

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-501257

(P2005-501257A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 Z N A K	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
// CO 7 K 7/04	CO 7 K 7/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2003-524010 (P2003-524010)	(71) 出願人	500488225
(86) (22) 出願日	平成14年8月27日 (2002.8.27)		アンスティテュ ナシオナル ド ラ サ
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月26日 (2004.2.26)		ント エ ド ラ ルシュルシェ メディ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/002937		カル (アンセルム)
(87) 国際公開番号	W02003/019195		I N S T I T U T N A T I O N A L D
(87) 国際公開日	平成15年3月6日 (2003.3.6)		E L A S A N T E E T D E L A
(31) 優先権主張番号	01/11136		R E C H E R C H E M E D I C A L E
(32) 優先日	平成13年8月27日 (2001.8.27)		(I N S E R M)
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		フランス、エフ-75654 パリ セデ
			ックス 13、リュ ド トルビアク、1
			O 1
			101, rue de Tolbiac,
			F-75654 Paris Cedex
			13 France

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固体担体上に固定されたペプチドを用いる細胞性免疫試験

(57) 【要約】

本発明は、試験される抗原のT細胞エピトープを構成するペプチドの組がその上に固定された固体担体を用いて、細胞性免疫(抗原に対する)を検出する方法、該方法を実行するためのキットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

インビトロで抗原に対する細胞性免疫を検出および/または特徴づけするための、該抗原のTエピトープを構成する少なくとも1つのペプチドが付着した固体担体の使用。

【請求項2】

ペプチドが固体担体に付着していることを特徴とする、個体の末梢血単核細胞中に存在するCD4⁺ Tリンパ球および/またはCD8⁺ Tリンパ球を含む生体試料を、該個体のMHC分子により提示され得る抗原の1つもしくは複数のTエピトープを構成する1つ以上の該ペプチドと接触させ、この接触により活性化されたエフェクターTリンパ球を検出することにより、該抗原に対する該個体の細胞性免疫応答をインビトロで検出および/または特徴づけするための方法。

10

【請求項3】

そのうちの少なくとも1つが個体のMHC分子により提示されることが可能であり、抗原の2つの異なるTエピトープを構成する少なくとも2つのペプチドが、固体担体に付着していることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

ペプチドの混合物が固体担体に付着していることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

固体担体が、ペプチドがマイクロタイトレーションプレートの少なくとも2つの異なるウェルに付着している該プレートからなり、生体試料が少なくとも2つのアリコートに分割され、その各々を該ペプチドの1つと接触させることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

20

【請求項6】

用いられるペプチドが、1つまたは複数のCD4⁺ Tエピトープを構成することを特徴とする、請求項2~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

用いられるペプチドが、1つまたは複数のCD8⁺ Tエピトープを構成することを特徴とする、請求項2~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

- 固体担体に付着し、それぞれが抗原の同定されたTエピトープを構成する、同じ抗原に由来するペプチドの組；および
- 活性化されたエフェクターTリンパ球を検出する手段を含む、請求項2~7のいずれか1項に記載の方法を行うためのキット。

30

【請求項9】

固体担体に付着し、それぞれが抗原の同定されたTエピトープを構成する、同じ抗原に由来するペプチドの組を含み、該組が、CD4⁺ Tエピトープを構成する少なくとも1つのペプチド、およびCD8⁺ Tエピトープを構成する少なくとも1つのペプチドを含む、請求項2~5のいずれか1項に記載の方法を行うためのキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

40

【0001】

本発明は、細胞性免疫を検出するための新規の手段に関する。

【背景技術】**【0002】**

細胞媒介性免疫は、ウイルス、および宿主細胞内で進化することができ、それにより抗体から逃れる、ある種の細菌またはある種の原生動物のような微生物に対する免疫応答において、主要な役割を演じる。これは、移植の拒絶反応および腫瘍の破壊の現象にも含まれる。

【0003】

体液性免疫の場合には、分子エフェクターはBリンパ球により分泌される抗体であるが、

50

細胞性免疫の分子エフェクターはTリンパ球の細胞質膜に固定されたTcR受容体である。

【0004】

TcRによるTエピトープの認識は、抗体によるBエピトープの認識に含まれるものよりも、さらにより複雑な機構を含む。具体的には、TcRは、エピトープが提示細胞の表面におけるMHC(主要組織適合複合体)のクラスIまたはクラスII分子と結合する場合、そのエピトープを構成するペプチドのみを認識する。よってCD4およびCD8 Tリンパ球のTcRは、MHCのクラスII分子およびクラスI分子によりそれぞれ提示されるエピトープを認識する。

【0005】

抗原の「Tエピトープ」は、適切なMHCの関係において、Tリンパ球のTcR受容体により認識され得る、そして該リンパ球の活性化を誘導し得る該抗原のいずれかのペプチド断片として定義される。 10

【0006】

Tエピトープのサイズは、ペプチドを提示するMHC分子のクラスに依存して変動する；クラスI MHC分子により提示されるCD8⁺ Tエピトープは、8~10アミノ酸のサイズであり、クラスII MHC分子により提示されるCD4⁺ Tエピトープは、13~25アミノ酸のサイズである。

【0007】

同じ抗原について、そして同じMHCクラスについては、エピトープの配列は、関係するMHCの対立遺伝子により変動する。

多数の抗原について、種々のクラスII MHCまたはクラスI MHC対立遺伝子に拘束されるTエピトープの多くの種類が同定されており、これらのエピトープの配列は、文献において入手可能である。 20

【0008】

TcR/MHC-結合Tエピトープ相互作用は、T細胞の表面における分子および提示細胞の表面における分子の相互作用に起因する種々の共刺激(costimulation)シグナルの存在下で、リンパ球刺激を誘導し、エフェクターTリンパ球を産生する細胞増殖となる。

【0009】

エフェクターリンパ球は、種々のタイプの免疫応答を定義するそれらのエフェクター機能に従って、種々の集団と一緒にグループ化することができる。これらの集団は、種々の分子(サイトカイン、溶解因子(lytic factors))を分泌するそれらの能力、または特定の分子の組み合わせにより特に区別される。例えば、CD4⁺またはCD8⁺細胞を区別し得るエフェクターリンパ球のうち、サイトカイン、特にインターロイキン2(IL-2)およびガンマインターフェロン(γ -IFN)の分泌を特徴とするTh1およびT1リンパ球、ならびにIL-4、IL-5、IL-6およびIL-10のようなサイトカインを分泌するTh2またはT2細胞が挙げられる。 30

【0010】

免疫原との最初の接触から約1ヶ月後に、かなりを検出し得る体液性免疫とは異なり、細胞媒介性免疫は、この最初の接触後、数日にわたって現れる；次いでこれは、増殖することができ、その後の同じ免疫源の提示の間にエフェクター機能を迅速に獲得することができる記憶Tリンパ球の形態で長期間存続する。

【0011】

よって、細胞性免疫は良好な指標を構成することができ、所定の抗原に対する免疫応答の非常に初期の検出、および関連した免疫応答のタイプの決定をさせる。 40

抗原特異的エフェクターTリンパ球の検出は、例えばワクチンの開発の関係において、種々の研究所で用いられており、免疫エピトープを探索し、免疫原性応答の強度およびタイプを評価する。

【0012】

抗原に対する細胞性免疫を評価するのにますます一般に用いられているアプローチは、該抗原の既知のTエピトープを構成するペプチドを提供し、そしてこれらのペプチドに対するTリンパ球反応性を分析することである。

このアプローチは、細胞媒介性応答を産生する病理を診断または監視するために、理論的には用いることができる。しかしながら、抗原/抗体複合体の形成を実証することにより 50

インビトロで迅速に検出することができる体液性免疫とは異なり、細胞性免疫の検出は、常用の試験の関係において用いることが困難な、面倒な技術の使用を含む。

実際に：

1) TcRによる、試験されるエピトープの認識と、リンパ球の活性化を許容する条件下において、リンパ球に該エピトープを提示し；

2) 活性化されたエフェクターリンパ球を検出することが必要である。

【0013】

最近開発された方法のいくつかは、エフェクター細胞の検出を簡略化することを可能にする。例として、VERSTEEGENら(J. Immunol. Methods、111、25~29、1988)により最初に記載されたELISPOT法は、末梢血細胞のうち存在するエピトープ特異的エフェクターTリンパ球を検出し、特徴づけすることを可能にするが、これはTエピトープに相当するペプチドでの再刺激後に該リンパ球により分泌される因子を検出することによる。

10

【0014】

例えばこの技術は、インフルエンザウイルスのエピトープに特異的なCD8⁺エフェクターTリンパ球を同定する(LALVANIら、J. Exp. Med. 186、859~865、1997)；ワクチン中に用いられている種々のHIV1エピトープに相当するペプチドに対するCD8⁺T応答を分析する(GAHERY-SEGARDら、J. Virol.、74、1694~1703、2000)；ESAT-6抗原のエピトープに特異的なエフェクターTリンパ球を検出することによりマイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mycobacterium tuberculosis)感染の存在を検出する(LALVANIら、Am. J. Respir. Crit. Care Med.、163、824~828、2001)のみに用いられている。

20

【0015】

上記の出版物に記載されたアッセイは、試験されるペプチドのそれぞれの溶液を、末梢血単核細胞(PBMC)のフィコール勾配での分離により得られる懸濁物に添加することにより行われた；これらの条件下では、これらのペプチドが、MHC分子により直接載せられ、リンパ球に提示されることが、実際に知られている。

【0016】

今回、本発明者らは驚くべきことに、個体のTリンパ球を、該Tリンパ球により認識されるエピトープを構成し、固体担体に付着したペプチドと接触させることが、該エピトープに特異的なエフェクターTリンパ球の活性化となることを知った。

30

【0017】

本発明の主題は、インビトロで抗原に対する細胞性免疫を検出および/または特徴づけするための、該抗原のTエピトープを構成する少なくとも1つのペプチドが付着した固体担体の使用である。

【0018】

詳細には、本発明の主題は、ペプチドが固体担体に付着していることを特徴とする、個体の末梢血単核細胞(PBMC)中に存在するCD4⁺Tリンパ球および/またはCD8⁺Tリンパ球を含む生体試料を、該個体のMHC分子により提示され得る抗原の1つもしくは複数のTエピトープを構成する1つ以上の該ペプチドと接触させ、この接触により活性化されたエフェクターTリンパ球を検出することにより、該抗原に対する該個体の細胞性免疫応答をインビトロで検出および/または特徴づけするための方法である。

40

【0019】

生体試料は、精製CD4⁺またはCD8⁺Tリンパ球の調製物からなることができる。また、上記個体からの血液試料より得られたPBMCの調製物からなることもできる；有利には、全血を用いることができる。

【0020】

本発明による方法の好ましい実施形態によると、その少なくとも1つが個体のMHC分子により提示されることが可能であり、上記抗原の2つの異なるTエピトープを構成する少なくとも2つのペプチドが、上記固体担体に付着している。

この実施形態の有利な構成によると、上記ペプチドの混合物が上記固体担体に付着してい

50

る。

この実施形態の他の有利な構成によると、上記固体担体は、上記ペプチドがマイクロタイトレーションプレートの少なくとも2つの異なるウェルに付着している該プレートからなり、生体試料は少なくとも2つのアリコートに分割され、その各々を該ペプチドの1つと接触させる。

【0021】

ペプチドの混合物の使用は、関係する抗原に対する細胞媒介性免疫応答の存在を迅速に検出することを可能にする。種々のペプチドの別々の使用は、この応答の構成要素のよりよい分析を行うことを可能にする。

全ての場合において、用いられるペプチドは、1つもしくは複数のCD4⁺ Tエピトープ、または1つもしくは複数のCD8⁺ Tエピトープを構成する。1つもしくは複数のCD4⁺ Tエピトープ、または1つもしくは複数のCD8⁺ Tエピトープを、別々にまたは混合物として、同時に用いることも可能である。

10

【0022】

本発明による方法の他の実施形態は、従来技術で既知の細胞性免疫応答のインビトロでの検出の方法において用いられるものと同じであることが可能である。

例えば、固体担体に付着したペプチドと試験される生体試料は、ペプチドが液相に存在する従来技術の方法と同じ条件下で接触させる。一般には、この接触は、5%のCO₂の存在下での37 °Cにおける5~20時間のインキュベーションにより行われる。

【0023】

同様に、活性化されたエフェクターTリンパ球の検出は、通常の方法により行うことができる。

20

有利には、これらのリンパ球により分泌される可溶性因子(サイトカインまたは溶解因子)を分析する。例えばIL-2またはIFN- γ を分析することは、Th1またはT1応答の特徴づけを可能にし、IL-4、IL-5、IL-6またはIL-10を分析することは、Th2またはT2応答の特徴づけを可能にする。実質的にCD8⁺ Tリンパ球を特徴づける、ケモカイン(RANTES)のような他の可溶性因子、または溶解機能をもつ分子(パーフォリン/グランザイム)も分析できる。

【0024】

本発明の関係において任意に用いることができる、活性化されたTリンパ球を検出するための他の方法は、例えばサイトカインの細胞内ラベリングである。

30

試験されるペプチドを細胞懸濁物に添加する、従来技術で既知の細胞性免疫の検出のための方法に比べて、本発明による方法は、特に種々のペプチドの並行した使用を含む分析の場合に、マイクロタイトレーションプレートのウェルまたはチューブの列において通常行われるアッセイ手順を、かなり簡略化することを可能にする。

【0025】

詳しくは、従来技術の方法は、プレートの各ウェル中、もしくは列の各チューブ中で、規定されたペプチドまたはペプチドの規定された混合物の試験される細胞への添加を必要とするが、本発明の実行の意味においては、プレートのウェルの各々またはチューブの各々が所望のペプチドまたはペプチドの混合物でコートされた、予め準備したプレートまたはチューブを用いることが可能である。このことは、必要な操作をかなり減少させることを可能にし、よってアッセイを行うのに必要な時間の合計を減少させ、そして誤差の原因を制限することによりその再現性を増大させる。

40

【0026】

さらに、固体担体へのペプチドの付着は、上記ペプチドを安定化し、液状媒体中で迅速に起こる分解からそれらを保護することを可能にする。実例として、ポリスチレンマイクロタイトレーションプレートのウェルへの吸着により付着したペプチドの場合、ペプチドは、20 °Cにおいて少なくとも24時間、4 °Cにおいて少なくとも1週間、-80 °Cのフリーザーにおいて少なくとも15日間、Tリンパ球の特異的活性化のそれらの特性を維持するが、同じペプチドの溶液は、37 °Cにおいて数時間でそれらの特性を失う。

【0027】

50

さらに、本発明は用いられるペプチドの濃度をかなり減少させるという利点を有し、よって費用の大幅な減少を許容する。

【0028】

本発明の主題は、固体担体に付着し、それぞれが抗原のTエピトープを構成する、同じ抗原に由来するペプチドの組を含む、本発明に従って方法を行うためのキットでもある。本発明に従ってキットを製造するために、特に抗原/抗体分析キットに通常用いられるものと同じタイプの固体担体および該担体にペプチドを付着させる方法を用いることができる。

例えば、ポリスチレン、ポリエチレンまたはポリビニルクロライドのようなプラスチック材料からつくられた担体、ニトロセルロースからつくられた担体、ガラスのようなシリカベースの材料でつくられた担体などを用いることができる。

10

【0029】

ペプチドの付着は、それ自体が公知の方法により行うことができる；最も適切な技術の選択は、関係する担体および選択されるペプチドの物理化学的特性に依存する。

例えば、ペプチドを担体上で直接合成すること、または該担体に、予め合成したペプチドを付着させることが可能である。

例えば、ペプチドの付着は、吸着により行うことができる。担体および付着の条件は、もちろん、試験される生体試料の添加および該試料とのインキュベーションの間におけるペプチドの脱着を回避するように選択される。

【0030】

有利には、ペプチドは、直接またはスパーサーアームを介して、共有結合により担体に付着する。この場合、担体の表面はカルボジイミド誘導体、N-ヒドロキシスクシンイミド誘導体、スルホスクシンイミド誘導体などのような剤により活性化することができる。

アビジンでコートした担体に付着したビオチン化ペプチドも、用いることができる。

20

【0031】

担体は、チューブもしくはチューブの組、マイクロタイトレーションプレート、1つ以上の細片、ビーズなどの形態にあることができる。

【0032】

抗原は、特に、感染性微生物(ウイルス、原生動物、細菌)、腫瘍抗原、自己免疫抗原またはアレルギーであることができる。微生物である場合、組を構成するペプチドは、この生物の種々の抗原性タンパク質に由来することができる。

組を構成するペプチドの選択は、関係する抗原、およびキットを用いようとするその使用にももちろん依存する。これらは、関係する抗原のCD4⁺またはCD8⁺ Tエピトープを構成するとして以前に同定されたペプチドである。

30

【0033】

有利には、この組は、異なるMHC対立遺伝子により提示され得るペプチドを含む。これは、CD4⁺ Tエピトープを構成するペプチド、CD8⁺ Tエピトープを構成するペプチドまたはこれらの2つのタイプのエピトープの混合物からなることが可能である。

該組を構成するペプチドは、混合され、混合物の形態で固体担体に付着され得る。固体担体がマイクロタイトレーションプレートまたはチューブの組である場合、マイクロタイトレーションプレートのウェルのうちの1つの内部、またはチューブのうちの1つの内部に付着されている、種々のペプチドまたはペプチドの組み合わせを別々に付着させることができる。

40

【0034】

本発明によるキットは、活性化されたエフェクターTリンパ球を検出するための手段を含むこともできる。これらの手段は、上記リンパ球により産生される可溶性因子を分析するための試薬からなることが可能である。

【0035】

本発明は、例えば：

- 細胞性免疫応答を産生する、種々の病原性の剤での感染の進展をスクリーニングし、そ

50

して監視する関係において、ヒトまたは動物の衛生に用いることができる。例として、HIV (ヒト免疫不全ウイルス) 1および2、FIV (ネコ免疫不全ウイルス)、HTLV-1 (ヒトTリンパ球ウイルスタイプI)、種々のタイプの肝炎のウイルスなどのようなウイルス；トキソプラズマ(*Toxoplasma*)またはプラスモディウム(*Plasmodium*)のような寄生生物；プリオンなどが挙げられる。

- 腫瘍起源の病理の進展をスクリーニングし、そして監視する関係において、ヒトまたは動物の衛生に用いることができる。例としては、黒色腫、乳癌、骨髄性白血病、ヒトパピローマウイルスに関連する子宮頸癌のような、ウイルス感染に関連する癌などが挙げられる。

【0036】

- 自己免疫疾患の進展をスクリーニングし、そして監視する関係において、ヒトまたは動物の衛生に用いることができる。例として、I型糖尿病、多発硬化症などが挙げられる。

- アレルギータイプの疾患の進展をスクリーニングし、そして監視する関係において、ヒトまたは動物の衛生に用いることができる。例として、草、花粉、ある種の医薬製品のようアレルゲンが挙げられる。

【0037】

関係する使用に関わらず、本発明は、細胞媒介性の免疫の検出により、臨床上の徴候の発現前に、また体液性応答の発現前に、病理の発現または進展の非常に初期の診断を許容する。このことは、よりよい治療上のストラテジーを選択し、患者にとっての治療の成功のよりよい機会を与える、より迅速な医療上の決定を行うことを可能にする。

【0038】

本発明は、種々のウイルス病原体に対する特異的な細胞性免疫の特徴づけのためのその実行を説明する、限定しない実施例に言及する以下のさらなる記載により、より明確に理解されるであろう。

【0039】

実施例1：Tエピトープを構成するペプチドの固体担体への付着

3つの異なるウイルス：HIV-1ウイルス(ヒト免疫不全ウイルス)、CMV (サイトメガロウイルス)およびEBVウイルス(エプスタイン - バーウイルス)の既知のCD8⁺エピトープを構成する種々のペプチドを合成した。

【0040】

これらのペプチドは次のごとくである：

HIV-1ウイルス：

gag 77~85 (SLYNTVATL、HLA A2)

GAG 260~268 (EIYKRWIIIL、HLA A2)

Nef 82~91 (KAALDLSHFL、HLA A2)

CMVウイルス：

GB 619~628 (FIAGNSAYEYV、HLA A2)

IEI 378~389 (SDEEEAIVAYTL、HLA B18)

EBVウイルス：

EBNA 3A 379~387 (RPPIFIRRL、HLA B7)

EBNA 3C 163~171 (EGGVGWRHV、HLA B44)。

【0041】

これらのペプチドを、次のプロトコルを用いてポリスチレンプレートのウェルの底に付着させた。

カーボネートバッファ中のペプチド10 μgを、96ウェルのマイクロタイトレーションプレート (ポリスチレンプレート、NUNC MAXISORB)に沈着させた。ペプチドの付着は、周囲温度で2時間の吸着により行う。付着しなかったペプチドをPBS で2回洗浄することにより除去する。

【0042】

実施例2：HIV-1に対する細胞性免疫の特徴づけ

10

20

30

40

50

HIV-1に対して血清陽性の患者(HLA-A2)の血液から精製したPBMCを、次のようにして試験した：

1) リンパ球の活性化：

通常培地(RPMI、10%のBSA)中の細胞懸濁物200 μ l (10^5 細胞)を、上記の実施例1に記載のようにしてHIV-1ペプチドが付着した各ウェル中で沈着させる。

ポジティブコントロールとして、通常のELISPOT法によりアッセイを行った：同じ患者からのPBMCの懸濁物200 μ l (10^5 細胞)を、NUNC 96ウェルプレート(ペプチドが付着したものと同一)のウェル中に沈着させ、通常培地の溶液中のgag 77~85、GAG 260~268またはNef 82~91ペプチド10 μ gと混合する。

【0043】

2つのアッセイにおいて、コントロールとして、ペプチドなしのウェル中にPBMCを沈着させた。

プレートを5%のCO₂存在下のインキュベーター中で37 $^{\circ}$ Cにおいて一晩インキュベートする。

【0044】

2) 活性化されたCD8⁺ Tリンパ球の選択：

次の日、活性化されたCD8⁺細胞の存在を、次のプロトコルに従って明らかにする：

96ウェルのニトロセルロースプレート(MILLIPORE)を、カーボネートバッファー中に1 μ g/mlに希釈した抗-IFN抗体(MABTECH、1-D1K) 100 μ l/ウェルを用いて、37 $^{\circ}$ Cにおいて2時間コートした。

次いでプレートをPBS中に洗浄し、100 μ l/ウェルの割合でRPMI、10% FCSを用いて、37 $^{\circ}$ Cにおいて2時間飽和させた。

【0045】

上記の1)に記載のようにして活性化した細胞懸濁物200 μ lを、このプレートに沈着させる。インキュベーションを37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で5時間行う。

1 \times PBS中での1回の洗浄、および0.05% TWEENを含むPBS中での5回の洗浄の後、100 μ l/ウェルの抗-IFNビオチン抗体(MABTECH、7-B6-1-ビオチン)を1 μ g/mlで添加し、インキュベーションを周囲温度にて2時間行う。

【0046】

プレートをPBS-0.05% TWEEN中に5回洗浄する。

PBS-0.05% TWEEN、1% BSA中に1/5000まで希釈したエクストラアビジン-AKP (SIGMA、No. 2636) 100 μ l/ウェルを添加する。インキュベーションを、周囲温度にて1時間行う。プレートを再びPBS-0.05% TWEEN中に5回洗浄する。

検出を、BIORADキット(No. 170-6432)を用いて行う。

半時間~1時間後、プレートを水で洗浄することにより反応を停止する。プレートを空気乾燥させる。

【0047】

結果を図1に示す。

A：通常のELISPOTアッセイ；

B：固体担体に付着したペプチドを用いて行ったアッセイ。

両方の場合において、gag 77~85ペプチドだけが-IFNを分泌するCD8⁺エフェクターTリンパ球の活性化を誘導する。これらの結果は、固体担体に付着したペプチドの使用が、液相に提示されたペプチドのものと少なくとも同程度に、エフェクター細胞の活性化の誘導について効果的であることを示す。

【0048】

実施例3：CMVに対する細胞性免疫の特徴づけ

患者(HLA-A2、B18)の血液から精製したPBMCを、次のようにして試験した。

通常培地の懸濁物中の2 $\times 10^5$ 細胞を、上記の実施例1に記載のようにして、CMV ペプチドが付着した各ウェル中に沈着させた。

ポジティブコントロールとして、通常のELISPOT法によりアッセイを行った：同じ患者か

10

20

30

40

50

らのPBMCの懸濁物の 2×10^5 細胞を、96ウェルプレート(NUNC) (ペプチドが付着したものと
同じ)のウェルに沈着させ、GB 619~628またはIEI 378~389ペプチド $10 \mu\text{g}$ と混合する。

【0049】

2つのアッセイにおいて、コントロールとして、PBMCをペプチドなしのウェル中に沈着させ
た。

上記の実施例2に記載のようにしてプレートのインキュベーションと検出を行う。

結果を図2に示す。

A: 通常のELISPOTアッセイ;

B: 固体担体に付着したペプチドを用いて行ったアッセイ。

両方の場合において、GB 619~628ペプチドだけが γ -IFNを分泌する CD8^+ エフェクターTリン
パ球の活性化を誘導する。これらの結果は、HIV-1ペプチドの場合に観察されたことを
確かにする。

【0050】

実施例4: 固体担体に付着したペプチドの保存

上記の実施例1に記載のようにしてウェルにEBVペプチドが付着したプレートを:

A) 20℃で24時間;

B) 4℃で7日間;

C) -80℃で15日間

保存した。

通常培地の懸濁液中に患者(HLA B7/B44)の血液から精製したPBMC 2×10^5 を、これらのプ
レートの各ウェル中に沈着させ、上記の実施例3に記載のようにして試験する。

【0051】

結果を図3に示す。

A: 20℃で24時間の保存;

B: 4℃で7日間の保存;

C: -80℃で15日間の保存。

これらの結果は、保存条件が、固体担体に付着したペプチドのエフェクター細胞 - 活性化
特性を変更しないことを示す。

【0052】

実施例5: 固体担体に付着したペプチドの混合物を用いた、EBVに対する細胞性免疫の検出
EBVの公知の CD8^+ Tエピトープを構成する次のペプチド:

EBNA 3C 163~171 (EGGVGWRHV、B44)、

EBNA 3A 603~611 (RLRAEAGVK、A3)、

EBNA 4 416~424 (IVTDFSVIK、A11)、

EBNA 3C 881~891 (QPRAPIRPIPT、B7)

EBNA 3A 379~387 (RPPIFIRRL、B7)、および

EBNA 6 290~299 (EENLLDFVRF、B44)、

の混合物を、次のプロトコルに従って、ポリスチレンチューブの内壁に付着させた:

カーボネートバッファー中に希釈した各ペプチド $10 \mu\text{g}$ を、ポリスチレンチューブ(15 ml
チューブ、CORNING)中に沈着させた。ペプチドの付着は、周囲温度にて2時間の吸着によ
り行う。付着しなかったペプチドは、PBS中に2回洗浄することにより除去する。

【0053】

患者(HLA: A3~A11、B7/B44)からの全血2 mlを、このようにして得たチューブ内に5時間
インキュベートした。



このインキュベーション後、全血を1500 rpmで10分間遠心分離し、血液からの上清(血漿)
を移した。血漿(100、50および $12.50 \mu\text{l}$)を、抗 γ -IFN抗体で予めインキュベートした96
ウェルプレート上に、20℃の温度において2時間、重複して沈着させた。洗浄後、ビオチ
ン化抗 γ -IFN 2次抗体を、20℃の温度において1時間添加した。次いでエクストラアビジ
ン-APを20℃の温度において1時間添加し、MUP 基質(アルカリホスファターゼの基質) $100 \mu\text{l}$
が反応の現像を可能にした。読み取りを30分後に行った。

【 0 0 5 4 】

結果を図4に示す。

図4の凡例：

【 表 1 】

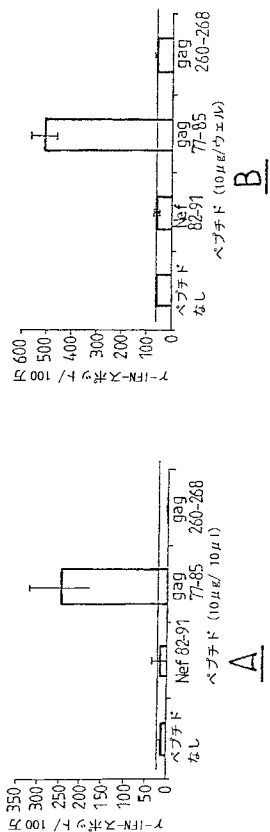
-  : ペプチドなし
-  : ペプチド 10μg

これらの結果は、患者の全血を用いて、ウイルスに特異的な細胞性応答の存在の検出(ここではEBVウイルスの検出)が可能であることを示す。この細胞性応答は、ウイルスに特異的であり、 γ -IFNの産生が、血漿の種々の希釈において検出された。全血のみ(ネガティブコントロール)またはEBVウイルスペプチドとインキュベートした全血から得られた γ -IFNの産生の間差は、有意であった。患者1056の血液中に存在する細胞は、活性化され、そしてEBVウイルス由来CD8⁺ペプチドの存在下の特定の方法で γ -IFNを産生した。

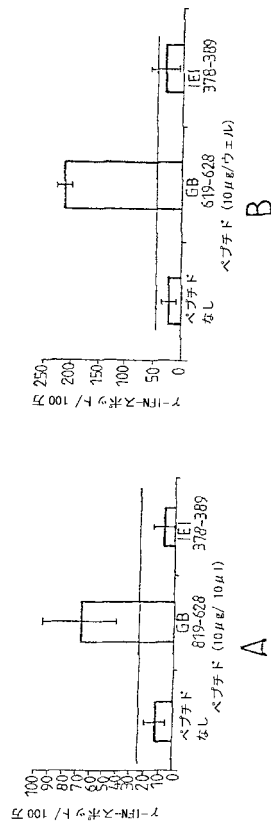
【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 5 】

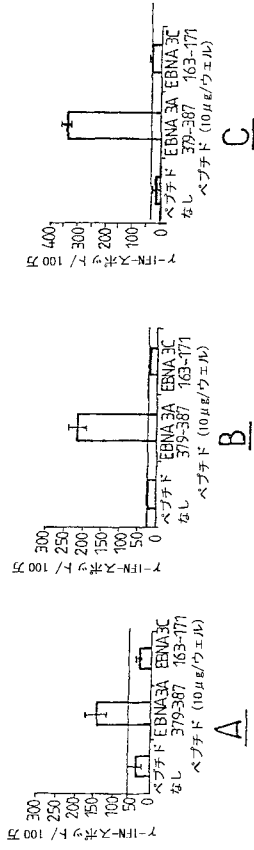
【 図 1 】



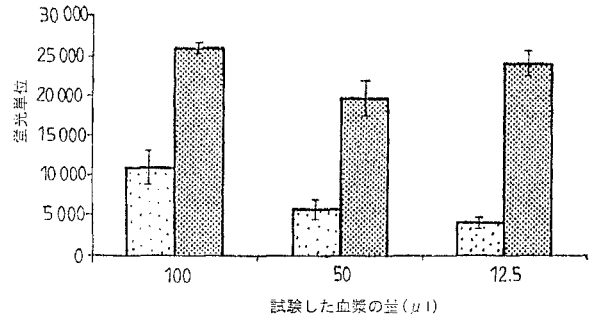
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
6 mars 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/019195 A2

- (51) Classification internationale des brevets : **G01N 33/543**, 33/68
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/02937
- (22) Date de dépôt international : 27 août 2002 (27.08.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 01/11136 27 août 2001 (27.08.2001) FR
- (81) États désignés (national) : AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BI, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG).



- (71) Dépositaire (pour tous les États désignés, sauf US) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Dépositaires (pour US seulement) : CAHERY-SEGARD, Hanne [FR/FR]; 14, rue Saurette, F-75014 Paris (FR). GUILLET, Jean-Gérard [FR/FR]; 9 bis, rue Geoffroy Marie, F-75009 Paris (FR).
- (74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie, José etc.; 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).
- Publiée : — sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 03/019195 A2

(54) Title: CELLULAR IMMUNITY TEST WITH PEPTIDES FIXED ON A SOLID SUPPORT

(54) Titre : TEST DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE PAR DES PEPTIDES FIXES SUR SUPPORT SOLIDE

(57) Abstract: The invention concerns a method for detecting cellular immunity (with respect to an antigen), using a solid support whereon is fixed an assortment of peptides constituting T cell epitopes of the antigen to be tested, kits for implementing said method.

(57) Abrégé: L'invention concerne une méthode de détection de l'immunité cellulaire (vis-à-vis d'un antigène), utilisant un support solide sur lequel est fixé un assortiment de peptides constituant des épitopes T de l'antigène à tester, des kits pour la mise en oeuvre de ladite méthode.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

1

TEST DE L'IMMUNITE CELLULAIRE PAR DES PEPTIDES FIXES SUR
SUPPORT SOLIDE.

L'invention est relative à de nouveaux moyens de
détection de l'immunité cellulaire.

5 L'immunité à médiation cellulaire joue un rôle
majeur dans la réponse immunitaire vis-à-vis de micro-
organismes tels que des virus, ainsi que certaines bactéries
ou certains protozoaires qui sont capables de se développer à
l'intérieur des cellules de l'hôte, échappant ainsi aux
10 anticorps. Elle intervient aussi dans des phénomènes de rejet
de greffe et la destruction de tumeurs.

Alors que dans le cas de l'immunité humorale, les
effecteurs moléculaires sont les anticorps sécrétés par les
lymphocytes B, les effecteurs moléculaires de l'immunité
15 cellulaire sont les récepteurs TcR ancrés dans la membrane
cytoplasmique des lymphocytes T.

La reconnaissance d'un épitope T par le TcR
implique un mécanisme beaucoup plus complexe que celui qui
intervient dans la reconnaissance d'un épitope B par un
20 anticorps. En effet, le TcR ne reconnaîtra le peptide
constituant son épitope que si celui-ci est associé à une
molécule de classe I ou de classe II du CMH (complexe majeur
d'histocompatibilité) à la surface d'une cellule
présentatrice. Les TcR des lymphocytes T CD4 et CD8
25 reconnaissent ainsi les épitopes présentés respectivement par
les molécules de classe II et par les molécules de classe I
du CMH.

On définit comme « épitope T » d'un antigène,
tout fragment peptidique dudit antigène capable d'être
30 reconnu dans le contexte de CMH approprié, par le récepteur
TcR d'un lymphocyte T, et d'induire l'activation dudit
lymphocyte.

La taille d'un épitope T varie selon la classe de
la molécule de CMH présentant le peptide ; les épitopes T
35 CD8⁺ présentés par les molécules du CMH de classe I ont une
taille de 8 à 10 acides aminés, alors que les épitopes T CD4⁺
présentés par les molécules du CMH de classe II ont une
taille de 13 à 25 acides aminés.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

2

Pour un même antigène et pour une même classe de CMH, la séquence des épitopes varie selon l'allèle du CMH concerné.

5 Pour de très nombreux antigènes, une grande variété d'épitopes T restreints à différents allèles du CMH de classe II ou du CMH de classe I a été identifiée et les séquences de ces épitopes sont disponibles dans la littérature.

10 L'interaction TcR-épitope T associé au CMH induit, en présence de divers signaux de co-stimulation qui résultent de l'interaction de molécules en surface des cellules T et de molécules en surface des cellules présentatrices, une stimulation des lymphocytes se traduisant par une multiplication cellulaire aboutissant à des lymphocytes T effecteurs.

15 Les lymphocytes effecteurs peuvent être regroupés en différentes populations selon leurs fonctions effectrices, qui définissent divers types de réponse immunitaire. Ces populations peuvent être distinguées notamment par leur capacité à sécréter différentes molécules (cytokines, facteurs lytiques) ou combinaisons de molécules particulières. Par exemple, parmi les lymphocytes effecteurs qui peuvent se différencier à partir des cellules CD4⁺ ou CD8⁺, on citera les lymphocytes Th1 ou T1, qui se caractérisent par la sécrétion de cytokines notamment l'interleukine 2 (IL-2) et l'interféron gamma (IFN- γ), et les 25 cellules Th2 ou T2 qui sécrètent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10.

30 Contrairement à l'immunité humorale qui n'est détectable d'une façon significative environ 1 mois après un premier contact avec un immunogène, l'immunité à médiation cellulaire apparaît en quelques jours après ce premier contact ; elle persiste ensuite pendant une longue période, sous forme de lymphocytes T mémoire, qui sont capables de 35 proliférer et d'acquérir rapidement des fonctions effectrices lors d'une présentation ultérieure du même immunogène.

L'immunité cellulaire peut donc constituer un bon indicateur, permettant la détection très précoce d'une

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

3

réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène déterminé, et la détermination du type de réponse immunitaire mise en jeu.

La détection de lymphocytes T effecteurs spécifiques d'antigène est utilisée dans différents laboratoires de recherche, par exemple dans le cadre de la mise au point de vaccins, pour rechercher les épitopes immunisants et évaluer l'intensité et le type de la réponse immunogène.

Une approche de plus en plus souvent utilisée pour évaluer l'immunité cellulaire vis-à-vis d'un antigène consiste à fournir des peptides constituant des épitopes T connus dudit antigène et à analyser la réactivité des lymphocytes T vis-à-vis de ces peptides.

Cette approche peut théoriquement être utilisée pour le diagnostic ou le suivi de pathologies entraînant une réponse à médiation cellulaire. Toutefois, contrairement à l'immunité humorale, que l'on peut détecter facilement *in vitro* par mise en évidence de la formation d'un complexe antigène-anticorps, la détection de l'immunité cellulaire implique la mise en œuvre de techniques lourdes difficilement utilisables dans le cadre d'analyses de routine.

Il est en effet nécessaire :

- 1) de présenter aux lymphocytes les épitopes à tester, dans des conditions permettant leur reconnaissance par le TcR et l'activation des lymphocytes ;
- 2) de détecter les lymphocytes effecteurs activés.

Certaines méthodes développées récemment permettent de simplifier la détection des cellules effectrices. A titre d'exemple, la technique ELISPOT, initialement décrite par VERSTEEGEN et al. (J. Immunol. Methods, 111, 25-29, 1988) permet de détecter et caractériser des lymphocytes T effecteurs spécifiques d'épitopes, présents parmi les cellules du sang périphérique, par détection des facteurs sécrétés par lesdits lymphocytes après re-stimulation par des peptides représentant des épitopes T.

Par exemple, cette technique a été utilisée pour identifier des lymphocytes effecteurs T CD8⁺ spécifiques

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

4

d'épitopes du virus de la grippe (LALVANI et al., J. Exp. Med. 186, 859-865, 1997) ; pour analyser la réponse T CD8⁺ vis-à-vis de peptides représentant divers épitopes de HIV1 utilisés dans des vaccins (GAHERY-SEGARD et al., J. Virol., 74, 1694-1703, 2000) ; pour déceler la présence d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* par détection de lymphocytes effecteurs T spécifiques d'épitopes de l'antigène ESAT-6 (LALVANI et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 163, 824-828, 2001).

10 Les essais décrits dans les publications mentionnées ci-dessus ont été effectués en ajoutant une solution de chacun des peptides à tester à une suspension obtenue par séparation sur gradient de FICOL de cellules monocytaires du sang périphérique (PBMCs) ; on sait en effet
15 que dans ces conditions, ces peptides peuvent être chargés directement par les molécules du CMH et présentés aux lymphocytes.

Or les Inventeurs ont maintenant constaté que, de façon surprenante, la mise en contact des lymphocytes T d'un
20 sujet avec des peptides constituant des épitopes reconnus par lesdits lymphocytes T, fixés sur un support solide, entraînait l'activation de lymphocytes T effecteurs spécifiques desdits épitopes.

La présente invention a pour objet l'utilisation
25 d'un support solide auquel est fixé au moins un peptide constituant un épitope T d'un antigène pour la détection et/ou la caractérisation *in vitro* de l'immunité cellulaire vis-à-vis dudit antigène.

La présente invention a en particulier pour objet
30 un procédé de détection et/ou de caractérisation *in vitro* de la réponse immune cellulaire d'un sujet vis-à-vis d'un antigène, par mise en contact d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T CD4⁺ et/ou des lymphocytes T CD8⁺ présents dans les cellules monocytaires du sang
35 périphérique (PBMCs) dudit sujet avec un ou plusieurs peptide(s) constituant un (des) épitope(s) T dudit antigène capable(s) d'être présenté(s) par une molécule du CMH dudit sujet et détection des lymphocytes T effecteurs activés par

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

5

cette mise en contact, lequel procédé est caractérisé en ce que le(s)dit(s) peptide(s) est (sont) fixé(s) sur un support solide.

L'échantillon biologique peut être constitué par une préparation de lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ purifiés. Il peut aussi être constitué par une préparation de PBMCs obtenue à partir d'un prélèvement de sang dudit sujet ; avantageusement, on peut également utiliser du sang total.

Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé conforme à l'invention, au moins 2 peptides constituant 2 épitopes T différents dudit antigène, et dont l'un au moins est capable d'être présenté par une molécule du CMH dudit sujet sont fixés audit support solide.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, un mélange desdits peptides est fixé audit support solide.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, ledit support solide est constitué par une plaque de microtitration, lesdits peptides étant fixés dans au moins 2 puits différents de ladite plaque et l'échantillon biologique est divisé en au moins 2 aliquotes dont chacune est mise en contact avec l'un desdits peptides.

L'utilisation d'un mélange de peptides permet de détecter rapidement l'existence d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire vis-à-vis de l'antigène concerné. L'utilisation séparée de différents peptides permet de mieux analyser les composantes de cette réponse.

Dans tous les cas, le(s) peptide(s) utilisé(s) peu(ven)t constituer un (des) épitope(s) T CD4⁺, ou un (des) épitope(s) T CD8⁺. On peut également utiliser simultanément un (des) épitope(s) T CD4⁺, et un (des) épitope(s) T CD8⁺, séparément ou en mélange.

Les autres modalités de mise en œuvre du procédé conforme à l'invention peuvent être identiques à celles utilisées dans les méthodes de détection *in vitro* de la réponse immunitaire cellulaire connues dans l'art antérieur.

Par exemple, la mise en contact entre les peptides fixés au support solide et l'échantillon biologique

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

6

à tester s'effectue dans les mêmes conditions que dans les méthodes de l'art antérieur où les peptides sont présents dans la phase liquide. Généralement, cette mise en contact s'effectuera par incubation pendant 5 à 20 heures à 37°C, en présence de 5% de CO₂.

De même, la détection des lymphocytes T effecteurs activés peut s'effectuer par les méthodes classiques.

Avantageusement, on effectuera le dosage des facteurs solubles (cytokines ou facteurs lytiques) sécrétés par ces lymphocytes. Par exemple, le dosage de l'IL-2 ou de l'IFN- γ permet de caractériser une réponse Th1 ou T1, alors que le dosage de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 ou l'IL-10, permet de caractériser une réponse Th2 ou T2. D'autres facteurs solubles qui caractérisent essentiellement les lymphocytes T CD8⁺ comme les chimiokines (RANTES), ou les molécules à fonction de lyse (comme perforine/granzyme) peuvent également être dosés.

D'autres méthodes de détection des lymphocytes T activés éventuellement utilisables dans le cadre de la présente invention sont par exemple le marquage intracellulaire des cytokines.

Par rapport aux méthodes d'évaluation de l'immunité cellulaire connues dans l'art antérieur, dans lesquelles les peptides à tester sont ajoutés dans la suspension de cellules, le procédé conforme à l'invention permet de simplifier considérablement la procédure d'essai, notamment dans le cas d'analyses impliquant l'utilisation en parallèle de différents peptides, qui s'effectuent classiquement dans les puits d'une plaque de microtitration, ou dans une série de tubes.

En effet, alors que les techniques de l'art antérieur nécessitent d'ajouter aux cellules à tester un peptide ou un mélange de peptides défini dans chacun des puits de la plaque ou dans chaque tube de la série, il est possible, dans le cadre de la mise en œuvre de la présente invention, d'utiliser des plaques ou des tubes préparés d'avance, chacun des puits desdites plaques ou chacun desdits

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

7

tubes étant recouvert du peptide ou du mélange de peptides souhaité. Ceci permet de réduire considérablement les manipulations nécessaires, donc de diminuer le temps nécessaire à la mise en œuvre de l'essai et d'augmenter sa reproductibilité en limitant les causes d'erreur.

En outre, la fixation des peptides sur un support solide permet de stabiliser ceux-ci et de les protéger de la dégradation qui intervient rapidement en milieu liquide. A titre d'illustration, dans le cas de peptides fixés par adsorption sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène, les peptides conservent leurs propriétés d'activation spécifique des lymphocytes T pendant au moins 24 heures à 20°C, au moins une semaine à 4°C, et au moins 15 jours dans un congélateur à -80°C, alors que des solutions des mêmes peptides perdent leurs propriétés en quelques heures à 37°C.

De plus, la présente invention présente l'avantage de diminuer considérablement les concentrations de peptides utilisés, permettant ainsi une diminution très conséquente des coûts.

La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en œuvre d'un procédé conforme à l'invention, comprenant un assortiment de peptides issus d'un même antigène, dont chacun constitue un épitope T dudit antigène, fixés sur un support solide.

Pour la réalisation de kits conformes à l'invention, on peut utiliser des supports solides, et des méthodes de fixation des peptides auxdits supports, de même type que ceux qui sont habituellement utilisés notamment pour les kits de dosage antigène anticorps.

Par exemple, on peut utiliser des supports en matériaux plastiques tels que le polystyrène, le polyéthylène ou le chlorure de polyvinyle, des supports en nitrocellulose, des supports en matériaux à base de silice, tels que le verre, etc.

La fixation des peptides peut s'effectuer par des techniques également connues en elles-mêmes ; le choix des

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

8

techniques les plus appropriées dépend du support concerné, et des propriétés physicochimiques des peptides choisis.

On peut par exemple synthétiser directement les peptides sur le support, ou fixer à celui-ci des peptides présynthétisés.

Par exemple, la fixation des peptides peut s'effectuer par adsorption. Le support et les conditions de fixation seront bien entendu choisis de manière à éviter la désorption des peptides lors de l'addition de l'échantillon biologique à tester et de l'incubation avec celui-ci.

Avantageusement, les peptides seront fixés au support par liaison covalente, directement ou par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Dans ce cas la surface du support peut être activée par l'intermédiaires d'agents tels que les dérivés de carbodiimide, les dérivés de N-hydroxysuccinimide, les dérivés de sulfosuccinimide etc.

On peut également utiliser des peptides biotinylés, fixés sur un support recouvert d'avidine.

Le support peut être sous forme d'un tube ou d'un ensemble de tubes, d'une plaque de microtitration, d'une ou plusieurs bandelettes, de billes, etc.

L'antigène peut être en particulier un micro-organisme infectieux (virus, protozoaire, bactérie), un antigène tumoral, un antigène auto-immun ou un allergène. S'il s'agit d'un micro-organisme, les peptides constituant l'assortiment peuvent être issus de différentes protéines antigéniques de cet organisme.

Le choix des peptides constituant l'assortiment dépend bien entendu de l'antigène concerné, et de l'utilisation précise à laquelle est destiné le kit. Il s'agira de peptides précédemment identifiés comme constituant des épitopes T CD4⁺ ou CD8⁺ de l'antigène concerné.

Avantageusement, cet assortiment comprendra des peptides capables d'être présentés par des allèles différents du CMH. Il peut être constitué de peptides constituant des épitopes T CD4⁺, de peptides constituant des épitopes T CD8⁺, ou d'un mélange de ces deux types d'épitopes.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

9

Les peptides constituant l'assortiment peuvent être mélangés et fixés sous forme de mélange au support solide. Lorsque le support solide est une plaque de microtitration ou un ensemble de tubes, différents peptides ou combinaisons de peptides peuvent également être fixés séparément, chaque peptide ou combinaison de peptide étant fixé à l'intérieur de l'un des puits de la plaque de microtitration, ou de l'un des tubes.

Un kit conforme à l'invention peut également comprendre en outre des moyens de détection des lymphocytes T effecteurs activés. Ces moyens peuvent par être constitués par des réactifs de dosage des facteurs solubles produits par lesdits lymphocytes.

La présente invention peut par exemple être mise en œuvre, en santé humaine ou animale :

- dans le cadre du dépistage et du suivi de l'évolution d'infections par différents agents pathogènes entraînant une réponse immunitaire cellulaire. A titre d'exemples on citera : des virus tels que les HIV (human immunodeficiency virus) 1 et 2, le FIV (feline immunodeficiency virus), le HTLV-1 (Human T Lymphocyte Virus type I), les virus des différents types d'hépatite, etc ; des parasites tels que *Toxoplasma*, ou *Plasmodium* ; les prions, etc. ;

- dans le cadre du dépistage et du suivi de l'évolution de pathologies d'origines tumorales. A titre d'exemples on citera : le mélanome, le cancer du sein, les leucémies myéloïdes, les cancers associés à une infection virale, comme le cancer du col associé au papilloma virus humain, etc. ;

- dans le cadre du dépistage et du suivi de l'évolution de maladies auto-immunes. A titre d'exemple on citera le diabète de type I, la sclérose en plaques, etc. ;

- dans le cadre du dépistage et du suivi de l'évolution des maladies de type allergique. A titre d'exemple, on citera des allergènes comme les graminées, les pollens, certains médicaments.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

10

Quelle que soit l'utilisation concernée, la présente invention permet, par la détection de l'immunité à médiation cellulaire, un diagnostic très précoce de l'apparition ou de l'évolution d'une pathologie, avant l'apparition des signes cliniques et avant l'apparition de la réponse humorale. Ceci rend possible une décision médicale plus rapide, une meilleure stratégie thérapeutique et de meilleures chances de succès du traitement pour les patients.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant sa mise en œuvre pour la caractérisation d'une immunité cellulaire spécifique vis-à-vis de différents pathogènes viraux.

EXEMPLE 1 : FIXATION SUR UN SUPPORT SOLIDE DE PEPTIDES CONSTITUANT DES ÉPITOPES T.

Différents peptides constituant des épitopes CD8⁺ connus de trois virus différents : le virus HIV-1 (virus de l'immunodéficience humaine), le CMV (cytomegalovirus) et le virus EBV (virus d' Epstein Barr), ont été synthétisés.

Ces peptides sont les suivants :

Virus HIV-1:

gag 77-85 (SLYNTVATL, HLA A2)

GAG 260-268 (EIKRWIIL, HLA A2)

Nef 82-91 (KAALDLSHFL, HLA A2)

Virus CMV :

GB 619-628 (FIAGNSAYEYV, HLA A2)

IEI 378-389(SDEEEAIVAYTL, HLA B18)

Virus EBV :

EBNA 3A 379-387(RPPIFIRRL, HLA B7)

EBNA 3C 163-171 (EGGVGWRHV, HLA B44).

Ces peptides ont été fixés au fond des puits d'une plaque en polystyrène, par le protocole suivant.

10 µg de peptide en tampon carbonate ont été déposés dans une plaque de microtitration à 96 puits (plaque en polystyrène, NUNC MAXISORB). La fixation des peptides s'est faite par adsorption pendant 2 heures à température

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

11

ambiante. Les peptides non-fixés sont éliminés par deux lavages en PBS.

EXEMPLE 2 : CARACTERISATION D'UNE IMMUNITE CELLULAIRE VIS-A-VIS DE HIV-1

5 Des PBMCs purifiées à partir du sang d'un patient (HLA-A2) séropositif pour HIV-1 ont été testées comme suit.

1) Activation des lymphocytes :

10 200 µl (10^5 cellules) de suspension cellulaire dans du milieu de culture classique (RPMI, 10% de SAB) sont déposés dans chacun des puits dans lesquels lequel ont été fixés les peptides de HIV-1, comme décrit à l'Exemple 1 ci-dessus.

15 A titre de témoin positif, un essai a été effectué par la méthode ELISPOT classique : 200 µl (10^5 cellules) de suspension des PBMCs du même patient sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits, NUNC (identique à celle sur laquelle ont été fixés les peptides), et mélangées avec 10 µg de peptide gag 77-85 ,GAG 260-268, ou Nef 82-91 en solution dans du milieu de culture classique.

20 Dans les 2 essais, des PBMCs ont également été déposées dans des puits sans peptides, à titre de contrôle.

Les plaques sont incubées une nuit à 37°C dans un incubateur en présence de 5% de CO₂.

2) Sélection des lymphocytes T CD8⁺ activés :

25 Le lendemain, la présence des cellules CD8⁺ activées est révélée selon le protocole suivant :

30 Une plaque de 96 puits en nitrocellulose (MILLIPORE) a été recouverte avec 100 µl/puits d'anticorps anti-IFN γ (MABTECH, 1-D1K), dilué à 1 µg/ml dans du tampon carbonate pendant 2 heures à 37°C.

La plaque a été ensuite lavée en PBS et saturée avec du RPMI, SVF 10% à raison de 100 µl/puits, pendant 2 heures à 37°C.

35 200 µl de suspension cellulaire activée comme décrit en 1) ci-dessus sont déposés dans cette plaque. L'incubation s'effectue pendant 5 heures à 37°C, 5% CO₂.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

12

Après 1 lavage en PBS 1X et 5 lavages en PBS TWEEN 0,05%, on ajoute 100 µl/puits d'anticorps anti-IFN-γ Biotin (MABTECH, 7-B6-1-Biotin) à 1 µg/ml, et on incube pendant de 2 heures à température ambiante.

5 Les plaques sont lavées 5 fois en PBS-TWEEN 0,05%.

10 100 µl/puits Extravidin-AKP (SIGMA, n° 2636) dilué au 1/5000 en PBS TWEEN 0,05%, BSA 1% ont ajoutés. L'incubation s'effectue pendant 1 heure à température ambiante. Les plaques sont à nouveau lavées 5 fois en PBS TWEEN 0,05%.

La révélation s'effectue à l'aide du kit BIORAD (n° 170-6432).

15 Après 1/2 heure à 1 heure, la réaction est arrêtée en lavant les plaques avec de l'eau. Les plaques sont séchées à l'air.

Les résultats sont illustrés par la Figure 1.

A : Essai ELISPOT classique ;

20 B : Essai effectué avec les peptides fixés sur support solide.

Dans les 2 cas, seul le peptide gag 77-85 induit une activation de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs sécrétant de l'IFN-γ. Ces résultats montrent que l'utilisation de peptides fixés sur un support solide est au moins aussi efficace pour 25 induire l'activation de cellules effectrices que celle de peptides présentés en phase liquide.

EXEMPLE 3 : CARACTERISATION D'UNE IMMUNITE CELLULAIRE VIS-A-VIS DE CMV

30 Des PBMCs purifiées à partir du sang d'un patient (HLA-A2, B18) ont été testées comme suit.

2 x 10⁵ cellules en suspension dans du milieu classique sont déposés dans chacun des puits dans lesquels lequel ont été fixés les peptides de CMV, comme décrit à l'Exemple 1 ci-dessus.

35 A titre de témoin positif, un essai a été effectué par la méthode ELISPOT classique : 2 x 10⁵ cellules de suspension des PBMCs du même patient sont déposés dans les

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

13

puits d'une plaque 96 puits (NUNC) (identique à celle sur laquelle ont été fixés les peptides), et mélangées avec 10 µg de peptide GB 619-628 ou IEI 378-389.

5 Dans les 2 essais, des PBMCs ont également été déposées dans des puits sans peptides, à titre de contrôle.

L'incubation et la révélation des plaques sont effectuées comme décrit dans l'exemple 2 ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la Figure 2.

A Essai ELISPOT classique ;

10 B Essai effectué avec les peptides fixés sur support solide.

Dans les 2 cas, seul le peptide GB 619-628 induit une activation de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs sécrétant de l'IFN-γ. Ces résultats confirment ceux observés dans le cas
15 des peptides de HIV-1.

EXEMPLE 4 : CONSERVATION DES PEPTIDES FIXES SUR SUPPORT SOLIDE.

Des plaques dans les puits desquelles ont été fixés les peptides de EBV, comme décrit à l'Exemple 1 ci-dessus, ont été conservées :

A) à 20°C pendant 24H ;

B) à 4°C pendant 7 jours ;

C) à -80°C pendant 15 jours.

2 x 10⁵ PBMCs purifiées à partir du sang d'un patient (HLA B7/B44) en suspension dans du milieu de culture classique sont déposés dans chacun des puits de ces plaques, et testées comme décrit à l'Exemple 3 ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la Figure 3.

A : conservation à 20°C pendant 24H ;

30 B : conservation à 4°C pendant 7 jours ;

C : conservation à -80°C pendant 15 jours.

Ces résultats montrent que les conditions de conservation ne modifient pas les propriétés d'activation de cellules effectrices des peptides fixés sur support solide.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

14

EXEMPLE 5 : DETECTION D'UNE IMMUNITE CELLULAIRE VIS-A-VIS DE EBV A L'AIDE D'UN MELANGE DE PEPTIDES FIXES SUR SUPPORT SOLIDE.

Un mélange des peptides suivants :

5 EBNA 3C 163-171 (EGGVGWRHV, B44),
EBNA 3A 603-611 (RLRAEAGVK, A3),
EBNA 4 416-424 (IVTDFSVIK, A11),
EBNA 3C 881-891 (QPRAPIRPIPT, B7),
EBNA 3A 379-387 (RPPIFIRRL, B7), et
10 EBNA 6 290-299 (EENLLDFVRF, B44),
constituant des épitopes T CD8⁺ connus de EBV a été fixé sur la paroi interne d'un tube de polystyrène, selon le protocole suivant :

15 10 µg de chaque peptide dilué en tampon carbonate ont été déposés dans un tube en polystyrène (tube 15 ml, CORNING). La fixation des peptides s'effectue par adsorption pendant 2 heures à température ambiante. Les peptides non-fixés sont éliminés par deux lavages en PBS.

20 2 ml de sang total d'un patient (HLA : A3-A11, B7/B44) ont été incubés pendant 5 heures dans le tube ainsi obtenu.

Après cette incubation, le sang total a été centrifugé pendant 10 min à 1500 T/min et le surnageant (plasma) du sang a été prélevé. Le plasma (100, 50 et 25 12,5 microlitres) a été déposé en duplicate sur une plaque de 96 puits pré-incubée avec un anticorps anti-IFN-gamma, pendant 2 h à une température de 20°C. Après lavage, un 2^{ème} anticorps anti-IFN-gamma biotinylé a été ajouté pendant 1 h à une température de 20°C. Puis l'extravidine-PA a été ajoutée 30 pendant 1 h à une température de 20°C et 100 microlitres de substrat MUP (substrat de la phosphase alcaline) a permis la révélation de la réaction. La lecture a été réalisée après 30 min.



Les résultats sont illustrés par la Figure 4.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

15

Légende de la Figure 4 :

 : sans peptide : 10 microgrammes de peptide

5 Ces résultats montrent qu'il est possible de détecter la présence d'une réponse cellulaire spécifique d'un virus (ici détection du virus EBV) à partir du sang total d'un patient. Cette réponse cellulaire est spécifique au virus et la production d'IFN-gamma a été détectée à différentes dilutions de plasma. Le différentiel est

10 significatif entre la production d'IFN-gamma obtenue à partir du sang total seul (contrôle négatif) ou du sang total incubé avec les peptides du virus EBV. Les cellules présentes dans le sang du patient 1056 ont été activées et ont produit de

15 façon spécifique de l'INF-gamma en présence des peptides CD8* dérivés du virus EBV.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

16

REVENDEICATIONS

- 1) Utilisation d'un support solide auquel est fixé au moins un peptide constituant un épitope T d'un antigène pour la détection et/ou la caractérisation *in vitro* de l'immunité cellulaire vis-à-vis dudit antigène.
- 2) Procédé de détection et/ou de caractérisation *in vitro* de la réponse immune cellulaire d'un sujet vis-à-vis d'un antigène, par mise en contact d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T CD4⁺ et/ou des lymphocytes T CD8⁺ présents dans les cellules monocytaires du sang périphérique dudit sujet avec un ou plusieurs peptide(s) constituant un (des) épitope(s) T dudit antigène capable(s) d'être présenté(s) par une molécule du CMH dudit sujet et détection des lymphocytes T effecteurs activés par cette mise en contact, lequel procédé est caractérisé en ce que le(s)dit(s) peptide(s) est (sont) fixé(s) sur un support solide.
- 3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'au moins 2 peptides constituant 2 épitopes T différents dudit antigène, et dont l'un au moins est capable d'être présenté par une molécule du CMH dudit sujet sont fixés audit support solide.
- 4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'un mélange desdits peptides est fixé audit support solide.
- 5) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit support solide est constitué par une plaque de microtitration, lesdits peptides étant fixés dans au moins 2 puits différents de ladite plaque et l'échantillon biologique est divisé en au moins 2 aliquotes dont chacune est mise en contact avec l'un desdits peptides.
- 6) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que le(s) peptide(s) utilisé(s) constitue(nt) un (des) épitope(s) T CD4⁺.
- 7) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que le(s) peptide(s) utilisé(s) constitue(nt) un (des) épitope(s) T CD8⁺.

WO 03/019195

PCT/FR02/02937

17

8) Kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 2 à 7, comprenant : -

5 - un assortiment de peptides issus d'un même antigène, dont chacun constitue un épitope T identifié dudit antigène, fixés sur un support solide, et ;

- des moyens de détection des lymphocytes T effecteurs activés.

9) Kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 2 à 5, comprenant un
10 assortiment de peptides issus d'un même antigène, dont chacun constitue un épitope T identifié dudit antigène, fixés sur un support solide, ledit assortiment comprenant au moins un peptide constituant un épitope T CD4⁺et au moins un peptide constituant un épitope TCDS⁺.

15

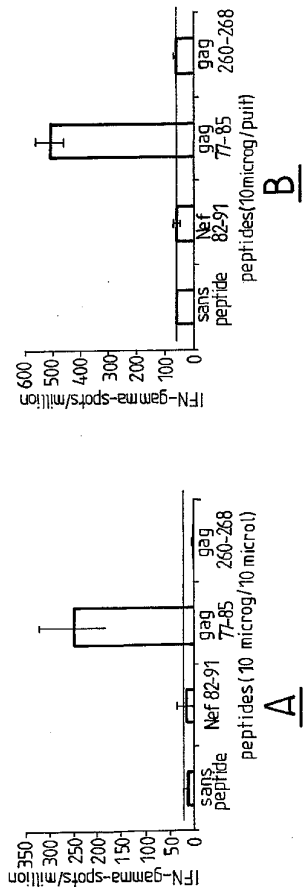


FIG.1

2 / 4

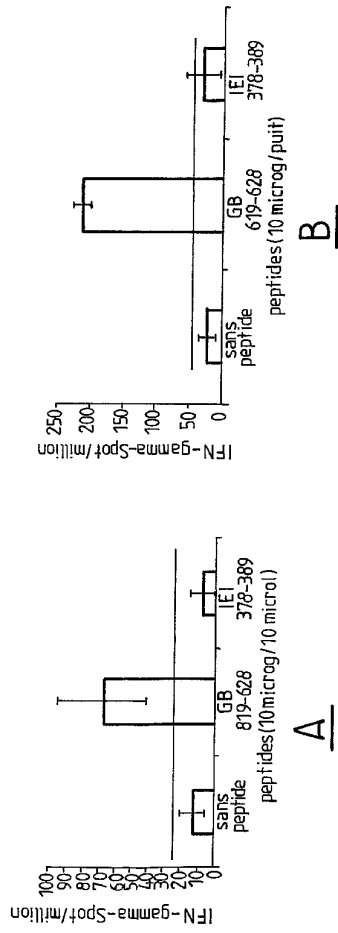


FIG. 2

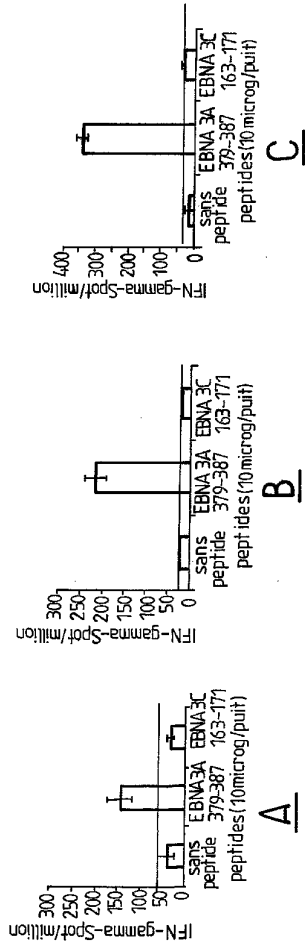


FIG. 3

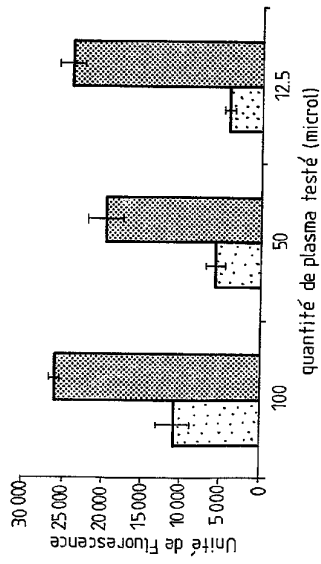


FIG.4

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
6 mars 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/019195 A3

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/569, 33/68, C07K 17/00
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2002/002937
- (22) Date de dépôt international : 27 août 2002 (27.08.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
01/11136 27 août 2001 (27.08.2001) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101,
rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GAHERY-
SEGARD, Hanne [FR/FR]; 14, rue Sarrette, F-75014 Paris
(FR), GUILLET, Jean-Gérard [FR/FR]; 9 bis, rue Geof-
froy Marie, F-75009 Paris (FR).
- (74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie, José etc.;
36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
- (88) Date de publication du rapport de recherche
Internationale: 22 janvier 2004
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*



WO 2003/019195 A3

(54) Title: CELLULAR IMMUNITY TEST WITH PEPTIDES FIXED ON A SOLID SUPPORT

(54) Titre : TEST DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE PAR DES PEPTIDES FIXES SUR SUPPORT SOLIDE

(57) Abstract: The invention concerns a method for detecting cellular immunity (with respect to an antigen), using a solid support whereon is fixed an assortment of peptides constituting T cell epitopes of the antigen to be tested, kits for implementing said method.

(57) Abrégé : L'invention concerne : une méthode de détection de l'immunité cellulaire (vis-à-vis d'un antigène), utilisant un support solide sur lequel est fixé un assortiment de peptides constituant des épitopes T de l'antigène à tester, des kits pour la mise en oeuvre de ladite méthode.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/02937		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/569 C07K17/00				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	BOUILLON M ET AL: "PHYSICAL ASSOCIATION BETWEEN MHC CLASS I MOLECULES AND IMMUNOGENIC PEPTIDES" NATURE (LONDON), vol. 339, no. 6224, 1989, pages 473-475, XP002205665 ISSN: 0028-0836 the whole document	9		
A	WO 98 23690 A (EASTMAN CHEM CO) 4 June 1998 (1998-06-04) the whole document	1-9		
A	US 5 595 881 A (KENDRICK TERESA ET AL) 21 January 1997 (1997-01-21) claim 5	1-9		
-/-				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report			
13 May 2003	03/07/2003			
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3340, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016	Authorized officer Pellegrini, P			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 02/02937

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 35035 A (NICOLETTE CHARLES) 25 September 1997 (1997-09-25) page 6, paragraph 3 -page 7, paragraph 1	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
 PCT/FR 02/02937

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9823690	A	04-06-1998	BR 9713145 A 08-02-2000		
			CN 1245516 A 23-02-2000		
			EP 0948570 A1 13-10-1999		
			JP 2002516621 T 04-06-2002		
			KR 2000057281 A 15-09-2000		
			WO 9823690 A1 04-06-1998		
			US 6197223 B1 06-03-2001		
			US 2001023938 A1 27-09-2001		

			US 5595881	A	21-01-1997
WO 9735035	A	25-09-1997	AU 740222 B2 01-11-2001		
			AU 2536497 A 10-10-1997		
			CA 2251781 A1 25-09-1997		
			EP 0954601 A1 10-11-1999		
			US 2002172979 A1 21-11-2002		
			WO 9735035 A1 25-09-1997		
			US 6338945 B1 15-01-2002		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Depôt International No PCT/FR 02/02937
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/68 G01N33/569 C07K17/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BOUILLOT M ET AL: "PHYSICAL ASSOCIATION BETWEEN MHC CLASS I MOLECULES AND IMMUNOGENIC PEPTIDES" NATURE (LONDON), vol. 339, no. 6224, 1989, pages 473-475, XP002205665 ISSN: 0028-0836 le document en entier	9
A	WO 98 23690 A (EASTMAN CHEM CO) 4 juin 1998 (1998-06-04) le document en entier	1-9
A	US 5 595 881 A (KENDRICK TERESA ET AL) 21 janvier 1997 (1997-01-21) revendication 5 --- -/-	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (tels qu'indiqués) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *S* document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 13 mai 2003		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 03/07/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentkanal 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 940-2940, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 940-3016		Fonctionnaire autorisé Pellegrini, P

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 02/02937

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97 35035 A (NICOLETTE CHARLES) 25 septembre 1997 (1997-09-25) page 6, alinéa 3 -page 7, alinéa 1	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 02/02937

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication		
WO 9823690 A	04-06-1998	BR 9713145 A	08-02-2000		
		CN 1245516 A	23-02-2000		
		EP 0948570 A1	13-10-1999		
		JP 2002516621 T	04-06-2002		
		KR 2000057281 A	15-09-2000		
		WO 9823690 A1	04-06-1998		
		US 6197223 B1	06-03-2001		
		US 2001023938 A1	27-09-2001		
		US 5595881 A	21-01-1997	WO 9605287 A1	22-02-1996
		WO 9735035 A	25-09-1997	AU 740222 B2	01-11-2001
AU 2536497 A	10-10-1997				
CA 2251781 A1	25-09-1997				
EP 0954601 A1	10-11-1999				
US 2002172979 A1	21-11-2002				
WO 9735035 A1	25-09-1997				
US 6338945 B1	15-01-2002				

Formulaire PCT/ISA/210 (renseignements relatifs aux familles de brevets) (septembre 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 ギャエリー - セガール, アンネ

フランス、エフ - 7 5 0 1 4 パリ、リュ サーレット、1 4

(72)発明者 ギレット, ジャン - ジェラル

フランス、エフ - 7 5 0 0 9 パリ、リュ ジェオフロイ マリー、9 ビス

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QR48 QR82 QS36 QX02

4H045 AA30 BA15 BA16 CA03 CA05 DA86 EA50 FA80

专利名称(译)	使用固定在固体支持物上的肽进行细胞免疫试验		
公开(公告)号	JP2005501257A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2003524010	申请日	2002-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	国立研究所多拉城主Edora雅倩鲁沙医疗安瑟伦 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉城主等德拉Rushurushe医疗 (安瑟伦)		
[标]发明人	ギャエリーセガールアンネ グイレットジャンジェラル		
发明人	ギャエリーセガール,アンネ グイレット,ジャン-ジェラル		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/04 C12Q1/02 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/505 C07K14/005 C12N2710/16122 C12N2740/16122 C12N2740/16222 C12N2740/16322 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.K C12Q1/02 C07K7/04		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR82 4B063/QS36 4B063/QX02 4H045 /AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/CA03 4H045/CA05 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA80		
优先权	2001011136 2001-08-27 FR		
其他公开文献	JP4550414B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用固体支持物检测细胞免疫 (用于抗原) 的方法, 在所述固体支持物上固定构成待测抗原的T细胞表位的一组肽, 实施该方法的方法它涉及到的试剂盒。

