴の組成物、本発明の第三の特徴のサンプル収集容器、及び/又は本発明の第四のキットは、上記及び特許請求の範囲で詳細に記載されている第一の特徴の方法で用いられる。

本発明は、本明細書に開示された例示的な方法及び材料に限定されない。本明細書に記載する数字で表された範囲は当該範囲を規定する一切の数を含む。本明細書で提供する題目は本発明の多様な特徴又は実施態様を制限せず、前記は本明細書を全体として参照することによって直ちに有用であり得る。ある実施態様にしたがえば、方法の場合にある種の工程を含むと、又は例えば組成物、溶液及び/又は混合物の場合にある種の成分を含むと本明細書に記載される要旨や主題は、対応する工程又は成分から成る要旨や主題に関連する。本明細書に記載される好ましい実施態様を選択しそれらを組み合わせることが所望され、好ましい実施態様のそれぞれの組み合わせから生じる具体的な要旨や主題もまた本開示に属する。

本発明をこれから下記の非限定的な実施例によってさらに詳細に例示する。

#### 【実施例1】

##### 【0070】

< エプスタイン-バーウイルスアッセイの感度に対するトレハロースの影響 >

エプスタイン-バーウイルスのモデル抗原EBNA-1に対する応答を測定するQuant iFERON技術を用いる調査を実施して、インキュベーション混合物への非還元糖の添加により誘発されるアッセイ感度の増進を評価した。簡単に記せば、増/減3濃度のトレハロース溶液（0.5、1.0又は2.0mg/mLトレハロース）の血液収集チューブにEBNA-1ペプチドを添加した。抗EBV細胞性免疫応答を測定するQuant iFERONアッセイを製造業者の指示にしたがって実施した。IFN-ガンマ応答をトレハロース濃度に応じて決定及び比較した。IFN-ガンマ応答の増進がトレハロースの濃度増加とともに観察された。このアッセイでは2mg/mLのトレハロース濃度が最良の結果を提供した。

これらの実験は、非還元糖（例えばトレハロース）の全血アッセイへの添加は、細胞媒介免疫応答アッセイにおけるIFN-ガンマ応答の顕著な増進をもたらすことを示している。非還元糖の添加によって誘発されるIFN-ガンマ応答の増進により、アッセイの感度が強化される。

#### 【実施例2】

##### 【0071】

< 従来技術のアッセイの貯蔵安定性 >

本実施例では、CMVに対する細胞媒介免疫応答試験を実施し、アッセイ成分の貯蔵安定性を分析した。抗原として、サイトメガロ関連抗原由来の合成ペプチド（長さが8-12アミノ酸）を用いた。CMV関連合成ペプチドを単純糖（グルコース）含有溶液中で処方し、血液収集チューブの内側に噴霧して乾燥させた。したがって、抗原及び単純糖は一組成物中に含まれていた。血液収集チューブ中に含まれる前記組成物の安定性試験は、アッセイ活性は室温で貯蔵される時間とともに低下することを示した。さらにまた、抗原及びグルコースを含む噴霧乾燥組成物を含む血液収集装置を、3週間（21日）を超える期間55 で貯蔵したとき、CMV装置のアッセイ活性は失われた。したがって、対応する組成物（したがって対応する組成物を含む血液収集チューブ）は、貯蔵安定性を欠くために準備不要キット成分として使用するには不適切であった。組成物からグルコースを除去することによって該アッセイの安定性及び機能は回復した。したがって、組成物中に抗原と一緒に単純糖を含むことは適切ではなかった。それどころか、アッセイ感度を増進させるためには、単純糖は、インキュベーション組成物の調製時にサンプルとは別個に添加されねばならなかった。

10

20

30

40

50

対照的に、抗原及び本明細書に教示した非還元糖を含む組成物は、延長させた貯蔵期間でもまた増進したアッセイ感度を維持することができる。

これらの結果はまたさらに別の実験によって確認された。グルコースを含む、又は含まないCMVチューブを、4、22、37及び55で3週間貯蔵し、続いて4人の反応性ドナー及び1人の非反応性ドナー由来の血液サンプルを用いて試験した。表1は反応性ドナーを用いて得られた平均結果を示す。表示の温度で、グルコースを含むCMVチューブは、4又は22で保存されたチューブよりも低い反応性を示し、さらに、CMVチューブの調製に用いた液状処方物（参照標準物）と比較して応答の顕著な低下を示す。対照的に、グルコースを欠くチューブは対応する反応の低下を示さなかった。

【0072】

10

表1：貯蔵時のグルコースの影響（保持（平均IU/mL）の倍数差異を示す）

	55°C	37°C	22°C	4°C
グルコース含有チューブ	0.58	0.75	1.48	1.34
グルコース非含有チューブ	0.97	0.91	1.01	1.21

【実施例3】

【0073】

< QFN-CMVチューブでのIFN-ガンマ応答におけるトレハロース添加の影響 >

Quant iFERON (QFN) CMVは、サイトメガロウイルス由来抗原に対するT細胞免疫記憶を追跡監視するCEの登録アッセイである。QFN-CMV血液チューブは、CD8<sup>+</sup>T細胞を特異的に活性化してインターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）を生成するように設計されたペプチドを含む。これらのチューブはペプチド及びヘパリンのみを含み、糖分子は全く添加されていない。

20

本実験は、非還元糖（トレハロース）をQFN-CMVチューブに添加したときのIFN-ガンマ応答に対する影響を調査することを目的とした。

0、1、5又は10mg/mLのトレハロース水溶液をQFN-CMV血液収集チューブに添加した。続いて、既知の抗CMV T細胞応答を有する17人の健康なドナーから1mLの血液を4つのチューブの各々に添加し、さらにその他にゼロチューブ及びマイトジェンチューブをコントロールとして用いた。QFNアッセイをパッケージ挿入物にしたがって実施した。全ての値からゼロチューブの値を差し引いたIFN-ガンマレベル（IU/mL）を対応するQFN-CMV + 0mg/mLトレハロース（未処理コントロール）に対して標準化して、‘倍数変化’単位を創出し、応答の規模におけるドナー間の多様性を管理した。検出可能な抗CMV免疫応答をもたない健康なドナーはトレハロースによる非特異的IFN-ガンマ誘発に対するコントロールに含めた。

30

トレハロースの添加は、IFN-ガンマの平均レベルの濃度依存増加をもたらした（適合する未処理コントロールに対するIFN-ガンマ倍数変化として表現）。5及び10mg/mLのトレハロースの添加により顕著な作用の増進が観察された（Dunns多重比較検定によるFriedmans検定）。結果は図1に示されている。CMV陰性コントロールドナーにおけるIFN-ガンマのバックグラウンドレベルには有意な増加は観察されなかった（データは示されていない）。

40

QFNアッセイへのトレハロースの添加は、バックグラウンドのIFN-ガンマレベルを非特異的に増加させることなく、血液収集チューブに含まれる特異的抗原に反応して生成されるIFN-ガンマレベルを顕著に増加させる。

【実施例4】

【0074】

< QFN-TBチューブでのIFN-ガンマ応答におけるトレハロースの添加の影響 >

ペプチド特異的細胞性免疫を評価するアッセイ（例えばQuant iFERON (QFN) アッセイ）への非還元糖トレハロースの添加は当該試験の定量的な結果を強化するという観察を確認するために、非還元糖が添加されたQFNチューブを製造した。QFN血液収集チューブは、任意の糖無しに又は非還元糖トレハロースとともにヒト型結核菌（MTB）抗原ESAT-6及びCFP

50

-10由来合成ペプチドを含むように製造された。

MTB感染の証拠がある20人の対象者（QuantiFERONゴールドインチューブアッセイを用いて確認した）の全血を確立されたQuantiFERONプラットフォーム技術を用いて試験したが、ただし上記に記載したQFN TB抗原チューブを用いた（前記QFN TBチューブは非還元糖を含まずに（無糖）又は非還元糖（トレハロース）を含むように製造された）。アッセイは、QFTゴールドパッケージ挿入物にしたがって実施した（前記は確立されたアッセイである）。この一対の臨床的分析では、TB抗原チューブへの非還元糖（トレハロース）の添加は、図2に示すようにアッセイの定量的応答を有意に強化した（ $P=0.0005$ ）。チューブの値（ $y$ 軸）はLog変換IFN-ガンマIU/mL値（ゼロチューブの値が差し引かれている）として示されている。対応のある片側  $t$  検定を実施して、2群間の統計的有意を示した。TB感染対象者で示されたように、当該結果は、トレハロースの添加がインターフェロンガンマ応答を増進することを明瞭に示している。

10

【実施例5】

【0075】

<種々の非還元糖の添加は定量的IFNガンマ応答を増進する>

観察された強化作用はまたさらに別の非還元糖を用いて示された。この実験のために、4つの異なる非還元糖をQFN CMV抗原チューブ及び対応するゼロチューブに添加した。2mg/mLの最終血液濃度を達成するように、シュクロース、トレハロース、マンニトール及びラフィノースの対応するPBS溶液を、5人のドナーから入手した全血に添加した。したがって、QFNアッセイは5人のドナーの血液で非還元糖（シュクロース、トレハロース、マンニトール又はラフィノース）を添加しない（N/S）又は添加したQFN CMVチューブを用いて実施された。アッセイは、QFNパッケージ挿入物にしたがって実施された（前記は確立されたアッセイである）。結果は図3に示されている。x軸は試験条件を示す（図3参照）。バックグラウンド（対応する糖を添加された又は添加されないゼロチューブの値）を対応するCMVチューブから差し引き、非添加チューブに対するIFN-ガンマ値（IU/mL）のパーセンテージ増加（ $y$ 軸）を計算した。結果は、定量的IFN-ガンマ（IU/mL）値によって測定されるように、CMV抗原に対する応答の増進は4つの非還元糖の全てで観察されることを示している。したがって、試験した非還元糖の全てがIFN-ガンマ応答に対して有益な影響を有した。トレハロースにより最高の増進が観察され、マンニトール、シュクロース及びラフィノースがその後続いた。

20

30

【 図 1 】

QFN-CMV応答に対するトレハロース濃度の影響  
(値はCMV応答に対して標準化されている) [n=17]

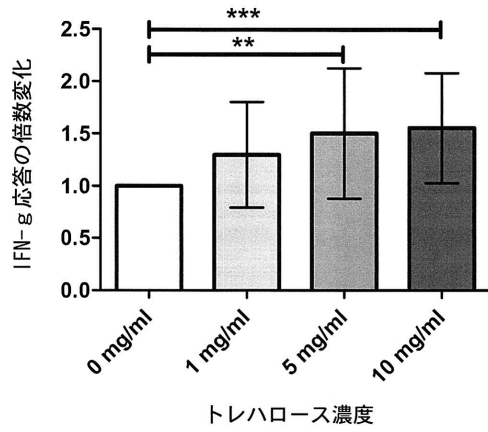


Figure 1

【 図 2 】

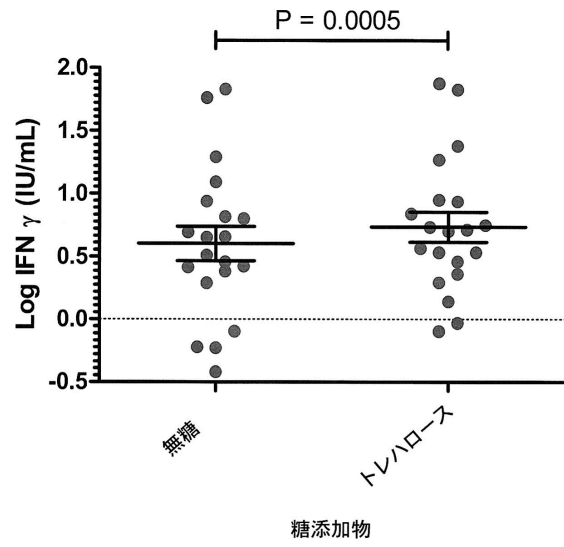


Figure 2

【 図 3 】

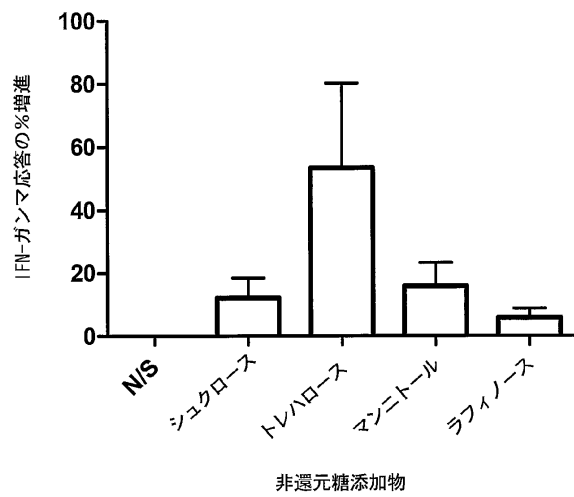


Figure 3

## フロントページの続き

- (74)代理人 100123777  
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100154988  
弁理士 小林 真知
- (72)発明者 ボイル ジェフ  
オーストラリア 3 9 1 2 ヴィクトリア ピアースデイル ダンデノング ヘイスティングス  
ロード 1 9 3 0
- (72)発明者 ナイツ アシュレイ  
オーストラリア 3 1 4 8 ヴィクトリア チャドストーン ダンデノング ロード 1 3 4 1  
チャドストーン センター オフィス タワー 2 レベル 1 セルスティス リミテッド内
- (72)発明者 ムニアン カルメン  
オーストラリア 3 1 4 8 ヴィクトリア チャドストーン ダンデノング ロード 1 3 4 1  
チャドストーン センター オフィス タワー 2 レベル 1 セルスティス リミテッド内

審査官 北田 祐介

- (56)参考文献 国際公開第2012/177970(WO, A1)  
特表2009-510136(JP, A)  
中国特許出願公開第1262131(CN, A)  
特表昭63-500562(JP, A)  
特表2002-508843(JP, A)  
欧州特許出願公開第01529536(EP, A1)  
特表2002-540079(JP, A)  
国際公開第2011/146968(WO, A1)  
特表2011-529171(JP, A)  
特開2009-197030(JP, A)  
特開2010-180228(JP, A)  
特表2005-506512(JP, A)  
特表2010-506911(JP, A)  
特開2008-304476(JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-1/70  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)