

(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2004-506202

(P2004-506202A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D	4C084
A6 1 K 38/00	A6 1 K 39/00	A	4C085
A6 1 K 39/00	A6 1 P 31/12		
A6 1 P 31/12	GO 1 N 33/531	A	
GO 1 N 33/531	A6 1 K 37/02		

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願2002-517532 (P2002-517532)	(71) 出願人	591032596
(86) (22) 出願日	平成13年7月26日 (2001.7.26)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ ト ベシュレンクテル ハフトング
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月31日 (2003.1.31)		Merck Patent Gesell schaft mit beschræ nkter Haftung
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/008625		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ ルムシュタット フランクフルター シュ トラーセ 250
(87) 国際公開番号	W02002/012899		Frankfurter Str. 25 0, D-64293 Darmstadt , Federal Republic o f Germany
(87) 国際公開日	平成14年2月14日 (2002.2.14)	(74) 代理人	100088328
(31) 優先権主張番号	0018901.9		弁理士 金田 暢之
(32) 優先日	平成12年8月3日 (2000.8.3)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞によって提示されるペプチド

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物の細胞にタンパク質を加えた後にその細胞の表面に提示されるペプチドを決定する方法に関する。本発明はまた、このようなペプチドの決定、またはこのようなペプチドの決定によって生み出された薬剤実体などの修飾された分子に基づく診断のための検査に関する。このような分子は特定の生物活性を有し、修飾されていない対応する分子に比べてより低い免疫原性またはより高い免疫原性を有することが好ましい。本発明に基づく方法は、質量分光法 (MS) を使用したツールを用いて確立されることが好ましい。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

特定の生物活性を有し、かつ同じ生物活性を有する非修飾タンパク質またはポリペプチドよりも低い免疫原性または高い免疫原性を有する薬剤タンパク質またはポリペプチド、あるいはワクチン抗原を開発する方法であって、

(i) 前記タンパク質またはポリペプチドと細胞とを接触させ、接触させなかった基準細胞上に表示される表面ペプチドのレパートリーとは異なる細胞またはそのエキソソームビヒクル上の表面ペプチドのレパートリーを生成させ、

(i i) 前記細胞またはそのエキソソームベシクルの表面に結合されたペプチドに関して、前記細胞またはそのエキソソームベシクルを分析し、

(i i i) 前記ペプチドを、薬剤タンパク質またはポリペプチド、あるいはワクチン抗原の配列に標準の方法に従って割り当てる

ことによって実行される方法。

10

【請求項 2】

(i v) 前記ペプチドを修飾して、前記ペプチドの M H C 分子への結合が変更されるようにする段階と、

(v) 修飾した 1 つまたは複数のペプチド配列を、タンパク質またはポリペプチド分子配列内に標準の方法に従って組み込むことによって、最終的な薬剤タンパク質またはポリペプチドの配列変異体を構築する段階と

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

段階 (i i) の前記細胞またはそのエキソソームビヒクルの分析が、質量分光法 (M S) を使用して実行される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

M A L D I - M S が使用される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

E S I - M S が使用される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

薬剤タンパク質またはポリペプチドが、前記タンパク質またはポリペプチドと細胞を接触させた後に 1 つまたは複数の前記ペプチドがもはや結合しないように修飾される、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

段階 (i) に基づいて細胞またはエキソソームベシクルの表面に結合されたペプチドが M H C 分子と結合し、段階 (i i) に基づく前記細胞またはそのエキソソームベシクルの分析が M S を使用して実行される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

段階 (i) に基づいて細胞またはエキソソームベシクルの表面に結合されたペプチドが、細胞内ペプチダーゼおよび転送経路の生成物である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

より低い免疫原性を有する薬剤タンパク質またはポリペプチドを開発するための請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法であって、免疫原性ペプチドの修飾が、ペプチドの M H C 分子への結合を排除または低減させ、任意選択で、請求項 1 に指示された細胞表面への結合に関して修飾したペプチドをテストすることによって実行される方法。

40

【請求項 10】

M H C 分子に対するペプチドの結合の排除または低減が、薬剤タンパク質またはポリペプチド中のペプチドの配列領域内の 1 つまたは複数のアミノ酸残基を置換し、挿入または削除することによって実行される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

より高い免疫原性を有する薬剤タンパク質またはポリペプチドを開発するための請求項 1

50

から 8 のいずれか一項に記載の方法であって、ペプチドの修飾が、ペプチドの M H C 分子への結合を強化し、任意選択で、請求項 1 に指示された細胞表面への結合に関して修飾したペプチドをテストすることによって実行される方法。

【請求項 1 2】

M H C 分子へのペプチドの結合の強化が、ペプチドの配列領域内の 1 つまたは複数のアミノ酸残基を置換し、挿入または削除し、T 細胞エピトープとして機能するペプチドの活性を増大させ、および/または T 細胞エピトープが拘束される M H C タイプの範囲を広げ、および/またはいくつかの異なるエピトープを単一の実体に結合することによって実行される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ワクチンの開発方法であって、

(i) 免疫原活性を有するタンパク質またはポリペプチドあるいは微生物と細胞とを接触させ、接触させなかった基準細胞上に表示される表面ペプチドのレパートリーとは異なる前記細胞またはそのエキソソームベシクル上の表面ペプチドのレパートリーを生成させ、

(i i) ペプチドが結合した表面に関して前記細胞またはそのエキソソームベシクルを分析し、

(i i i) 前記ペプチドを、タンパク質またはポリペプチドの配列に標準の方法に従って割り当て、

(i v) 1 つまたは複数のペプチドを、ワクチン分子配列内に標準の方法に従って組み込むことによって、最終的な薬剤ワクチンの配列変異体を構築し、

前記細胞またはその中のエキソソームベシクルの分析が M S を使用して実行される方法。

【請求項 1 4】

M H C 分子を産生するように操作されたヒト細胞システムを使用する、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

親(非操作)細胞システムが M H C 分子を産生しない、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

親細胞システムが M H C クラス I 分子を産生しない、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

親細胞システムが M H C クラス I I 分子を産生しない、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 8】

それ自体の M H C 分子を産生しない非ヒト細胞が M H C 分子を産生するように操作され、指示されるように使用される、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

M H C 分子が M H C クラス I I に由来する、請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

M H C 分子が H L A - D R、H L A - D Q および H L A - D P である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

M H C 分子が M H C クラス I に由来する、請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

さまざまな M H C アロタイプおよび遺伝子型の包括的な混合物を提供する細胞システムまたは細胞試料の組合せが使用される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

ペプチドが外因性タンパク質または微生物を起源とする、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

10

20

30

40

50

ペプチドが内因性タンパク質を起源とする、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

タンパク質、ポリペプチドまたは微生物を加えた後に M H C 分子上にペプチドを提示するヒト樹状細胞またはそのエキソソームベシクルが使用される、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

タンパク質またはポリペプチドを加えた後に M H C 分子上にペプチドを提示するヒト抗原提示細胞またはそのエキソソームベシクルが使用される、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

ペプチド分析の前に M H C 分子が濃縮される、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

分析の前にペプチドが細胞表面から溶離される、請求項 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

分析の前にペプチドが M H C 分子から溶離される、請求項 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

診断のための検査を開発する方法であって、

(i) 表面ペプチドに対して適当なヒト細胞を分析し、

(i i) (a) 細胞表面に現れたペプチドのプロファイルを作成し、任意選択で、ヒト細胞に関連した異常または病気を識別するために他のプロファイルと比較し、または (b) 細胞表面上に特異的なペプチドの配列を、ヒト細胞に関連した異常または病気を識別するのに使用することができる特異的なペプチドを決定する手段として決定することによって実行される方法。

【請求項 3 1】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法によって得られたタンパク質またはポリペプチドを薬剤治療実体として使用すること。

【請求項 3 2】

請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法によって得られたタンパク質またはポリペプチドをワクチンとして使用すること。

【請求項 3 3】

請求項 9 または 1 0 に記載の方法によって得られたタンパク質またはポリペプチドを、より低いイモノゲニシティを有する薬剤治療実体として使用すること。

【請求項 3 4】

タンパク質またはポリペプチドに由来する、細胞またはそのエキソソームベシクルの表面のペプチドを検出する方法であって、

(i) 前記タンパク質またはポリペプチド、あるいはこのタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子と細胞を接触させ、接触させなかった基準細胞上に表示される表面ペプチドのレパートリーとは異なる細胞またはそのエキソソームベシクル上の表面ペプチドのレパートリーを生成させ、

(i i) ペプチドが結合した表面に関して前記細胞またはそのエキソソームベシクルを分析し、

(i i i) 前記ペプチドを、タンパク質またはポリペプチドの配列に標準の方法に従って割り当て、

細胞またはエキソソームベシクルの分析が M S 、好ましくは M A L D I - M S によって実行される

方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、哺乳動物の細胞にタンパク質を加えた後に細胞の表面に提示されるペプチドを決定する方法に関する。本発明はさらに、このようなペプチドの決定に基づく診断のための検査、またはこのようなペプチドの決定によって生み出された、例えば薬剤実体などの、好ましくは特定の生物活性を有し、修飾されていない対応する分子に比べてより低い免疫原性またはより高い免疫原性を有する、修飾された分子に関する。本発明に基づく方法は、質量分光法(MS)を使用したツールを用いて確立されることが好ましい。

【0002】

哺乳動物の細胞によるタンパク質の取込み(または細胞内での特定のタンパク質の産生)の後、これらのタンパク質は分解され、一般に、このようなタンパク質のペプチド断片が、しばしば他のタンパク質と結合して細胞の表面に現れる。具体的には、タンパク質のペプチド断片は分解され、ある種のペプチドは続いて、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子と結合する。多くの場合、これはT細胞によって認識されて免疫応答が開始される。例えば、そこからペプチド断片が誘導される特定のタンパク質を産生する細胞に免疫系が対抗する場合、このような免疫応答は有益であり、例えば、特定のタンパク質に結合しその活性を制限する抗体を産生する場合、免疫系は有害である(例えば薬剤タンパク質の場合など)。

【0003】

現在までのところ所与のタンパク質について、その分解がタンパク質のどの位置で起こるかを正確に予測することは不可能であり、そのため、細胞表面に現れる正確なペプチドを確実に予測することはできない。MHC分子の場合、MHCに結合するペプチドのモチーフの予測においてはある程度成功したものもあったが、実際には、MHC分子に到達する前にこれらのペプチドの一部は分解し、どのペプチドが分解されるかの予測の信頼度は高くない。したがって、細胞表面上のペプチドを検出する標準の方法は、このようなペプチドを溶離させ、その後その配列を決定する方法である。このような方法はルーチンの方法とは言えず、さらに、複数の細胞タイプまたは複数のMHC分子上の細胞表面ペプチドの分析が必要な場合には非実用的である。

【0004】

本発明の目的は、特に複数のMHC分子によって提示された細胞の表面のペプチドを検出する方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、このような情報を、薬剤分子の設計、ワクチン分子の設計または診断のための検査に使用することにある。

【0005】

薬剤分子に関する本発明の特定の目的は、細胞によるタンパク質の取込みまたは産生の後にMHC分子によって提示されるペプチドを識別し、この情報を使用して、このようなペプチドがもはや提示されないようにタンパク質を改変することにある。

【0006】

ワクチン分子に関する本発明の特定の目的は、細胞によるタンパク質の取込みまたは産生の後にMHC分子によって提示されるペプチドを識別し、1つまたは複数のこのようなペプチドをワクチン分子中で使用して免疫系を刺激することにある。

【0007】

薬剤分子とワクチン分子の両方に関する本発明の特定の目的は、さまざまな集団全体を通じて異なるアロタイプおよび遺伝子型バリエーションを包含する多くの異なるMHC分子によって提示されるペプチドを識別することにある。

【0008】

診断のための検査に関する本発明の特定の目的は、細胞によるタンパク質の取込みまたは産生の後にMHC分子によって提示されるペプチドを決定し、このような決定を、生物学的または生理学的な事象、例えば感染、を検出するための検査の基礎として使用することにある。

【0009】

診断のための検査に関する特定の目的は、検査個体の細胞によって提示されるペプチドを識別することにある。

【0010】

本発明は、細胞表面のペプチド、特に結合MHC分子中のペプチドの正確かつ包括的な分析を提供する。細胞表面のペプチドの特性または同一性の決定は特に質量分析法(MS)で行なわれた。

【0011】

かつて、特定の目的のためにMHC/ペプチド複合体が精製された。実際、MHCクラスIおよびクラスII分子に関して、これらを免疫学的に濃縮し精製する方法は、ペプチド-MHC結合相互作用の解明を可能にするのに役立つ、MHC結合モチーフの解明を可能にした。関連する例には、US5989565およびUS6077519などがある。これらには、患者の腫瘍細胞または樹状細胞集団の表面からペプチドを酸溶離させることによって、自己由来T細胞エピトープを識別する方法が提供されている。溶離されたペプチド配列は、ワクチンを産生するための合成ペプチドの設計に利用することができる。

10

【0012】

同様に、Salter他[US5487982]は、突然変異MHCクラスI分子に結合したペプチドを、イン・ビトロ(in vitro)で成長させた遺伝子操作した細胞から容易に除去することができる遺伝子操作した温度感受性MHCクラスI分子を提供している。

【0013】

この技術の他の例にはLanglade-Demoyen他[WO9744667]が含まれる。これは、腫瘍の免疫治療用の腫瘍特異的T細胞のin vitroおよびin vivoでの濃縮、および他の応用のために、精製されたMHC-ペプチド複合体を親和性試薬として利用する。同様にUS5763585、US5734023他は、治療用実体として例えば自己免疫性疾患の治療で使用するための特定のMHCペプチド複合体の精製方法を提供しており、Deshpande他[WO9740852]は、MHCクラスIIタンパク質への結合が強化された修飾ペプチドを開示している。全ての複合体が組換え融合タンパク質として提供される場合には、自己反応性T細胞に関連した疾患の治療に使用される。

20

【0014】

WO9734143およびUS5792604は、細胞の分泌経路によって内因的にプロセシングされたMHCクラスI拘束抗原を識別する方法を提供している。この生物学的アッセイは、初回刺激を受けた細胞障害性T細胞と、培地に分泌されたプロセシングされたペプチドの存在によって細胞溶解がその上に導かれる「インジケータ」標的細胞源と、を必要とする。この方式は、ドナー細胞の内因性プロセシング経路に影響を及ぼすことができる物質の識別に利用することができる。識別MHCクラスIおよびMHCクラスII拘束T細胞エピトープのための、生物学的に複合体に基づく他の方式には、WO00/67761が含まれる。これには、遺伝学的なワクチン接種ならびに樹状細胞および脾細胞の分離を利用して生物学的T細胞活性化検定をin vitroで実施する方法が提供されている。

30

40

【0015】

本発明の発明者は、MSベースの機器を完全な細胞または細胞抽出物の分析に適用し、そのデータを、治療用分子または診断のための検定の合理的な開発のための経路に組み込むことができることを認めた。

【0016】

生物起源の大きくかつ複雑な分子は質量分光法(MS)を使用した分析に適している。ただし分子はイオン化されていなければならない。MSのために生体分子をイオン化する2つの代替方法が、この技術分野では認められた技術となっている。これらは、エレクトロスプレーイオン化(electrospray ionisation:ESI)およびマトリックス支援レーザー脱着イオン化(matrix assisted laser

50

de-sorption ionisation: MALDI)である。ESIでは、帯電させた細い毛细管を通して試料をポンピングし、静電的な反発によって最終的に検体イオンの脱着が生じるまで平行ガス流によって質量分析計の中へ噴霧する。ESIは連続流技法であり、そのため、液体クロマトグラフィー(LC)またはキャピラリー電気泳動法(CE)などの上流側試料分離技術に容易に接続される[Cao & Moyni (1998) *Am. Soc. Mass Spectrom.* 9: 1081-1088]。これらの特徴は、機器の試料プレート上に付着させた結晶性基質物質中に試料が埋め込まれるMALDI-MS技法とは対照的である。イオン化は基質のレーザー励起によって達成され、脱着した検体イオンは質量分析器に向かって加速される。したがってMALDIは非連続プロセスであり、複数のレーザーパルスを使用してイオンが生み出され、データは質量分析器に累積的に集められる。

10

【0017】

MALDIでは質量分析は通常、イオン化レーザーパルスから検出までの飛行時間を測定し質量電荷比(m/z)を計算することができる飛行時間(TOF)機器によって実施される。このような検出器は、さまざまな市販の機器で複数の技術的な改良を受けている。いくつかのモデルは、ペプチド配列の導出および他の構造決定のために源崩壊後のイオン断片の分析を可能にする。ESIベースの機器の連続流機器としての性質のため、走査分析器(例えば4倍または磁気セクタ質量分析器)が使用される。ただし、他の機器形式を利用することもできる。一般的なフォーマットは、2つの質量分析器が直列に配置され、不活性ガス分子を含む「衝突セル」を介してそれらが相互接続されるタンデムMSシステムである。後者の特徴は、衝突誘導崩壊イオンの発生および所与の入力試料からのペプチド配列の決定を可能にする。複数のハイブリッド機器フォーマットを配置し、細胞表面(MHC)と結合したペプチドの分析に利用することができる。

20

【0018】

Cox他[Cox, A. L. et al (1997), 「MHC1: A Practical Approach」, Fernandez N., & Butcher G. 編, Oxford University Press, Oxford, 英の141-160ページ]によって概説されているように、MHC分子、具体的にはMHCクラスI分子から溶離されたペプチドの分析にMSが使用されている。この技術分野のより最近の概説がDe Jongによって提供されている[De Jong, A. (1998), *Mass Spectrometry Reviews*, 17, 311-335]。Ovysyanikova他[Ovysyanikova et al (2001), *J. Immunol. Methods*, 246: 1-12]は、細胞を麻疹ウイルスワクチンで処理した後にMHCクラスII対立遺伝子DRB1*0401から酸溶離した自己ペプチドの分析でMALDI-TOFを利用している。同様に、Sickman他[Sickman, A et al (2000), *Analyst*, 125: 569-573]は、LC技法とMALDI-MS技法の組合せを使用した、MHCクラスIIに結合したラットのランゲルハンス細胞由来のペプチドの識別を記載している。

30

【0019】

しかし本発明は、MHCクラスIおよびMHCクラスII分子に結合するペプチド化学種をMSベースの機器を使用して解明するための一般化された方式を初めて提供することによって、このような全ての従来技術を組み込み、拡張する。第1の実施形態において本発明は、対象、最も好ましくはヒト対象へ投与したときにMHC媒介性の免疫応答を誘起する能力が低い、またはそのような能力を欠いた治療用タンパク質を開発する目的で、ペプチド配列内のアミノ酸置換によって結合相互作用を排除する方法を提供する。本発明の目的は、対象に投与したときに免疫応答を引き起こす能力が低い治療用分子を開発する方法を提供することにある。

40

【0020】

本発明の目的は、細胞の表面のペプチドを検出する方法、特にペプチドがMHC分子と結合している場合にペプチドを検出する方法を提供することにある。

50

【0021】

本発明の目的は、細胞の表面に存在するMHC分子と形式上結合したペプチドを検出する方法を提供することにある。

【0022】

本発明の目的は、細胞の表面に存在する複数の異なるMHC分子と結合したペプチドを検出する方法を提供することにある。

【0023】

本発明の目的は、MHC分子と結合した外因性タンパク質起源のペプチドを検出する方法を提供することにある。

【0024】

本発明の目的は、MHC分子に関連した内因性タンパク質起源のペプチドを検出する方法を提供することにある。

【0025】

本発明の目的は、対象とする細胞を外因性タンパク質または外因性マイクロorganismと接触させて、対象とする細胞の表面ペプチドのレポーターが、外因性タンパク質と接触させない同一の基準細胞に表示されるレポーターとは異なったものになるようにするプロセスの後に、細胞の表面のペプチドを検出する方法を提供することにある。

【0026】

外因性タンパク質は、*ex vivo*の細胞系統、組織などの、哺乳動物源から抽出した精製調製物、または前記タンパク質を発現するように操作された任意の生体源由来の精製組換え調製物とすることができる。外因性タンパク質は、天然のタンパク質、または1つまたは複数の天然タンパク質の融合を表わすことができる。外因性タンパク質は*in vitro*で誘導したタンパク質、天然の要素の集合または完全に合成されまたは設計されたタンパク質とすることができ、自然界に対応するものがない。

【0027】

外因性タンパク質は、抗体分子およびそれらの誘導体、サイトカイン、成長因子、ロイコトリン、止血因子などのタンパク質クラスを代表することができ、あるいは細胞毒素であることができ、あるいは酵素能力または酵素機能を有することができる。このタンパク質が治療用タンパク質であることが最も好ましい。

【0028】

いくつかの治療用タンパク質の効果は、治療用タンパク質に対する不必要な免疫反応の誘起によって制限されることが認識されている。この例には、モノクローナル抗体 [Schroff, R. W. et al (1985) *Cancer Res.* 45: 879 - 885; Shawler, D. L. et al (1985) *J. Immunol.* 135: 1530 - 1535]、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子などのヒト起源のいくつかのタンパク質 [Wadhwa, M. et al (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 1353 - 1361]、インターフェロン 2 [Russo, D. et al (1996) *Bri. J. Haem.* 94: 300 - 305; Stein, R. et al (1988) *New Engl. J. Med.* 318: 1409 - 1413]などが含まれる。したがって、治療用タンパク質に対する免疫応答の誘起に関与する決定基を識別することができる方法が強く求められている。

【0029】

免疫応答を誘起する主たる要因は、MHCクラスII分子、いわゆるT細胞エピトープ上での提示によってT細胞の活性を刺激することができるペプチドがタンパク質中に存在することである。免疫原性を排除しまたは低減するためには、T細胞エピトープを識別しタンパク質から除去することが望ましい。本発明の目的は、T細胞エピトープの検出および識別を可能にする方法を提供することにある。

【0030】

外因性タンパク質は取り込まれプロセシングされて、DR、DQまたはDP型のMHCクラスII分子と結合して提示される。MHCクラスII分子は、マクロファージなどの抗

10

20

30

40

50

原提示細胞（APC）、樹状細胞によって発現される。所与のMHCクラスII分子と結合してAPCの表面に提示されるペプチドの能力はいくつかの因子、特にその一次配列によって決まる。一次配列は、そのタンパク分解による切断に対する傾向と、MHCクラスII分子のペプチド結合裂内の結合に対するその親和性の両方に影響を与える。APC表面のMHCクラスII/ペプチド複合体は、ペプチドとMHCクラスII分子の両方の露出した残基によって提供される決定基を認識することができる特定のT細胞受容体（TCR）に対して結合面を提示する。当技術分野では、MHCクラスII分子と結合することができる合成ペプチドを識別する手順が存在している。このようなペプチドは、プロセッシング経路または他の現象のため、全ての状況、特に*in vivo*で、T細胞エピトープとして機能しない。さらに当技術分野には、潜在的なT細胞エピトープを予測し、または経験に基づいて決定されたT細胞エピトープ中の配列モチーフを認識する計算方法が存在している。方式には、計算スレディング方法が、可能なヒトMHCクラスII DRアロタイプのサブセットとだけ結合する潜在能力を有するペプチド配列を識別する、W098/52976に提供されているようにMHCクラスIIに結合するペプチドを予測する技法が含まれる。

【0031】

W098/52976およびW000/34317で認識されているとおり、T細胞エピトープ排除の最初の段階はエピトープの識別である。これらの教示では、治療用タンパク質の一次配列内のアミノ酸を慎重に置換することによって、予測したT細胞エピトープを除去する。本発明の目的は、潜在的なT細胞エピトープの数を減らすことによって免疫特性が変更された修飾タンパク質を開発する方法を提供することにある。自然の細胞内プロセッシング事象の後にMHCを含む細胞の表面に存在し、またはMHC製剤に結合した識別された配列は、任意のコンピテントなAPCまたは同種の細胞の範囲内で提示する。さらに、本発明の方式の下で識別されるペプチドは、MHCクラスIIに関してはDR、DQまたはDPのアロタイプを含む、任意のMHCアロタイプまたはアロタイプの混合物から検出することができる。

【0032】

本発明は、特にMHCクラスIおよびクラスII分子と結合して細胞の表面に表示されるペプチドの検出を可能にするが、完全な細胞に限定されるものではなく、エキソソーム（exosome）の表面のペプチドの分析を含む。ペプチド-MHC複合体は、MHCクラスII分子を通常発現している細胞に由来するエキソソームベシクル（exosomal vesicle）の表面に高い濃度で存在する。ある種の状況下では、APCの表面からのエキソソームの排出量を増大させることができ、エキソソームを濃縮または分離する、認められた手順も存在する[Raposo, G. et al (1996) J. Exp. Med. 183: 1161-1172; Clayton, A. et al (2001) J. Immunol. Methods 247: 163-174]。したがって、APC製剤およびAPCに由来するエキソソーム粒子製剤の分析は本発明の範囲に同じように含まれる。

【0033】

まとめると、本発明は以下の事項に係する。

【0034】

・特定の生物活性を有し、かつ同じ生物活性を有する非修飾タンパク質またはポリペプチドよりも低い免疫原性または高い免疫原性を有する薬剤タンパク質またはポリペプチド、あるいはワクチン抗原を開発する方法であって、
 (i) 前記タンパク質またはポリペプチドと細胞とを接触させ、接触させなかった基準細胞上に表示される表面ペプチドのレパートリーとは異なる細胞またはそのエキソソームベシクル上の表面ペプチドのレパートリーを生成させ、
 (ii) 前記細胞またはそのエキソソームベシクルの表面に結合されたペプチドに関して、前記細胞またはそのエキソソームベシクルを分析し、
 (iii) 前記ペプチドを、薬剤タンパク質またはポリペプチド、あるいはワクチン抗原

の配列に標準の方法に従って割り当てることによって実行される方法。

【0035】

・(iv)前記ペプチドを修飾して、前記ペプチドのMHC分子への結合が変更されるようにする段階と、

(v)修飾した1つまたは複数のペプチド配列を、タンパク質またはポリペプチド分子配列内に標準の方法に従って組み込むことによって、最終的な薬剤タンパク質またはポリペプチドの配列変異体を構築する段階と

をさらに含む、対応する方法。

【0036】

・段階(ii)の前記細胞またはそのエキソソームベシクルの分析が、質量分光法(MS) 10
)、好ましくはMALDI-MSおよびESI-MSを使用して実行される、対応する方法。

【0037】

・薬剤タンパク質またはポリペプチドが、前記タンパク質またはポリペプチドと細胞を接触させた後に1つまたは複数の前記ペプチドがもはや結合しないように修飾される、対応する方法。

【0038】

・段階(i)に基づいて細胞またはエキソソームベシクルの表面に結合されたペプチドがMHC分子と結合し、段階(ii)に基づく前記細胞またはそのエキソソームベシクルの分析がMSを使用して実行される、対応する方法。 20

【0039】

・段階(i)に基づいて細胞またはエキソソームベシクルの表面に結合されたペプチドが、細胞内ペプチダーゼおよび転送経路の生成物である、対応する方法。

【0040】

・より低い免疫原性を有する薬剤タンパク質またはポリペプチドを開発するための対応する方法であって、免疫原性ペプチドの修飾が、ペプチドのMHC分子への結合を排除または低減させ、任意選択で、請求項1に指示された細胞表面への結合に関して修飾したペプチドをテストすることによって実行される方法。

【0041】

・MHC分子に対するペプチドの結合の排除または低減が、薬剤タンパク質またはポリペプチド中のペプチドの配列領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基を置換し、挿入しまたは削除することによって実行される、対応する方法。 30

【0042】

・より高い免疫原性を有する薬剤タンパク質またはポリペプチドを開発するための方法であって、ペプチドの修飾が、ペプチドのMHC分子への結合を強化し、任意選択で、請求項1に指示された細胞表面への結合に関して修飾したペプチドをテストすることによって実行される方法。

【0043】

・MHC分子へのペプチドの結合の強化が、ペプチドの配列領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基を置換し、挿入しまたは削除し、T細胞エピトープとして機能するペプチドの活性を増大させ、および/またはT細胞エピトープが拘束されるMHCタイプの範囲を広げ、および/またはいくつかの異なるエピトープを単一の实体に結合することによって実行される、対応する方法。 40

【0044】

・ワクチンの開発方法であって、

(i)免疫原活性を有するタンパク質またはポリペプチドあるいは微生物と細胞とを接触させ、接触させなかった基準細胞上に表示される表面ペプチドのレパートリーとは異なる前記細胞またはそのエキソソームベシクル上の表面ペプチドのレパートリーを生成させ、

(ii)ペプチドが結合した表面に関して前記細胞またはそのエキソソームベシクルを分析し、

(i i i) 前記ペプチドを、タンパク質またはポリペプチドの配列に標準の方法に従って割り当て、

(i v) 1つまたは複数のペプチドを、ワクチン分子配列内に標準の方法に従って組み込むことによって、最終的な薬剤ワクチンの配列変異体を構築することによって実行され、前記細胞またはその中のエキソソームベシクルの分析がMSを使用して実行される方法。

【 0 0 4 5 】

- ・ M H C 分子を産生するように操作されたヒト細胞システムを使用する、対応する方法
- ・ 親 (非操作) 細胞システムが M H C 分子を産生しない、対応する方法
- ・ 親細胞システムが M H C クラス I 分子を産生しない、対応する方法
- ・ 親細胞システムが M H C クラス I I 分子を産生しない、対応する方法。

10

【 0 0 4 6 】

- ・ それ自体の M H C 分子を産生しない非ヒト細胞が M H C 分子を産生するように操作され、指示されるように使用される、対応する方法
- ・ M H C 分子が M H C クラス I I に由来する、対応する方法
- ・ M H C 分子が H L A - D R、H L A - D Q および H L A - D P である、対応する方法。

【 0 0 4 7 】

- ・ M H C 分子が M H C クラス I に由来する、対応する方法
- ・ さまざまな M H C アロタイプおよび遺伝子型の包括的な混合物を提供する細胞システムまたは細胞試料の組合せが使用される、対応する方法
- ・ ペプチドが外因性タンパク質または微生物を起源とする、対応する方法
- ・ ペプチドが内因性タンパク質を起源とする、対応する方法。

20

【 0 0 4 8 】

- ・ タンパク質、ポリペプチドまたは微生物を加えた後に M H C 分子上にペプチドを提示するヒト樹状細胞またはそのエキソソームベシクルが使用される、対応する方法
- ・ タンパク質またはポリペプチドを加えた後に M H C 分子上にペプチドを提示するヒト抗原提示細胞またはそのエキソソームベシクルが使用される、対応する方法。

【 0 0 4 9 】

- ・ ペプチド分析の前に M H C 分子が濃縮される、対応する方法
- ・ 分析の前にペプチドが細胞表面から溶離される、対応する方法
- ・ 分析の前にペプチドが M H C 分子から溶離される、対応する方法
- ・ M A L D I - M S が使用される、対応する方法
- ・ E S I - M S が使用される、対応する方法。

30

【 0 0 5 0 】

- ・ 診断のための検査を開発する方法であって、
- (i) 表面ペプチドに対して適当なヒト細胞を分析し、
- (i i) (a) 細胞表面に現れたあるペプチドの特性を作成し、任意選択で、ヒト細胞に関連した異常または病気を識別するために他の特性と比較し、または (b) 細胞表面上に特異的なペプチドの配列を、ヒト細胞に関連した異常または病気を識別するのに使用することができる特異的なペプチドを決定する手段として決定することによって実行される方法。

40

【 0 0 5 1 】

- ・ 以上に記載のいずれかの方法によって得られたタンパク質またはポリペプチドを薬剤治療実体として使用すること
- ・ 以上に記載のいずれかの方法によって得られたタンパク質またはポリペプチドをワクチンとして使用すること
- ・ 以上に記載のいずれかの方法によって得られたタンパク質またはポリペプチドを、より低い免疫原性を有する薬剤治療実体として使用すること。

【 0 0 5 2 】

タンパク質またはポリペプチドに由来する、細胞またはそのエキソソームベシクルの表面

50

のペプチドを検出する方法であって、

(i) 前記タンパク質またはポリペプチド、あるいはこのタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子と細胞とを接触させ、接触させなかった基準細胞上に表示される表面ペプチドのレパートリーとは異なる細胞またはそのエキソソームベシクル上の表面ペプチドのレパートリーを生成させ、

(i i) ペプチドが結合した表面に関して前記細胞またはそのエキソソームベシクルを分析し、

(i i i) 前記ペプチドを、タンパク質またはポリペプチドの配列に標準の方法に従って割り当てることによって実行され、

細胞またはエキソソームベシクルの分析がMS、好ましくはMALDI-MSによって実行される方法。 10

【0053】

したがって、本発明の第1の主要な実施形態に基づく方式によるプロセスは、本明細書に記載の方法を適用して以下のことを実行する。

【0054】

1. 標的タンパク質のアミノ酸配列内のプロセシングされた1つまたは複数のT細胞エピトープを識別する

2. 識別された潜在的なT細胞エピトープ内の1つまたは複数のアミノ酸が、MHC分子または完全な細胞へのペプチドの結合、あるいは他の手段によって決定されるT細胞エピトープの活性が実質的に低減され、または排除されるように修飾された、標的タンパク質の新規の配列変異体を設計する。重要なのはこのような配列変異体が、配列変異による新規の潜在的なT細胞エピトープの生成が回避されるような方法で生み出されることである。ただし、このような新規の潜在的なT細胞エピトープが、T細胞エピトープの活性を実質的に低減または排除するような方法で修飾される場合にはその限りではない 20

3. このような配列変異体を構築し、望ましい特性を有する1つまたは複数の変異体を識別するために前記変異体をテストする。

【0055】

この方式によれば、いくつかの変異体タンパク質が、好ましくは組換えDNA技術によって産生されテストされる。ただし、化学合成を含む他の手順を企図することもできる。所与の潜在的なT細胞エピトープ内の単一のアミノ酸置換を実行してエピトープを排除することが予想される。単一のエピトープ内の置換の組合せを企図することもできる。 30

【0056】

本発明の主要な一態様では、哺乳動物の細胞の集団をテストタンパク質とともに培養し、またはテストタンパク質をコードする遺伝子を用いてトランスフェクションし、タンパク質の取込みまたは発現およびその分解に続いて、細胞表面のペプチドの特性または同一性を決定する。具体的にはMHC分子、特に複数のMHC分子がこのようなペプチドを提示する。この実施形態の1つの態様として、多くの異なるMHC分子上に提示されるペプチドを分析することが重要であり、したがって分析は、世界の集団で遭遇するMHCアロタイプおよび遺伝子型の非常に高い割合を包含する複数の細胞集団に関して取り組むことが好ましい。このような細胞集団は、世界の集団から複数の細胞集団をサンプリングすることによって、または複数のMHC型を産生するように操作された細胞を使用することによって得ることができる。内因性MHC分子が産生されず、細胞表面に低い背景のペプチドしか表示しない細胞系統は特に役立つ。 40

【0057】

ヒトMHCアロタイプおよび遺伝子型の数は多く、それぞれが所与のタンパク質の異なる特性のペプチドに結合する能力を有するため、T細胞エピトープを包括的に識別する先に説明した以前の方法は、生化学的な方法(ペプチドが多数のMHCタイプに結合するかをテストする)でも、または生物学的な方法(主としてペプチドがT細胞を活性化または刺激するかをテストする)でもなく、主に予測的な方法を含む。MHCクラスIIに結合す 50

るペプチドに対してはこのような予測的方法が、後に続く他のペプチドの予測的分析のために多数のT細胞エピトープ配列を分析してこれらのエピトープに共通するアミノ酸の特定の組合せを決定する、モチーフおよび人工ニューラルネットワーク技法を含む。しかし、MHCクラスIIに関してはこのような予測的方法が制限され、しばしばある割合のT細胞エピトープが見落とされ(偽陰性)、または実際にはこのような活性を欠くにもかかわらずあるペプチドをT細胞エピトープと判定する(偽陽性)。予測的方法、ならびに合成ペプチドを用いる生化学的および生物学的方法の他の主な限界は、ペプチドがMHC分子によって存在することにより影響しうる所与のタンパク質のプロセッシングを考慮できないことである。したがって、偽陰性または偽陽性をそれほど生じさせずにT細胞エピトープを正確かつ包括的に識別する改良式の方法が求められており、本発明はこのような改良を提供する。

10

【0058】

本発明の第1の実施形態に基づくヒト薬剤タンパク質の開発に関する特定の応用は、それによってヘルパーT細胞を活性化させおよび/または刺激するエピトープが除去されるタンパク質を生成することである。この場合、第一の関心事は、MHCクラスIIによって提示されるペプチドである。高い割合のヒトに対して有効な薬剤タンパク質を開発するためには、多数のMHCアロタイプのうちの1つまたは複数のアロタイプによって提示されるタンパク質内のペプチドを識別し、次いでこれらのペプチドを改変してMHC結合に対する能力を除去することが必要である。以前には、MHCクラスIIによって提示されるペプチドの包括的な識別は、このようなペプチドを正確に予測することが難しく、多数の異なるアロタイプおよび遺伝子型のヒトMHCクラスII分子のうちの1つまたは複数の分子に結合するペプチドを予測することが難しいために制限された。予測の信頼度がより高いMHCクラスIに結合するペプチドに比べて、MHCクラスIIに結合するペプチドは長さが多様であり、ペプチド結合に対してより大きな影響を有する主要な結合ポケットの外側にアミノ酸を有する。したがって、MHCクラスIIに対しては、潜在的なT細胞エピトープを包括的に識別するために、多数のMHCクラスIIアロタイプおよび遺伝子型のうちの1つまたは複数に結合するペプチドを予測しまたは検出するのに現在使用可能な方法よりも正確かつ包括的な方法が求められている。このような方法を使用できる主な利益は、全ての主要なT細胞エピトープ(または全てのT細胞エピトープ)が識別され除去された薬剤が生成されることにある。

20

30

【0059】

本発明を使用して薬剤を開発する好ましい1つの方法は以下の段階を含む：

1. 薬剤として潜在的に使用するためのテストタンパク質に関し、選択したヒト細胞系統またはヒト細胞試料にこのタンパク質を加える段階
2. 適当な期間の後、表面ペプチドについて細胞を分析する段階。具体的には、細胞に直接にMALDI-MSを使用し、または細胞画分、特にMHC画分にMALDI-MSを使用し、あるいは特にMALDI-MSまたはESI-MSによる分析の前に細胞表面からペプチドを溶離して分析する
3. 所与のタンパク質から、細胞表面に現れたペプチドをテストタンパク質に割り当てる段階
4. (2)で細胞表面に現れたペプチドを修飾してMHC分子への結合を排除する段階。いくつかのケースでは、修飾されたペプチドを細胞表面への結合に関してテストする(上記)
5. タンパク質配列中の1つまたは複数のペプチドに適当な修飾を組み込んでMHC分子への結合を排除することによって、最終的な薬剤タンパク質分子を生成する段階。

40

【0060】

本発明の第2の主要な実施形態によれば、ワクチン分子またはワクチンとして機能することができる分子を開発することができる方式が提供される。ヒトに使用されるワクチンが最も好ましいが、この方式は、ヒト以外の種の病気の治療または予防のためのワクチン分子の開発にも同じように適用することができる。本発明を使用したワクチンの開発に關す

50

る特定の応用は、それによってT細胞を活性化させ、および/または刺激する主要なエピトープ、主にヘルパーT細胞に対するエピトープが存在し、さらに細胞殺滅を必要とする応用に対しては細胞障害性T細胞に対するエピトープ(主にMHCクラスI拘束)が存在するペプチドまたはタンパク質を生成することである。高い割合のヒトに対して有効なワクチンを開発するためには、多数のMHCアロタイプおよび遺伝子型のうちの1つまたは複数によって提示されるタンパク質内のペプチドを識別し、次いでこれらのペプチドの中から、最終的なワクチン分子に含める1つまたは複数のエピトープを選択することが必要である。このようなエピトープは、MHCクラスIまたはMHCクラスII、あるいはその両方によって拘束されたペプチドを含むことができる。本発明は、MHCクラスIおよびクラスIIによって提示されるペプチドのこのような識別を提供し、したがって本発明は、より有効なワクチンを開発する基礎となる。

10

【0061】

MHCクラスIエピトープとMHCクラスIIエピトープの主な違いは、MHC-ペプチド複合体中のペプチドが通常それから誘導されるタンパク質の主な起源にある。外因性タンパク質は主に、MHCクラスIIと結合したペプチドを生じ、細胞内から発現される内因性タンパク質は、異なるペプチダーゼおよび細胞内転送経路に従ってプロセッシングされて、細胞表面のMHCクラスI分子と主に結合する。外因性タンパク質でも、または内因性タンパク質でも、一連のプロセッシング段階の間に、通常ならMHCに結合するタンパク質由来のあるペプチド配列が破壊される可能性があり、そのため、あるT細胞エピトープはイン・ビボ(in vivo)で産生されない。このようなペプチドに関して予測的(または生化学的/生物学的)方法は、T細胞エピトープの識別におけるプロセッシングを考慮することができない。本発明の特徴は、細胞表面から識別されるペプチドが、細胞内処理および転送経路を介して通過することができるとしてAPC(または他の細胞)によって選択されたペプチドであることである。本発明はプロセッシング事象の真の産物の識別に集中するので、本発明では、エピトープ識別の予測的またはイン・ビトロ(in vitro)方法を使用して識別される偽陽性および偽陰性エピトープの割合が低減する。

20

【0062】

したがって、本発明の第2の主要な実施形態に基づく方式によるプロセスは、本明細書に記載の方法を適用して以下のことを実行する。

【0063】

1. 標的タンパク質のアミノ酸配列内の1つまたは複数のT細胞エピトープを識別する
2. 1つまたは複数のアミノ酸が修飾された標的タンパク質の新規の配列変異体を、以下のいずれかの方法で設計する
 - i) T細胞エピトープの活性を増大させ、および/または
 - ii) MHC分子または完全な細胞へのペプチドの結合あるいは他の手段によって決定されるようにT細胞エピトープが拘束されるMHCタイプの範囲を広げ、および/または
 - iii) いくつかの異なるエピトープを単一の(より小さな)実体に結合する
3. このような配列変異体を構築し、望ましい特性を有する1つまたは複数の変異体を識別するために前記変異体をテストする。

30

【0064】

この方式によれば、いくつかの変異体タンパク質が、好ましく組換えDNA技術によって産生されテストされる。ただし、化学合成を含む他の手順を企図することもできる。

40

【0065】

したがって、本発明を使用してワクチンを開発する好ましい1つの方法は以下の段階を含む

1. ワクチンとして潜在的に使用するためのタンパク質に関し、選択したヒト細胞系統またはヒト細胞試料にこのタンパク質を加える段階
2. 適当な期間の後、表面ペプチドに関して細胞を分析する段階。具体的には、細胞に直接にMALDI-MSを使用し、または細胞画分、特にMHC画分にMALDI-MSを使用し、あるいは特にMALDI-MSまたはESI-MSによる分析の前に細胞表面が

50

らペプチドを溶離して分析する

3. 所与のタンパク質から、細胞表面に現れるペプチドをテストタンパク質に割り当てる段階

4. (2)で細胞表面に現れた1つまたは複数のペプチドを、最終的なワクチン分子で使用するために選択する段階。

【0066】

薬剤またはワクチンとして使用する細胞表面ペプチドの分析に関しては、異なるMHCアロタイプおよび遺伝子型の包括的な混合物を提供する細胞系統またはヒト細胞試料の組合せを使用することができること、およびこのような天然の細胞試料が、MHCクラスIおよび/またはクラスII拘束エピトープの包括的な混合物を提供することを理解されたい。テストタンパク質の添加後に活性化してMHC分子上に効率的にペプチドを提示することができるヒト樹状細胞(またはエキソソーム)は特に役立つ。あるいは、主にもう1つのMHCタイプをこれらの細胞にコードする遺伝子のトランスフェクションによって、これらのMHCレパートリーを拡張するようにヒト細胞系統を操作することができ、したがって細胞表面ペプチドの分析に関して複数のMHCタイプを有する細胞が産生される。マウスMHC遺伝子が削除されまたはその他の方法で無能にされたマウス細胞など、それ自体のMHC分子を産生しない非ヒト細胞が特に役立つ。細胞表面ペプチドの分析はさらに、ペプチド分析の前にMHC分子を例えば免疫アフィニティカラムを使用して濃縮する任意選択の段階を含む。MHCクラスIIに関しては、細胞表面ペプチドの分析のための本発明の方法は、DR以外のアロタイプへの結合の分析を提供するという特定の利点を有する。(DRの鎖とは対照的に)MHC分子の両方の鎖が結合に寄与すると考えられるDQに対して使用可能な予測的な方法がないため、DQ、DPなどのアロタイプによるペプチド提示の分析は非常に困難であった。

【0067】

本発明の主要な第3の態様によれば、診断のための検査の開発に本発明を適用する方式が提供される。この実施形態の特定の応用は、特定の病気または細胞の傷害を指示するペプチドの異常な存在、不在またはパターンを識別するために、細胞表面に提示されたペプチドの特性を生成することである。

【0068】

したがって本発明の目的は、対象とする細胞を外因性タンパク質または生物、あるいは他の作用因子と接触させて、対象とする細胞の表面ペプチドのレパートリーが、外因性タンパク質または生物と接触させない同一の細胞に表示されるレパートリーとは異なったものになるようにするプロセスの後に、細胞の表面のペプチドを検出する方法を提供することにある。本発明の実施では、「診断ペプチド」または「インジケータペプチド」の存在を、MS機器の質量スペクトル中のインジケータペプチド質量のレジストレーションによって、またはCID(または同種の)スペクトル中のインジケータペプチド配列の記録によって分離することができる。同様に、インジケータペプチドの存在を、外因性タンパク質または作用因子と接触させない基準試料に由来する質量スペクトルに関して指示することができる。このような比較分析は、インジケータペプチドの質量が知られておらず、またはどのようにしても予測できない場合に特に価値がある。比較分析は、同一の質量ピークの減算によって*in silico*で実施することができ、特定の質量ピークの損失が診断インジケータである場合に特定の価値がある。生体試料の比較分析でMS技法が利用されている。しかし、Liotta他[W00049410]の場合には、このような比較分析を、レーザ捕獲マイクロ切開によって得られた個々の細胞のタンパク含量に焦点を置く。これは、診断(比較、減法など)が、表面から検出されたペプチド、特に細胞表面のMHC分子と結合したペプチドに基づく本発明とは異なる。

【0069】

MS技術を使用する他の診断技法には、Little他[US6207370]の技法が含まれる。Little他は、獲得した状態ではない個体の体質的特徴である遺伝子病の識別を対象とするMSベースの診断手順を開示している。この手順では、個体の遺伝的素

10

20

30

40

50

質に依存する集団内で可変である標的タンパク質の質量を識別することができる。他の診断方式が、Geng他によって開示されている [Geng, M. (2000) J. Chromatography A. 870: 295-313]。Geng他は、血清タンパク試料のトリプシン分解物から得られたMALDI-TOFスペクトルを分析した。そのプロセスは、複雑な混合物中に存在する検体タンパク質の存在の徴候を示す「シグネチャペプチド (signature peptide)」を検出する。これも、診断 (比較、減法など) が、表面から検出されたペプチド、特に細胞表面のMHC分子と結合したペプチドに基づく本発明とは異なる。

【0070】

したがって、本発明の方式によれば、診断のための検査を開発する好ましい1つの方法は以下の段階を含む 10

1. 表面ペプチドに関して適当なヒト細胞を分析する段階。具体的には、細胞に直接にMALDI-MSを使用し、または細胞画分、特にMHC画分にMALDI-MSを使用し、あるいは特にMALDI-MSまたはESI-MSによる分析の前に細胞表面からペプチドを溶離して分析する

2. 細胞表面に現れたあるペプチドの特性を産生し、必要ならば、ヒト細胞に関連した異常または病気を識別するために他の特性と比較し、または細胞表面上に特異的なペプチドの配列を、ヒト細胞に関連した異常または病気を識別するのに使用することができる特異的なペプチドを決定する手段として決定する段階。

【0071】

本発明の全ての実施形態に関して、さまざまなタンパク質配列データベースへの容易なアクセスおよび増大するその内容のため、ペプチドの同一性を決定するために完全な配列を得ることはそれほど重要ではない。親イオンの既知の質量に対して少量の内部配列情報 (2~3残基とすることができる) だけで、ペプチド化学種を特徴づけるのに十分であることもある。連続するフラグメントのイオンデータセットのデータベースを検索するアルゴリズムが使用可能であることを認識されたい。これらの例には、ProteinLynx Global Serverサーチアルゴリズム (Micromass社, Wythenshawe, 英)、Matrix Science社のMascot [www.matrix.com]、Protein Prospectorのプログラムセット [http://prospector.ucsf.edu] などが含まれる。このようなプログラムは、対象とするペプチドの質量を有するデータベースの配列エントリの断片化をシミュレートする。 20

【0072】

以下の非限定的な例によって本発明をさらに説明する。

【0073】

実施例 1

細胞表面HLA DRに結合したペプチドをMALDI-tofを使用して検出する方法EBVで形質転換したヒトB細胞系統JESTHOMおよびBSMを、ECACC社 (Porton Down, 英) から入手した。B細胞系統JESTHOMはHLA-DR1*0101に対して同型接合性、系統BSMはDRB1*0401に対して同型接合性である。細胞系統は、供給業者が推奨する条件を使用してin vitroで培養した。供給業者が推奨する条件を使用して培養したマウスNSO細胞 (ECACC # 85110503) を陰性の対照細胞系統として使用した。 40

【0074】

合成ペプチドは、Zeneca社から入手した (Zeneca LSM, Northwich, 英)。ペプチドHA1は、インフルエンザウイルス血球凝集素タンパクの残基307~319に対応する13量体である (Rothbard, J. B. et al (1988) Cell 52: 515)。ペプチドMP1は、インフルエンザウイルス基質タンパク質の残基17~29に対応する13量体である [Rothbard, J. B. et al (1988) ibid]。これらのペプチドはともに、特異的にいくつかの異なるHL 50

A - DR と結合することが知られているが、DR 4 アロタイプとの差動結合が見られる。MP 1 は DR 4 に結合するが、MP 1 は、DR 4 にあまり結合しない [Busch R. et al (1990) Int. Immunol. 2 : 443]。

【0075】

いくつかの実験に関しては、不安定なビオチンリンカー部分を含む類似体ペプチドを使用した。これらに関しては、リンカービオチン - HPDP (Pierce 社, Chester, 英) を N 末端システイン残基に結合させて、ペプチド HA 1 B および MP 1 B を得た。追加のシステイン残基を除いてこの配列は HA 1 および MP 1 と同一である。結合は、ビオチン - HPDP (Pierce 社, Chester, 英) とともに提供されたプロトコルを使用して行なった。ただし、結合させたペプチドの精製は、HPLC および標準溶離プロフィールを使用して実施した。精製されたモノクローナル抗体 LB 3.1 [ATCC ナンバー HB - 298] を使用して阻害実験を実施した。抗体は、プロテイン A セファロース (Millipore 社, Conset, 英) アフィニティークロマトグラフィーおよび供給業者が推奨する手順を使用してハイブリドーマ LB 3.1 調整培地から精製した。ハイブリドーマは標準条件を使用して維持した。LB 3.1 は、ペプチドおよび細胞とともに最高濃度 10 μ g / ml で培養した。

10

【0076】

細胞は、テストおよび対照実験で異なる合成ペプチドで処理する前にパラホルムアルデヒドで固定した。実験は、最終濃度 50 μ M のペプチドを含むペプチド結合緩衝液 (pH 4.0 のリン酸クエン酸塩緩衝液 50 mM ; 0.1% NP 40) 150 μ l に加えた完全培地 50 μ l 中の 3×10^6 個の細胞を使用して実施した。培養は 37 $^{\circ}$ C で 24 時間実施した。検定に関しては、ペプチド処理した細胞を遠心分離によって回収し、それらを PBS で 3 回洗浄した。細胞は、50% アセトニトリル - 0.1% トリフルオロ酢酸 10 μ l の入った 0.5 ml 微量遠心管に入れた。続いてそれぞれの試料を 5 秒間激しく混合し、その後、MALDI 機器の試料プレートに試料をスポッティングした。2 層試料スポッティング法を使用した。この方法では、酸基質溶液 [アセトニトリル、メタノールおよび水の 1 : 1 : 1 混合物に溶解した 0.1 M シナピン酸] 1 μ l を MS 試料プレート上で乾燥させる。続いて細胞 1 μ l およびシナピン酸基質溶液 1 μ l をスポットした。

20

【0077】

不安定なリンカー質量 - タグを含む合成ペプチドを使用する実験では、100 mM -メルカプトエタノール (BME) を含む PBS 中での細胞の培養によってリンカーの除去を達成した。BME を用いた培養は 37 $^{\circ}$ C で 30 分間実施し、細胞は PBS を使用して 3 回洗浄してから、先と同じように MALDI 試料プレートへ適用した。

30

【0078】

Voyager DE 質量分析計 (Perseptive Biosystems 社, Foster City, カリフォルニア州) は陽イオンモードで使用した。この機器は、ウマ心臓アポミグロビンとウシ血清アルブミンの混合物 (Sigma 社, Poole, 英) で校正し、それぞれの分析前 30 分以内に、質量の正確さがそれぞれの標準に対して 0.1% 以内であることをチェックした。試料スポットは空気乾燥し、陽イオンモードで分析した。遅延抽出は 25 kV、150 ナノ秒にセットした。低質量ゲートは 600 Da にセットした。それぞれの試料から合計 125 レーザショット分を累積した。

40

【0079】

JESTHOM 細胞から生み出されたスペクトル中に、ペプチド HA 1 および MP 1 の予測された質量ピークが識別された。対照的に、HLA DR 4 を発現する BSM 細胞からはペプチド HA 1 だけしか識別できなかった。標識化したペプチドを使用した実験では、BME 処理した細胞のスペクトル中にペプチドピークの質量シフトが識別された。LB 1.1 培養細胞 (阻害実験) からのスペクトルは、抗体処理によってペプチド結合をなくすことができなかったことを示した。ただし、ペプチド、標識化したペプチドおよび LB 1.1 抗体を使用した三者間の競合検定では、低減された相対的なイオン存在度のいくつかの証拠を見つけることができた。ペプチドまたはペプチドの組合せで処理したマウ

50

スNSO細胞からのスペクトルは、標的イオンピークの非常に低い存在度を示し、細胞処理中の非特異的相互作用および/または不十分な洗浄を示唆している。

【0080】

実施例2

MHC DRに結合したペプチドをMALDI-tofを使用して分析する方法
免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、JESTHOM細胞膜からHLA-DR1*0101を精製した。BSM細胞からHLA-DRB1*0401を精製した。可溶化された細胞膜は先に記載したとおりに準備し処理した[Gorga et al (1987) J. Biol. Chem. 262:16087-16094、Sette et al (1989) J. Immunol. 42:35-40]。抗DRモノクローナル抗体LB3.1 [ATCCナンバーHB-298]を免疫アフィニティ試薬として使用した。抗体は、プロテインAセファロース(Millipore社, Conset, 英)アフィニティークロマトグラフィーおよび供給業者が推奨する手順を使用してハイブリドーマLB3.1調整培地から精製した。ハイブリドーマは標準条件を使用して維持した。LB3.1抗体は、Invitrogen社(Invitrogen, Groningen, オランダ)によって提供されたLinxシステムおよび供給業者が推奨する条件を使用して、セファロース4B(Pharmacia Biotech社, St. Albans, 英)に結合させた。

【0081】

実施例1で説明した合成ペプチドHA1およびMP1を、HLA-DR1*0101製剤50μlとともに培養した。ペプチドは、最終濃度50μMのペプチド結合緩衝液(pH4.0のリン酸クエン酸塩緩衝液50mM; 0.1%NP40)中で37℃で26時間培養した。結合していないペプチドは、microcon遠心ろ過セル(Millipore, 米)を使用した限外ろ過およびPBSを用いた複数回の洗浄サイクル(最低4回)によって除去した。最終的な体積は20μlまで低減した。いくつかの実験では、MALDI-tof分析の前にペプチドをMHCから溶離させた。この場合、溶離は、0.1%TFA水溶液を用いた抽出によって実施した。溶離液は蒸発乾固させ、実施例1で示したMALDI基質溶液を使用して直接に再懸濁させた。他の実験では、基質溶液に再懸濁させたMHC-ペプチド複合体を機器試料プレートに適用した。

【0082】

HLA-DR1*0101製剤から生み出されたスペクトル中に、ペプチドHA1およびMP1の予測された質量ピークが識別された。対照的に、DRB1*0401製剤のスペクトルではHA1の質量ピークだけが識別できた。

【0083】

実施例3

完全タンパク質を用いて細胞を処理した後に細胞表面ペプチドを分析するための方法
健康な供血者から得た末梢血試料40mlからヒト樹状細胞を濃縮した。血液は、ヘパリン、histopaque1077(Sigma社, Poole, 英)密度勾配培地を使用して調製した単核細胞画分および供給業者が推奨する条件を使用して凝固しないようにした。樹状細胞は、イムノマグネティック分離手順を使用したネガティブセレクションによって得た。試薬および条件は全てMitenyi Biotech社(Bisely, 英)によって提供されたものを使用した。樹状細胞は、タンパク質抗原で処理するため多穴式組織培養皿中に溶離させた。細胞は実験の進行中、10%(v/v)ウシ胎児血清および標準抗生物質を補ったRPMI培地中に維持した。全ての試薬は全てLife Technologies社(Paisley, 英)のものを使用した。

【0084】

これらの研究では組換えスタフィロキナーゼ製剤を使用した。Genosys Biotechnologies社(Cambridge, 英)による契約の下で野生型スタフィロキナーゼ遺伝子を合成した。この遺伝子は、オーバーラップ合成プライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応、およびCollen他によって与えられた配列[Collen

D. (1996) *Circulation* 94:197-206]によって構築した。合成遺伝子は、453 bp *EcoRI*-*HindIII*制限断片として、細菌性発現ベクター pMEX (MobiTec社, Göttingen, 独) にクローン化した。pMEX/スタフィロキナーゼ遺伝子は、標準技法によって適当な大腸菌株 TG1 を形質転換させ、活性スタフィロキナーゼを分泌している単一の形質転換クローンを、フィブリンプレート検定を使用して選択した [Astrup, T. et al (1952) *Arch. Biochem. Biophys.* 40:346-351、Collen, D. et al (1992) *Fibrinolysis* 6:203-213]。最もよく発現したクローンを成長させ、シーケンシャルカラムクロマトグラフィーおよび先に記載した方法 [Collen, D. et al (1992) *ibid.*、Schlott, B. et al (1994) *Biotechnology* 12:185-189] を使用して培養液上清から組換えタンパク質を精製した。

10

【0085】

樹状細胞は、濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製スタフィロキナーゼとともに一晩培養した。いくつかの実験では、培地に添加された阻害剤混液を使用して抗原プロセッシングをブロックした。阻害剤は、テストタンパク質を加える 1 時間前に以下の濃度で加えた：塩化アンモニウム 50 mM；アジ化ナトリウム 1 mg/ml；クロロキンおよびコルヒチン 500 μM 。化合物は全て Sigma 社 (Sigma, Poole, 英) のものを使用した。

【0086】

タンパク質処理の後、培養皿から細胞を取り出し、3 サイクルの遠心分離 / PBS 処理を使用して洗浄して、全ての培地および外来性のタンパク質を除去した。細胞は、MALDI-ToF 分析のために実施例 1 に示したように処理した。スペクトルを集め、テストタンパク質に由来する存在ペプチドに関して分析した。これらは、スタフィロキナーゼで処理していない対照細胞から得られたスペクトルと比較することによって識別した。

20

【0087】

スタフィロキナーゼによるものと考えられるイオンピークは、スタフィロキナーゼで処理した細胞から得られたスペクトル中で識別されたが、代謝阻害剤で処理した細胞のスペクトルおよびまたはスタフィロキナーゼで処理しなかった対照細胞では見られなかった。

【0088】

実施例 4

完全タンパク質を用いた細胞処理から得られたペプチド配列を決定する方法

対象とするタンパク質を用いて実施例 3 の方法に従って細胞を処理した。ペプチドは、5% アセトニトリル、0.1% 蟻酸溶液を用いた多回抽出サイクル (4~6 回) によって細胞から溶離させた。テストタンパク質に由来する配列の存在は ESI-MS/MS を使用して決定した。

30

【0089】

溶離させた試料は乾燥し、0.1% 蟻酸溶液中に再懸濁させた。未処理の溶離液全体を、質量分析計の Z スプレー源に直接に接続されたモジュラー CapLC システム (MicroMas社, Wythenshawe, 英) によって分離した。試料は、流量 30 $\mu\text{L}/\text{分}$ で C18 プレカラムにロードし、0.1% 蟻酸溶液を使用して 3 分間脱塩した。流量を 1 $\mu\text{L}/\text{分}$ まで低減させ、C18 180 mm pepmap カラム上にリダイレクトした。カラムは、95% H_2O 、5% アセトニトリル、0.1% 蟻酸の溶媒溶液から 5% H_2O 、95% アセトニトリル、0.1% 蟻酸の溶媒溶液までの標準溶離勾配を使用して溶離させた。

40

【0090】

Z スプレーナノフローエレクトロスプレーイオン源が取り付けられた MicroMas Q-ToF 2 機器 (MicroMas社, Wythenshawe, 英) 上でエレクトロスプレー MS および MS/MS データを得た。装置は陽イオンモードで動作させ、源温度は 80、カウンターガス流量は 40 L/時間とし、ナノスプレー連続 LC プロブには 2800 V の電位を印加した。データは全て、機器を自動データ依存スイッチングモ

50

ードで動作させて得た。

【0091】

機器は、グルフィブリノペプチドb (glufibrinopeptide b) の衝突誘導分解に起因する2点較正被選択断片イオンを用いて較正した。データは全てProteinLynxソフトウェアによって自動的に処理し、タンパク質識別は、ProteinLynx Global Serverサーチアルゴリズム (Micromass社, Wythenshawe, 英) を用いた分析によって行なった。

【0092】

ホウケイ酸塩針を通して生の試料を機器に注入することによって手動データ収集を実行した。試料を濃度約1 μ Mに調整した。試料は注入前に、使い捨てC18 ZipTipミニカラム (Millipore社, 米) を使用して脱塩した。

10

【0093】

スペクトルを収集し、テストタンパク質に由来する存在ペプチド質量に関して分析した。これらは、抗原処理がブロックされた細胞を含む対照細胞から得られたスペクトルと比較することによって識別した。スタフィロキナーゼを用いた処理後に、スタフィロキナーゼによるものと考えられるペプチド質量が識別された。スタフィロキナーゼで処理しなかった細胞でも、または代謝阻害剤で処理した細胞でも等しいイオンピークは明らかでなかった。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/12899 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/569 (81) Designated States (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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/EP01/08625
- (22) International Filing Date: 26 July 2001 (26.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0018901.9 3 August 2000 (03.08.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOVATION LIMITED [GB/GB]; Investment House, 6 Union Row, Aberdeen AB10 1DQ (GB).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CARR, Francis, J. [GB/GB]; Birechlea, The Holdings, Balmedie, Aberdeen AB23 8XU (GB); CARTER, Graham [GB/GB]; Longhills Cottage, By Newmachar, Aberdeenshire AB21 7XB (GB); HELLENDORF, Koen [GB/GB]; 307 Hethersett Close, Newmarket CB8 7AT (GB).

(74) Agent: BENZ, Jürgen; c/o Merck Patent GmbH, 64271 Darmstadt (DE).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/12899 A2

(54) Title: PEPTIDES PRESENTED BY CELLS

(57) Abstract: The present invention relates to methods to determine peptides presented on the surface of mammalian cells following addition to the cells of a protein. The present invention also relates to diagnostic tests based on the determination of such peptides or modified molecules resulting from determination of such peptides, such as pharmaceutical entities preferably having specific biological activity and reduced or enhanced immunogenicity when compared with the corresponding non-modified molecules. The methods according to this invention are preferably established with tools using mass spectroscopy (MS).

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

PEPTIDES PRESENTED BY CELLS

The present invention relates to methods to determine peptides presented on the surface of mammalian cells following addition to the cells of a protein. The present invention also relates to diagnostic tests based on the determination of such peptides or modified molecules resulting from determination of such peptides, such as pharmaceutical entities preferably having specific biological activity and reduced or enhanced immunogenicity when compared with the corresponding non-modified molecules. The methods according to this invention are preferably established with tools using mass spectroscopy (MS).

Following the uptake of proteins by mammalian cells (or the production of specific proteins within cells), proteins are subsequently degraded and, commonly, peptide fragments of such proteins appear at the cell surface, often associated with other proteins. In particular, peptide fragments of a protein can be degraded and certain peptides subsequently become associated with major histocompatibility complex (MHC) molecules which, in many cases, can be recognised by T cells in order to initiate an immunological response. Such an immunological response can be beneficial, for example where the immune system counteracts cells producing the specific protein from where the peptide fragments are derived, or can be detrimental, for example where the immune system produces antibodies which bind to the specific protein and limit its activity (such as with a pharmaceutical protein).

To date, for a given protein, it has been impossible to predict exactly at which locations within the protein that degradation takes place such that the exact peptides, which appear on the cell surface, cannot be reliably predicted. In the case of MHC molecules, there has been some success in predicting the motifs of peptides which bind to MHC but, in practice, some of these peptides are degraded before reaching MHC molecules and prediction of which peptides are degraded is not reliable. Thus, the standard method for detection of peptides on the cell surface is elution of such peptides followed by their sequence determination. Such methods are not routine and are also impractical where analysis of cell surface peptides on multiple cell types or on multiple MHC molecules is required.

CONFIRMATION COPY

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 2 -

It is an object of the present invention to provide for methods for detecting peptides on the surface of cells especially presented by multiple MHC molecules. Furthermore, it is an object of the invention to use such information either for design of a pharmaceutical molecule, or for design of a vaccine molecule, or for a diagnostic test.

5 For a pharmaceutical molecule, it is a particular object of the present invention to identify peptides presented by MHC molecules following uptake or production of a protein by cells and, using this information, to alter the protein such that such peptides are no longer presented.

10 For a vaccine molecule, it is a particular object to identify peptides presented by MHC molecules following uptake or production of a protein by cells and to use one or more of such peptides within a vaccine molecule in order to stimulate the immune system.

15 For both pharmaceutical and vaccine molecules, it is a particular object of the present invention to identify peptides presented by many different MHC molecules to encompass different allotypic and genotypic variants throughout different populations.

20 For a diagnostic test, it is a particular object to determine peptides presented by MHC molecules following uptake or production of a protein by cells and to use such determination as the basis for a test for the detection of a biological or physiological event, for example for the detection of an infection.

25 For a diagnostic test, it is a particular object of the present invention to identify peptides presented by cells of a test individual.

The present invention provides for the accurate and comprehensive analysis of peptides on the surface of cells and in particular peptides in association MHC molecules. Determination of the profile or identity of peptides on the cell surface will be especially performed mass spectrometry (MS).

30

Others have previously purified MHC/peptide complexes for particular purposes. Indeed for both MHC class I and class II molecules, methods for their immunological

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 3 -

enrichment and purification have been instrumental in enabling the elucidation of the peptide-MHC binding interaction and enabled the elucidation of MHC binding motifs. Pertinent examples include US5,989,565 and US,6,077,519 wherein are provided methods for the identification of autologous T-cell epitopes by acid elution of peptides from the surface of patient tumour cells or dendritic cell populations. The eluted peptide sequences have utility in the design of synthetic peptides for the production of vaccines.

Similarly, Salter et al [US5,487,982] provide genetically engineered temperature-sensitive MHC class I molecules enabling the facile removal of peptides bound to the mutant MHC class I molecule from engineered cells grown *in vitro*.

Further examples of the art include Langlade-Demoyen et al [WO9744667] who exploit purified MHC-peptide complexes as affinity reagents for the enrichment of tumour specific T-cells for tumour immunotherapies *in vitro* and *in vivo* and other applications. Similarly, US5,763,585, US5,734,023 and others provide methods for the purification of particular MHC peptide complexes for use as therapeutic entities for example in the treatment of auto-immune diseases and, Deshpande et al [WO9740852] disclose modified peptides with enhanced binding to an MHC class II protein and where the whole complex is provided as a recombinant fusion protein also intended for use in the treatment of diseases associated with auto-reactive T cells.

WO9734143 and US5,792,604 provide methods for identifying MHC class I restricted antigens endogenously processed by cellular secretory pathway. This biological assay requires primed cytotoxic T cells and a source of "indicator" target cells onto which lysis is directed by the presence of processed peptides secreted into the medium. The scheme has utility in the identification of substances able to influence the endogenous processing pathways of the donor cells. Other complex biologically based schemes for the identification MHC class I and MHC class II restricted T-cell epitopes include WO00/67761 where is provided a method exploiting genetic vaccination and isolation of dendritic cells and splenocytes for conducting biological T-cell activation assay *in vitro*.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 4 -

The present inventors have recognised that MS-based instruments may be applied to the analysis of whole cells or cell extracts and the data incorporated into a pathway for the rational development of therapeutic molecules or diagnostic assays.

5 Large and complex molecules of biological origin are amenable to analysis using mass-spectroscopy (MS), but only following their ionisation. Two alternative approaches to the ionisation of biological molecules for MS have become the recognised technologies in this area. These are electrospray ionisation (ESI) and matrix assisted laser de-sorption ionisation (MALDI). In ESI the sample is pumped
10 through a charged narrow capillary and nebulised by a parallel gas flow until ultimately electrostatic repulsion causes desorption of the analyte ions into the mass spectrometer. ESI is a continuous flow technique and as such is readily connected to up-stream sample separation technologies such as liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis (CE) [Cao & Moini (1998) *Am. Soc. Mass Spectrom.* 9: 1081-
15 1088]. These features are in contrast to MALDI-MS techniques where the sample is embedded within a crystalline matrix material deposited on the sample plate of the instrument. Ionisation is achieved by laser excitation of the matrix and the desorbed analyte ions are accelerated into the mass analyser. MALDI is therefore a discontinuous process and multiple laser pulses are used to produce ions with data
20 cumulatively collected in the mass analyser.

For MALDI, mass analysis is most usually conducted by a time of flight (TOF) instrument where the flight time from the ionising laser pulse to detection is measured enabling calculation of the mass to charge ratio (m/z). Such detectors are subject to
25 multiple technical refinements in different commercial instruments. Some models enable analysis of post-source decay ion fragments for peptide sequence derivation and other structural determinations. The continuous flow nature of ESI based instruments result in the use of scanning analysers (e.g. quadrupole or magnetic sector mass analysers) although other instrument formats may be exploited. A typical
30 format is the tandem MS system whereby dual mass analysers are arranged in tandem and interconnected via a "collision cell" containing molecules of inert gas. The latter feature enables generation of collision induced decay ions and the determination of peptide sequence from the given input sample. Multiple and hybrid

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 5 -

instrumental formats may be arranged and exploited for the analysis of cell surface (MHC) associated peptides.

Others have used MS in the analysis of peptides eluted from MHC and in particular MHC class I molecules as reviewed by Cox et al [Cox, A. L. et al (1997) pp 141-160 in *MHC1: A Practical Approach* Eds Fernandez N. & Butcher G. Oxford University Press, Oxford, UK] and a more recent review of this area is provided by De Jong [De Jong, A. (1998) *Mass Spectrometry Reviews* 17: 311-335]. Thus Ovysyannikova et al [Ovysyannikova et al (2001) *J. Immunol. Methods* 246: 1-12], exploit MALDI-TOF in the analysis of self peptides acid eluted from MHC class II allele DRB1*0401 following treatment of the cells with measles virus vaccine. Similarly, Sickman et al [Sickman, A. et al (2000) *Analyst* 125: 569-573] describe the identification of MHC class II bound peptides from rat Langerhans cells using a combination of LC and MALDI-MS techniques.

The present invention however, incorporates and extends all such prior art by for the first time providing a generalised scheme for the elucidation of peptide species binding to MHC class I and MHC class II molecules using MS based instrumentation and in the first embodiment provides methods for the removal of the binding interaction by amino acid substitution within the peptide sequence for the purpose of developing a therapeutic protein with a reduced or absent ability to provide an MHC-mediated immune response on administration to a subject, most preferably a human subject. It is an objective of the present invention to provide a method for the development of a therapeutic molecule with reduced capacity to elicit an immune response upon administration to a subject.

It is an objective of the present invention to provide for methods for detecting peptides on the surface of cells and in particular where the peptides are in association with MHC molecules.

It is an objective of the present invention to provide for methods for detecting peptides formally in association with MHC molecules presented on the surface of cells.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 6 -

It is an objective of the present invention to provide for methods for detecting peptides in association with multiple different MHC molecules present on the surface of cells.

5 It is an objective of the present invention to provide for methods for detecting peptides in association with MHC molecules whereby those peptides originate from an exogenous protein.

10 It is an objective of the present invention to provide for methods for detecting peptides in association with MHC molecules whereby those peptides originate from an endogenous protein.

15 It is an object of the present invention to provide for methods for detecting peptides on the surface of a cell following a process whereby the cells of interest have been contacted with an exogenous protein or an exogenous microorganism such that their repertoire of surface peptides is different from the repertoire displayed on otherwise identical reference cells but which have not been contacted with the exogenous protein.

20 The exogenous protein may be a purified preparation extracted from a mammalian source such as a cell line or tissue *ex vivo*, or the protein may be a recombinant preparation purified from any biological source engineered to express said protein. The protein may be representative of a naturally occurring protein or a fusion of one or more naturally occurring proteins. The protein may be *in vitro* derived being an assemblage of naturally occurring elements or wholly synthetic or designed and have
25 no counterpart in nature.

30 The protein may be exemplary of a class of proteins such as antibody molecules and their derivatives, cytokines, growth factors, leukotrienes, haemostatic factors or may be a cell toxin or have enzymatic capacity or function. Most preferably the protein is a therapeutic protein.

It is recognised that the efficacy of several therapeutic proteins has been limited by the induction of unwanted immune reactions to the therapeutic protein. Examples

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 7 -

include monoclonal antibodies [Schroff, R. W. et al (1985) *Cancer Res.* 45: 879-885; Shawler, D.L. et al (1985) *J. Immunol.* 135: 1530-1535] and also some proteins of human origin such as granulocyte-macrophage colony stimulating factor [Wadhwa, M. et al (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 1353-1361] and interferon alpha 2 [Russo, D. et al (1996) *Br. J. Haem.* 94: 300-305; Stein, R. et al (1988) *New Engl. J. Med.* 318: 1409-1413] amongst others. There is therefore a significant need for methods able to identify determinants involved in the induction of an immune response to a therapeutic protein.

10 A principal factor in the induction of an immune response is the presence within the protein of peptides that can stimulate the activity of T cell via presentation on MHC class II molecules, so-called T cell epitopes. In order to eliminate or reduce immunogenicity, it is desirable to identify and remove T cell epitopes from the protein. It is an object of the present invention to provide for methods to enable the detection and identification of T cell epitopes.

15 Exogenous proteins are engulfed and processed for presentation in association with MHC class II molecules of the DR, DQ or DP type. MHC Class II molecules are expressed by professional antigen presenting cells (APCs), such as macrophages and dendritic cells amongst others. The ability of a peptide to bind a given MHC class II molecule for presentation on the surface of an APC is dependent on a number of factors most notably its primary sequence. This will influence both its propensity for proteolytic cleavage and also its affinity for binding within the peptide binding cleft of the MHC class II molecule. The MHC class II / peptide complex on the APC surface presents a binding face to a particular T cell receptor (TCR) able to recognise determinants provided both by exposed residues of the peptide and the MHC class II molecule. In the art there are procedures for identifying synthetic peptides able to bind MHC class II molecules. Such peptides may not function as T cell epitopes in all situations particularly *in vivo* due to the processing pathways or other phenomena.

20 Also in the art there are computational methods for predicting potential T-cell epitopes or recognising sequence motifs in experimentally determined T-cell epitopes. Schemes include techniques to predict MHC class II-binding peptides as provided in

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 8 -

WO98/52976 where a computational threading approach identifies peptide sequences with the potential to bind only a sub-set of possible human MHC class II DR allotypes.

T cell epitope identification is the first step to epitope elimination as recognised in WO98/52976 and WO00/34317. In these teachings, predicted T cell epitopes are removed by the use of judicious amino acid substitution within the primary sequence of the therapeutic protein. It is an objective of the present invention to provide methods for the development of modified proteins in which the immune characteristic is modified by means of reduced numbers of potential T-cell epitopes. The identified sequences being present on the surface of MHC bearing cells or bound to MHC preparations following the natural intracellular processing events present within any competent APC or similar cell. Moreover, peptides identified under the scheme of the present invention can be detected from any MHC allotype or a mixture of allotypes including for MHC class II, those of the DR, DQ or DP specificities.

Whilst the present invention enables the detection of peptides displayed in the surface of cells and in particular in association with MHC molecules of the class I and class II designations, it is not intended to be limited to whole cells but also includes the analysis of peptides on the surface of exosomes. Peptide-MHC complexes are present in high concentration on the surface of exosomal vesicles derived from cells normally expressing MHC class II molecules. Under certain circumstances the output of exosomes may be increased from the surface of an APC and there are recognised procedures for the enrichment or isolation of exosomes [Raposo, G. et al (1996) *J. Exp. Med.* 183: 1161-1172; Clayton, A. et al (2001) *J. Immunol. Methods* 247: 163-174]. Analysis of APC preparations and preparations of exosomal particles derived from APC equally therefore fall under the scope of the present invention.

In summary the invention relates to the following issues:

- A method for the development of a pharmaceutical protein or polypeptide or vaccine antigen having a specific biological activity and a reduced or enhanced immunogenicity than any non-modified protein or polypeptide having the same biological activity, by
 - (i) contacting cells with said protein, or polypeptide, generating a repertoire of

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 9 -

surface peptides on the cells or exosomal vesicles thereof, which is different from the repertoire of surface peptides displayed on reference cells which have not been contacted,

- 5 (ii) analyzing said cells or exosomal vesicles thereof, for peptides bound on the surface of said cells or exosomal vesicles thereof and,
- (iii) assigning said peptides to the sequence of the pharmaceutical protein or polypeptide or vaccine antigen according to standard methods.
- A corresponding method further comprising the following steps:

10 (iv) modifying said peptides, in order to alter their binding to MHC molecules, and

(v) constructing sequence variants of the final pharmaceutical protein or polypeptide by incorporating one or more of the modified peptide sequences within the sequence of the protein or polypeptide molecule according to standard methods.
 - 15 • A corresponding method, wherein the analysis of said cells or exosomal vesicles thereof of step (ii) is performed by using mass spectroscopy (MS), preferably MALDI-MS and ESI-MS.
 - A corresponding method, wherein the pharmaceutical protein or polypeptide is modified such that one or more of said peptides are no longer bound after
20 contacting cell with said protein or polypeptide.
 - A corresponding method, wherein the peptides bound on the surface of the cells or exosomal vesicles according to step (i) are in association with MHC molecules and wherein the analysis of said cells or exosomal vesicles thereof according to step (ii) is performed by using MS.
 - 25 • A corresponding method, wherein the peptides bound on the surface of the cells or exosomal vesicles according to step (i) are products of an intracellular peptidase and trafficking pathway.
 - A corresponding method for the development of a pharmaceutical protein or polypeptide having a reduced immunogenicity, wherein the modification of the
30 immunogenic peptides is performed by eliminating or reducing their binding to MHC molecules, optionally by testing the modified peptides for binding to the cell surface as indicated in claim 1.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 10 -

- A corresponding method, wherein the elimination or reduction of the binding of the peptides to MHC molecules is performed by substituting, inserting or deleting one or more amino acid residues within the sequence region of the peptide within the pharmaceutical protein or polypeptide.
- 5 • A method for the development of a pharmaceutical protein or polypeptide having an enhanced immunogenicity, wherein the modification of the peptides are performed by enhancing their binding to MHC molecules, optionally by testing the modified peptides for binding to the cell surface as indicated in claim 1.
- 10 • A corresponding method, wherein the enhancement of the binding of the peptides to MHC molecules is performed by substituting, inserting or deleting one or more amino acid residues within the sequence region of the peptide increasing the activity of the peptide to act as a T-cell epitope, and / or broadening the range of MHC types for which the T-cell epitope is restricted,
- 15 and / or combining several otherwise disparate epitopes into a single entity.
- A method for the development of a vaccine by
 - (i) contacting cells with a protein or polypeptide or micro-organism having immunogenic activity, generating a repertoire of surface peptides on the said cells or exosomal vesicles thereof, which is different from the repertoire of
 - 20 surface peptides displayed on reference cells which have not been contacted,
 - (ii) analyzing said cells or exosomal vesicles thereof, on the surface of which peptides are bound,
 - (iii) assigning said peptides to the sequence of the protein or polypeptide according to standard methods, and
 - 25 (iv) constructing sequence variants of the final pharmaceutical vaccine by incorporating one or more of the peptides within the sequence of the vaccine molecule according to standard methods, wherein the analysis of said cells or exosomal vesicles therein is performed by using MS.
- A corresponding method using human cell lines engineered to produce MHC molecules.
- 30 • A corresponding method in which the parent (non-engineered) cell line produces no MHC molecules.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 11 -

- A corresponding method in which the parent cell line produces no MHC class I molecules.
- A corresponding method in which the parent cell line produces no MHC class II molecules.
- 5 • A corresponding method, wherein non-human cells which do not produce their own MHC molecules are engineered to produce MHC molecules and are used as indicated.
- A corresponding method, wherein the MHC molecules derive from MHC class II.
- 10 • A corresponding method, wherein the MHC molecules are HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP.
- A corresponding method, wherein the MHC molecules derive from MHC class I.
- A corresponding method, wherein a combination of cell lines or cell samples providing a comprehensive mixture of different MHC allotypes and genotypes is used.
- 15 • A corresponding method, wherein the peptides originate from an exogenous protein or micro-organism.
- A corresponding method, wherein the peptides originate from an endogenous protein.
- 20 • A corresponding method, wherein human dendritic cells, or exosomal vesicles thereof, which after addition of the protein or polypeptide or micro-organism present peptides on MHC molecules, are used.
- A corresponding method, wherein human antigen presenting cells, or exosomal vesicles thereof, which after addition of the protein or polypeptide present peptides on MHC molecules, are used.
- 25 • A corresponding method, wherein the MHC molecules have been enriched prior to peptide analysis.
- A corresponding method, wherein the peptides are eluted from the cell surface prior to analysis.
- 30 • A corresponding method, wherein the peptides are eluted from MHC molecules prior to analysis.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 12 -

- A corresponding method, wherein MALDI-MS is used.
- A corresponding method, wherein ESI-MS is used.
- A method for the development of a diagnostic test by
 - (i) analyzing appropriate human cells for surface peptides, and
 - 5 (ii) either, (a) producing a profile of peptides which appear on the cell surface and, optionally, comparing with other profiles to identify an abnormality or disease associated with the human cells, or, (b) determining the sequence of specific peptides on the cell surface as a means to determining specific peptides which might used to identify an abnormality or disease associated
- 10 with the human cells.
- Use of a protein or polypeptide obtained by any of the methods described above as a pharmaceutical therapeutic entity.
- Use of a protein or polypeptide obtained by any of the methods described above as a vaccine.
- 15 • Use of a protein or polypeptide obtained by any of the methods described above as a pharmaceutical therapeutic entity having reduced immunogenicity.
- A method for detecting peptides on the surface of cells or exosomal vesicles thereof which derive from a protein or polypeptide by
 - (i) contacting cells with said protein, or polypeptide or a gene coding for this
 - 20 protein or polypeptide, generating a repertoire of surface peptides on that cells or exosomal vesicles thereof, which is different from the repertoire of surface peptides displayed on reference cells which have not been contacted,
 - (ii) analyzing said cells or exosomal vesicles therein, on the surface of which said peptides are bound and
 - 25 (iii) assigning said peptides to the sequence of the protein or polypeptide according to standard methods, wherein the analysis if the cells or exosomal vesicles is performed by MS, preferably MALDI-MS.

The process according the scheme under the first major embodiment of the present invention is therefore to apply the methods herein to:

1. Identify one or more processed T cell epitopes within the amino acid sequence of a target protein.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 13 -

2. Design new sequence variants of the target protein with one or more amino acids within the identified potential T cell epitopes modified in such a way to substantially reduce or eliminate the activity of the T cell epitope as determined by the binding of the peptides to MHC molecules or whole cells or other means. Importantly, such sequence variants are created in such a way to avoid creation of new potential T cell epitopes by the sequence variations unless such new potential T cell epitopes are, in turn, modified in such a way to substantially reduce or eliminate the activity of the T cell epitope.
3. Construct such sequence variants and testing said variants in order to identify one or more variants with desirable properties.

According to this scheme, a number of variant proteins will be produced and tested, most preferably by recombinant DNA techniques although other procedures including chemical synthesis may be contemplated. It is anticipated that single amino acid substitutions within a given potential T cell epitope will be made to eliminate the epitope. Combinations of substitution within a single epitope may be contemplated

In a major aspect of the present invention, a population of mammalian cells is incubated with a test protein or transfected with a gene encoding a test protein and, following uptake or expression of the protein and its degradation, the profile or identity of peptides on the cell surface is determined. In particular, MHC molecules, especially multiple MHC molecules, will present such peptides. As one aspect of this embodiment, it is important to analyse peptides presented on many different MHC molecules and therefore the analysis is preferably undertaken on multiple cell populations encompassing a very high proportion of the MHC allotypes and genotypes that are encountered in the world population. Such cell populations can either be obtained by sampling multiple cell populations from the world population or by using cells that have been engineered to produce multiple MHC types. Of particular use are cell lines where no endogenous MHC molecules are produced and which display a low background of peptides on the cell surface.

Due to the large number of human MHC allotypes and genotypes each with the capacity to bind to a different profile of peptides from any given protein, previous

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 14 -

approaches to the comprehensive identification of T cell epitopes as described above, have comprised primarily predictive approaches, rather than either biochemical (where peptides are tested for binding to large numbers of MHC types) or biological approaches (primarily where peptides are tested for activation or stimulation of T cells). For peptides that bind to MHC class II, such predictive approaches include motif and artificial neural network techniques whereby large numbers of sequences of T cell epitopes are analysed to determine specific combinations of amino acids common to these epitopes for subsequent predictive analysis of other peptides. However, for MHC class II, such predictive approaches are limited and will often miss a proportion of T cell epitopes (false negatives) or will assign certain peptides to be T cell epitopes when, in practice, they lack such an activity (false positives). A further major limitation of predictive approaches and, also, biochemical and biological approaches with synthetic peptides, is the inability to account for processing of the given protein that can influence which peptides are presented by MHC molecules. Thus, improved methods are needed for the accurate and comprehensive identification of T cell epitopes without appreciable false negatives or false positives and, as such, the present invention provides for such improvement.

For the development of a human pharmaceutical protein according to the first embodiment of the present invention, a particular application is to generate a protein whereby epitopes for activation and/or stimulation of helper T cells are removed. In this case, the primary interest is peptides presented by MHC class II. For development of a pharmaceutical protein that is effective in a high proportion of humans, it is necessary to identify peptides within the protein which can be presented by one or more of the numerous MHC allotypes and to then alter these peptides to remove the capacity for MHC binding. Previously, the comprehensive identification of peptides presented by MHC class II has been limited by the difficulty in accurately predicting such peptides and in predicting peptides which bind to one or more of the large number of different allotypic and genotypic human MHC class II molecules. In comparison to peptides which bind to MHC class I where prediction is more reliable, peptides which bind to MHC class II are more variable in length and have amino acids outside the main binding pockets which have a more significant effect on peptide binding. Thus, for MHC class II, there is a need for more accurate and

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 15 -

comprehensive methods than currently available for predicting or detecting peptides which bind to one or more of the numerous MHC class II allotypes and genotypes in order to comprehensively identify potential T cell epitopes. Major benefits of the availability of such an approach is in the generation of pharmaceuticals with all major
5 (or all) T cell epitopes identified and then removed.

A preferred method for the development of a pharmaceutical using the present invention comprises the following steps:

1. for the test protein for potential use as a pharmaceutical, add the protein to a
10 selection of human cell lines or human cell samples
2. after an appropriate period of time, analyse the cells for surface peptides particularly using MALDI-MS directly on cells or, alternatively, using MALDI-MS on cell fractions especially MHC fractions, or alternatively, eluting peptides from the cell surface prior to analysis particularly by MALDI-MS or ESI-MS.
- 15 3. from the given protein, assign peptides which appear on the cell surface to the test protein
4. modify peptides which appear on the cell surface in (2) to eliminate binding to MHC molecules, in some cases by testing modified peptides for binding to the cell surface (as above)
- 20 5. generate the final pharmaceutical protein molecule by incorporating appropriate modifications to one or more peptides within the protein sequence to eliminate binding to MHC molecules

According to the second major embodiment of the present invention, there is provided
25 a scheme whereby a vaccine molecule or molecule able to function as a vaccine may be developed. The vaccine is most preferable for use in humans although the scheme may equally be applied to the development of vaccine molecules for the treatment or prevention of disease in non-human species. For the development of a vaccine using the present invention, a particular application is to generate a peptide
30 or protein whereby major epitopes for activation and/or stimulation of T cells are present, primarily epitopes for helper T cells but also, for applications requiring cell killing, epitopes for cytotoxic T cells (primarily MHC class I restricted). For development of a vaccine that is effective in a high proportion of humans, it is

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 16 -

necessary to identify peptides within the protein that can be presented by one or more of the numerous MHC allotypes and genotypes and to then select from these peptides one or more epitopes for inclusion in the final vaccine molecule. Such epitopes can comprise peptides restricted by MHC class I or MHC class II or both.

5 The present invention provides for such identification of peptides presented by MHC class I and class II and is thus the basis for development of more effective vaccines.

A major distinction between MHC class I and MHC class II epitopes is the principal origin of the protein from which the peptide in the MHC-peptide complex is usually
10 derived. It is recognised that exogenous proteins give rise predominantly to peptides in association with MHC class II, whereas endogenous proteins expressed from within a cell are processed according to a different peptidase and intracellular trafficking pathway to result predominantly in association with MHC class I molecules on the cell surface. For either exogenous or endogenous proteins, during the sequence of
15 processing steps, certain peptide sequences from the protein that might normally bind to MHC may be destroyed so that certain T cell epitopes are not produced *in vivo*. For such peptides, predictive (or biochemical / biological) methods cannot take account of processing in the identification of T cell epitopes. It is a feature of the present invention that peptides identified from the cell surface are those that have
20 been selected by the APC (or other cell) as capable of passage via the intracellular processing and trafficking pathways. As the invention is focussed to the identification of the real products of the processing events, the invention therefore reduces the rate of false positive and false negative epitopes identified using predictive or *in vitro* methods of epitope identification.

25

The process according the scheme under the second main embodiment of the present invention is therefore to apply the methods herein to:

1. Identify one or more T cell epitopes within the amino acid sequence of a target protein.
- 30 2. Design new sequence variants of the target protein with one or more amino acids modified in such a way as to either;
 - i) increase the activity of the T cell epitope and /or

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 17 -

- ii) broaden the range of MHC types for which the T cell epitope is restricted as determined by the binding of the peptides to MHC molecules or whole cells or other means; and/or
- iii) combine several otherwise disparate epitopes into a single (smaller) entity.

3. Construct such sequence variants and testing said variants in order to identify one or more variants with desirable properties.

According to this scheme, a number of variant proteins will be produced and tested, most preferably by recombinant DNA techniques although other procedures including chemical synthesis may be contemplated.

A preferred method for the development of a vaccine using the present invention therefore comprises the following steps:

1. for the protein for potential use as a vaccine, add the protein to a selection of human cell lines or human cell samples
2. after an appropriate period of time, analyse the cells for surface peptides particularly using MALDI-MS directly on cells or, alternatively, using MALDI-MS on cell fractions especially MHC fractions, or alternatively, eluting peptides from the cell surface prior to analysis particularly by MALDI-MS or ESI-MS.
3. from the given protein, assign peptides which appear on the cell surface to the test protein
4. select one or more peptides which appear on the cell surface in (2) for use in the final vaccine molecule

It will be understood that, for the analysis of cell surface peptides for pharmaceutical or vaccine use, a combination of cell lines or human cell samples providing a comprehensive mixture of different MHC allotypes and genotypes could be employed and that such natural cell samples will provide a comprehensive mixture of MHC class I and/or class II restricted epitopes. Of particular use would be human dendritic cells (or exosomes) which can be activated after addition of the test protein to efficiently present peptides on MHC molecules. Alternatively, human cell lines can be engineered to expand their MHC repertoires primarily by transfection of genes

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 18 -

encoding one more MHC types into these cells thus producing cells with multiple MHC types for analysis of cell surface peptides. Of particular use would be non-human cells which do not produce their own MHC molecules, such as mouse cells in which the murine MHC genes have been deleted or otherwise disabled. The analysis of cell surface peptides will also include the optional step of enriching MHC molecules, for example using immunoaffinity columns, prior to peptide analysis. For MHC class II, the method of the invention for analysis of cell surface peptides has the particular advantage of providing for analysis of binding to allotypes other than DR. Analysis of peptide presentation by such allotypes as DQ and DP has been very difficult as there are no predictive method available especially for DQ where both chains of the MHC molecule are thought to contribute to binding (in contrast to just the β chain in DR).

According to the third major aspect to the present invention, there is provided a scheme whereby the invention is applied to the development of a diagnostic test. A particular application of this embodiment is to generate a profile of peptides presented on the cell surface in order to identify the abnormal presence, absence or pattern of peptides that might indicate a particular disease or cellular insult.

It is therefore an object of the present invention to provide for methods for detecting peptides on the surface of a cell following a process whereby the cells of interest have been contacted with an exogenous protein or organism or other agent such that their repertoire of surface peptides is different from the repertoire displayed on otherwise identical cells but which have not been contacted with the exogenous protein or organism. In the practice of the invention, the presence of a "diagnostic peptide" or "indicator peptide" may be made in isolation by the registration of the indicator peptide mass in the mass spectrum of an MS instrument, or by record of the indicator peptide sequence in a CID (or similar) spectrum. Equally the presence of the indicator peptide may be indicated with reference to a mass spectrum derived from a reference sample not contacted with the exogenous protein or agent. Such a comparative analysis is of particular value in instances where the mass(es) of the indicator peptides are not known or predicted by any means. Comparative analysis may be conducted *in silico* by subtraction of identical mass peaks and would be of particular

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 19 -

- value where the loss of a particular mass peak is the diagnostic indicator. Others too have exploited MS techniques in comparative analysis of biological samples. However, in the case of Liotta et al [WO0049410], such comparative analysis is focussed to the protein content of individual cells obtained by laser capture micro dissection. This is distinct from the current invention, where the diagnosis (comparative, subtractive or otherwise) is according to the peptides detected from the surface and particularly peptides in association with MHC molecules on the cell surface.
- 10 Other diagnostic techniques using MS technology include Little et al [US,6,207,370] who disclose an MS based diagnostic procedure directed towards the identification of genetic disease, that is a constitutional feature of the individual not an acquired condition or state. The procedure can identify the mass of a target protein that is variable in the population dependent on the genetic constitution of the individual. A
- 15 further diagnostic scheme is disclosed by Geng et al [Geng, M. (2000) *J. Chromatography A*, 870: 295-313] who have analysed MALDI-TOF spectra obtained from tryptic digests of serum protein samples. Their process detects "signature peptides" diagnostic of the presence of an analyte protein present in a complex mixture. This too is distinct from the current invention, where the diagnosis
- 20 (comparative, subtractive or otherwise) is according to the peptides detected from the surface and particularly peptides in association with MHC molecules on the cell surface.

- Therefore, according to the scheme of the present invention, a preferred method for the development of a diagnostic test comprises the following steps:
- 25
1. analyse appropriate human cells for surface peptides particularly using MALDI-MS directly on cells or, alternatively, using MALDI-MS on cell fractions especially MHC fractions, or alternatively, eluting peptides from the cell surface prior to analysis particularly by MALDI-MS or ESI-MS.
 - 30 2. either, produce a profile of peptides which appear on the cell surface and, if necessary, compare with other profiles to identify an abnormality or disease associated with the human cells, or, determine sequence of specific peptides

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 20 -

on the cell surface as a means to determining specific peptides which might used to identify an abnormality or disease associated with the human cells.

For all embodiments of the present invention it is not critical to obtain complete sequences to determine the identity of peptides due to facile access to, and increasing content within, various protein sequence databases. A small amount of internal sequence information (which can be as little as 2-3 residues) in conjunction with the known mass of the parent ion may be sufficient to characterise a peptide species. It is recognised that algorithms are available to search databases of uninterrupted fragment ion data sets. Significant examples of these include the ProteinLynx Global Server search algorithm (Micromass, Wythenshawe, UK), Mascot from Matrix Science [www.matrix.com] or the Protein Prospector suite of programmes [<http://prospector.ucsf.edu>] or similar. Such programmes simulate fragmentation of sequence entries in the databases with masses of the peptide of interest.

The present invention is further described by the following non-limiting examples.

Example 1

Method for detecting peptides bound to cell surface HLA DR using MALDI-tof.

EBV transformed human B cell lines JESTHOM and BSM were obtained from ECACC (Porton Down, UK). B cell line JESTHOM is homozygous for HLA-DR1*0101 and line BSM is homozygous for DRB1*0401. Cell lines were cultured *in vitro* using conditions recommended by the supplier. Mouse NSO cells (ECACC #85110503) cultured using the suppliers recommended conditions were used as a negative control cell line.

Synthetic peptides were obtained from Zeneca (Zeneca LSM, Northwich, UK). Peptide HA1 was a 13mer corresponding to residues 307-319 of influenza virus hemagglutinin protein (Rothbard, J.B. et al (1988) *Cell* 52: 515). Peptide MP1 was 13mer corresponding to residues 17-29 of influenza virus matrix protein [Rothbard, J.B. et al (1988) *ibid*]. Whilst both peptides are known to bind a number of different HLA-DR specificities, differential binding is seen with the DR4 allotype. MP1 binds to

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 21 -

DR4 whereas MP1 shows no significant binding to the DR4 specificity [Busch R. et al (1990) *Int. Immunol.* 2: 443].

For some experiments analogue peptides containing a labile biotin linker moiety were used. For these the linker biotin-HPDP (Pierce, Chester, UK) was coupled to an N-terminal cysteine residue to yield peptides HA1B and MP1B. With the exception of the additional cysteine residue, the sequences are otherwise identical to HA1 and MP1. Coupling was achieved using protocols provided with the biotin-HPDP (Pierce, Chester, UK), except that purification of the coupled peptide was conducted using a HPLC and a standard elution profile. Inhibition experiments were conducted using purified monoclonal antibody LB3.1 [ATCC number HB-298]. The antibody was purified from hybridoma LB3.1 conditioned medium using protein A sepharose (Millipore, Conset, UK) affinity chromatography and procedures recommended by the supplier. The hybridoma had been maintained using standard conditions. LB3.1 was co-incubated with the peptide and cells at a maximum concentration of 10⁶g/ml.

Cells were paraformaldehyde fixed before treatment with different synthetic peptides in test and control experiments. Experiments were conducted using 3x 10⁶ cells in 50 μ l complete medium added to 150 μ l peptide binding buffer (50mM Phosphate citrate buffer at pH 4.0; 0.1% NP40) containing peptide at a final concentration of 50 μ M. Incubation was conducted at 37 $^{\circ}$ C for 24 hours. For assay, peptide treated cells were harvested by centrifugation and washed three times using PBS. The cells were placed into a 10 μ l aliquot of 50% acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid in a 0.5ml microfuge tube. Each sample was subsequently mixed vigorously for 5 s before sample spotting to the MALDI instrument sample plate. The two-layer method of sample spotting was used, where 1 μ l acid matrix solution [0.1M sinapinic acid in a 1:1:1 mixture of acetonitrile, methanol and water] was dried onto the MS sample plate. This was followed by 1 μ l of the cells and a further 1 μ l of sinapinic acid matrix solution.

In experiments using synthetic peptides containing a labile linker mass-tag, removal of the linker was achieved by incubation of the cells in PBS containing 100mM β -mercaptoethanol (BME). Incubation with BME was conducted at 37 $^{\circ}$ C for 30 minutes

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 22 -

and cells washed 3 times using PBS before application to the MALDI sample plate as previously.

A Voyager DE mass spectrometer (Perseptive Biosystems, Foster City, CA, USA) was used in positive ion mode. The instrument was calibrated with a mixture of horse cardiac apomyoglobin and bovine serum albumin (Sigma, Poole, UK) and checked less than 30 minutes before each analysis to be within 0.1% mass accuracy for each standard. The sample spots were air dried and analysed in positive ion mode. The delayed extraction was set to 150ns at 25kV. The low mass gate was set to 600Da. A total of 125 laser shots were accumulated from each sample.

Predicted mass peaks for peptides HA1 and MP1 were identified in spectra generated from JESTHOM cells. In contrast, only peptide HA1 could be identified from HLA-DR4 expressing BSM cells. In experiments using labelled peptides, mass shifts of the peptide peak was identified in the spectra of BME treated cells. Spectra from LB1.1 incubated cells (inhibition experiments) showed that the antibody treatment could not abolish peptide binding although some evidence of reduced relative ion abundance could be found in 3-way competition assays using peptide, labelled peptides and LB1.1 antibody. Spectra from mouse NSO cells treated with peptides, or peptide combinations showed very low abundance of target ion peaks suggesting non-specific interaction and or insufficient washing during cell processing.

Example 2

Method for analysis of MHC DR bound peptides using MALDI-tof

HLA-DR1*0101 was purified from JESTHOM cell membranes by immunoaffinity chromatography. HLA DRB1*0401 was purified from BSM cells. Solubilised cell membranes were prepared and processed as previously described [Gorga et al (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 16087-16094; Sette et al (1989) *J. Immunol.* 42: 35-40]. The anti-DR monoclonal antibody LB3.1 [ATCC number HB-298] was used as the immunoaffinity reagent. The antibody was purified from hybridoma LB3.1 conditioned medium using protein A sepharose (Millipore, Conset, UK) affinity chromatography and procedures recommended by the supplier. The hybridoma had been maintained

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 23 -

using standard conditions. LB3.1 antibody was coupled to sepharose 4B (Pharmacia Biotech, St. Albans, UK) using the Linx system provided by InVitrogen (InVitrogen, Groningen NL) and conditions recommended by the supplier.

- 5 Synthetic peptides HA1 and MP1 as described in example 1 were incubated with a 50 μ l aliquot of the HLA-DR1*0101 preparation. Peptides were incubated in peptide binding buffer (50mM Phosphate citrate buffer at pH 4.0; 0.1% NP40) at a final concentration of 50 μ M for 26 hours at 37°C. Unbound peptide was removed by ultrafiltration using microcon centrifugal filtration cells (Millipore, USA) and multiple
- 10 cycles (minimum of four) of washing with PBS. The final volume was reduced to 20 μ l. In some experiments peptides were eluted from the MHC before MALDI-tof analysis. In this case elution was conducted by extraction with a solution of 0.1% TFA in H₂O. The eluate was evaporated to dryness and resuspended directly using MALDI matrix solution as per example 1. In other experiments the MHC-peptide
- 15 complex was applied to the instrument sample plate resuspended in matrix solution.

Predicted mass peaks for peptides HA1 and MP1 were identified in spectra generated from HLA-DR1*0101 preparations. In contrast, only the HA1 mass peak could be identified in spectra from DRB1*0401 preparations.

20

Example 3

Method for analysis of cell surface peptides following treatment of cells with whole protein.

- 25 Human dendritic cells were enriched from 40ml peripheral blood samples obtained from healthy donors. The blood was anticoagulated using heparin and a mononuclear cell fraction prepared using histopaque 1077 (Sigma, Poole, UK) density gradient medium and conditions recommended by the supplier. Dendritic cells were obtained by negative selection using an immunomagnetic separation procedure with
- 30 all reagents and conditions provided by Mitenyi Biotec (Bisely, UK). The dendritic cells were eluted into multiwell tissue culture dishes for treatment with protein antigen. Cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) foetal bovine

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 24 -

serum and standard antibiotics during the course of the experiments. All reagents were from Life Technologies (Paisley, UK).

A preparation of recombinant staphylokinase was used in these studies. The wild-type staphylokinase gene was synthesised under contract by Genosys Biotechnologies Ltd (Cambridge, UK). The gene was constructed by polymerase chain reaction using overlapping synthetic primers and the sequence as given by Collen et al [Collen D. (1996) *Circulation* 94: 197-206]. The synthetic gene was cloned as a 453 bp EcoRI-HinDIII restriction fragment into bacterial expression vector pMEX (MoBiTec, Göttingen, Germany). The pMEX/staphylokinase gene was transformed into competent *E. coli* strain TG1 by standard techniques and a single transformed clone secreting active staphylokinase was selected using a fibrin plate assay [Astrup, T. et al (1952) *Arch. Biochem. Biophys.* 40: 346-351; Collen, D. et al (1992) *Fibrinolysis* 6: 203-213]. The best expressing clone was grown up and recombinant protein was purified from the culture supernatant using sequential column chromatography and methods described previously [Collen, D. et al (1992) *ibid*; Schlott, B. et al (1994) *Biotechnology* 12: 185-189].

Dendritic cells were incubated with purified staphylokinase at a concentration of 100 ng/ml and incubation conducted overnight. In some experiments, antigen processing was blocked using inhibitor cocktails added to the culture medium. Inhibitors were added 1 hour before the addition of the test protein at the following concentrations: ammonium chloride 50mM; sodium azide 1mg/ml; chloroquine and colchicine 500 nM. All compounds were from Sigma (Sigma, Poole, UK).

Following protein treatment, cells were removed from culture dishes and washed using 3 cycles of centrifugation and PBS treatment to remove all medium and extraneous protein. Cells were processed for MALDI-tof analysis as given in example 1. Spectra were collected and analysed for the presence peptides attributable to the test protein. These were identified by comparison to spectra obtained from control cells not treated with staphylokinase.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 25 -

Ion peaks attributed to staphylokinase were identified in spectra obtained from cells treated with staphylokinase and not seen in the spectra of cells treated with metabolic inhibitors or control cells not treated with staphylokinase.

5 Example 4

Method for determination of peptide sequences derived from treatment of cells with whole protein.

Cells were treated with the protein of interest according the method of Example 3.

- 10 Peptides were eluted from the cells by multiple extraction cycles (4-6) with a solution of 5% acetonitrile, 0.1% formic acid. The presence of sequences attributable to the test protein was determined using ESI-MS/MS.

- 15 Eluted samples were dried and re-suspended in a solution of 0.1% formic acid. The entire crude eluate was separated by means of a modular CapLC system (Micromass, Wythenshawe, UK) connected directly to the Z-spray source of the mass spectrometer. Samples were loaded onto a C18 pre-column at a flow rate of 30 μ L per minute and desalted for 3 minutes using a solution of 0.1% formic acid. The flow rate was reduced to 1 μ L per minute and re-directed onto a C18 180mm pepmap
20 column. The column was eluted using a standard elution gradient ranging from a solvent solution of 95% H₂O, 5% acetonitrile, 0.1% formic acid to a solvent solution of 5% H₂O, 95% acetonitrile, 0.1% formic acid.

- Electrospray MS and MS/MS data were acquired on a Micromass Q-Tof 2 instrument
25 (Micromass, Wythenshawe, UK) fitted with a Z-spray nanoflow electrospary ion source. The instrument was operated in the positive ion mode with a source temperature of 80°C, a counter gas flow rate of 40L/hour and with a potential of 2800V applied to the nanospray continuous LC probe. All data were acquired with the instrument operating in automatic data dependent switching mode.

- 30 The instrument was calibrated with a two point calibration selected fragment ions that resulted from the collision-induced decomposition of glufibrinopeptide b. All data was processed automatically by means of ProteinLynx software, protein identification was

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 26 -

achieved by analysis with the ProteinLynx Global Server search algorithm (Micromass, Wythenshawe, UK).

Manual data acquisition was performed by injecting the crude sample into the instrument via borosilicate needles. The samples were adjusted to a concentration of approximately 1 μ M. Samples were desalted prior to injection by use of C18 ZipTip disposable minicolumns (Millipore, USA).

Spectra were collected and analysed for the presence peptide masses attributable to the test protein. These were identified by comparison to spectra obtained from control cells including cells in which antigen processing was blocked. Following treatment with staphylokinase peptide masses attributed staphylokinase were identified. Equivalent ion peaks were not evident in cells not treated with staphylokinase or with cells treated with metabolic inhibitors.

15

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 27 -

Patent Claims:

1. A method for the development of a pharmaceutical protein or polypeptide or vaccine antigen having a specific biological activity and a reduced or enhanced immunogenicity than any non-modified protein or polypeptide having the same biological activity, by
 - (i) contacting cells with said protein, or polypeptide, generating a repertoire of surface peptides on the cells or exosomal vehicles thereof, which is different from the repertoire of surface peptides displayed on reference cells which have not been contacted,
 - (ii) analyzing said cells or exosomal vesicles thereof, for peptides bound on the surface of said cells or exosomal vesicles thereof and,
 - (iii) assigning said peptides to the sequence of the pharmaceutical protein or polypeptide or vaccine antigen according to standard methods.
2. A method of claim 1 further comprising the following steps:
 - (iv) modifying said peptides, in order to alter their binding to MHC molecules, and
 - (v) constructing sequence variants of the final pharmaceutical protein or polypeptide by incorporating one or more of the modified peptide sequences within the sequence of the protein or polypeptide molecule according to standard methods.
3. A method according to claim 1 or 2, wherein the analysis of said cells or exosomal vehicles thereof of step (ii) is performed by using mass spectroscopy (MS).
4. A method according to claim 3, wherein MALDI-MS is used.
5. A method according to claim 3, wherein ESI-MS is used.
6. A method according to any of the claims, wherein the pharmaceutical protein or polypeptide is modified such that one or more of said peptides are no longer bound after contacting cell with said protein or polypeptide.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 28 -

7. A method according to any of the claims 1 – 6, wherein the peptides bound on the surface of the cells or exosomal vesicles according to step (i) are in association with MHC molecules and wherein the analysis of said cells or exosomal vesicles thereof according to step (ii) is performed by using MS.
- 5
8. A method according to any of the claims 1 – 6, wherein the peptides bound on the surface of the cells or exosomal vesicles according to step (i) are products of an intracellular peptidase and trafficking pathway.
- 10
9. A method according to any of the claims 1 – 8 for the development of a pharmaceutical protein or polypeptide having a reduced immunogenicity, wherein the modification of the immunogenic peptides is performed by eliminating or reducing their binding to MHC molecules, optionally by testing the modified peptides for binding to the cell surface as indicated in claim 1.
- 15
10. A method according to claim 9, wherein the elimination or reduction of the binding of the peptides to MHC molecules is performed by substituting, inserting or deleting one or more amino acid residues within the sequence region of the peptide within the pharmaceutical protein or polypeptide.
- 20
11. A method according to any of the claims 1 – 8 for the development of a pharmaceutical protein or polypeptide having an enhanced immunogenicity, wherein the modification of the peptides are performed by enhancing their binding to MHC molecules, optionally by testing the modified peptides for binding to the
- 25
- cell surface as indicated in claim 1.
12. A method according to claim 11, wherein the enhancement of the binding of the peptides to MHC molecules is performed by substituting, inserting or deleting one or more amino acid residues within the sequence region of the peptide increasing
- 30
- the activity of the peptide to act as a T-cell epitope, and / or broadening the range of MHC types for which the T-cell epitope is restricted, and / or combining several otherwise disparate epitopes into a single entity.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 29 -

13. A method for the development of a vaccine by
- (i) contacting cells with a protein or polypeptide or micro-organism having immunogenic activity, generating a repertoire of surface peptides on the said cells or exosomal vesicles thereof, which is different from the repertoire of surface peptides displayed on reference cells which have not been contacted,
 - (ii) analyzing said cells or exosomal vesicles thereof, on the surface of which peptides are bound,
 - (iii) assigning said peptides to the sequence of the protein or polypeptide according to standard methods, and
 - (iv) constructing sequence variants of the final pharmaceutical vaccine by incorporating one or more of the peptides within the sequence of the vaccine molecule according to standard methods, wherein the analysis of said cells or exosomal vesicles therein is performed by using MS.
14. A method according to any of the claims 1 – 13 using human cell lines engineered to produce MHC molecules.
15. A method according to claim 14 in which the parent (non-engineered) cell line produces no MHC molecules.
16. A method according to claim 14 in which the parent cell line produces no MHC class I molecules.
17. A method according to claim 14 in which the parent cell line produces no MHC class II molecules.
18. A method according to claim 1- 13, wherein non-human cells which do not produce their own MHC molecules are engineered to produce MHC molecules and are used as indicated.
19. A method according to any of the claims 1 – 18, wherein the MHC molecules derive from MHC class II.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

[]

- 30 -

20. A method according to claim 19, wherein the MHC molecules are HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP.
21. A method according to any of the claims 1 – 18, wherein the MHC molecules
5 derive from MHC class I.
22. A method according to claim 19, wherein a combination of cell lines or cell samples providing a comprehensive mixture of different MHC allotypes and genotypes is used.
- 10 23. A method according to any one of the claims 1 – 22, wherein the peptides originate from an exogenous protein or micro-organism.
24. A method according to any one of the claims 1 – 22 wherein the peptides
15 originate from an endogenous protein.
25. A method according to any of the claims 1 to 24, wherein human dendritic cells, or exosomal vesicles thereof, which after addition of the protein or polypeptide or micro-organism present peptides on MHC molecules, are used.
- 20 26. A method according to any of the claims 1 to 24, wherein human antigen presenting cells, or exosomal vesicles thereof, which after addition of the protein or polypeptide present peptides on MHC molecules, are used.
- 25 27. A method according to any of the claims 1 to 26, wherein the MHC molecules have been enriched prior to peptide analysis.
28. A method according to any of the claims 1 to 27 wherein the peptides are eluted from the cell surface prior to analysis.
- 30 29. A method according to any of the claims 1 to 27 wherein the peptides are eluted from MHC molecules prior to analysis.

WO 02/12899

PCT/EP01/08625

- 31 -

30. A method for the development of a diagnostic test by
- (i) analyzing appropriate human cells for surface peptides, and
 - (ii) either, (a) producing a profile of peptides which appear on the cell surface and, optionally, comparing with other profiles to identify an abnormality or disease associated with the human cells, or, (b) determining the sequence of specific peptides on the cell surface as a means to determining specific peptides which might used to identify an abnormality or disease associated with the human cells.
31. Use of a protein or polypeptide obtained by the method of any of the claims 1 – 8 as a pharmaceutical therapeutic entity.
32. Use of a protein or polypeptide obtained by the method of any of the claims 11 – 13 as vaccine.
33. Use of a protein or polypeptide obtained by the method of claim 9 or 10 as a pharmaceutical therapeutic entity having reduced immunogenicity.
34. A method for detecting peptides on the surface of cells or exosomal vesicles thereof which derive from a protein or polypeptide by
- (i) contacting cells with said protein, or polypeptide or a gene coding for this protein or polypeptide, generating a repertoire of surface peptides on that cells or exosomal vesicles thereof, which is different from the repertoire of surface peptides displayed on reference cells which have not been contacted,
 - (ii) analyzing said cells or exosomal vesicles therein, on the surface of which said peptides are bound and
 - (iii) assigning said peptides to the sequence of the protein or polypeptide according to standard methods, wherein the analysis if the cells or exosomal vesicles is performed by MS, preferably MALDI-MS.

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/012899 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 16/46, 14/31
- (21) International Application Number: PCT/JP01/08625
- (22) International Filing Date: 26 July 2001 (26.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0018901.9 3 August 2000 (03.08.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): BIOVATION LIMITED [GB/GB]; Investment House, 6 Union Row, Aberdeen AB10 1DQ (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): CARR, Francis, J. [GB/GB]; Birchlea, The Holdings, Balmedie, Aberdeen AB23 8XU (GB). CARTER, Graham [GB/GB]; Longhills Cottage, By Newmachar, Aberdeenshire AB21 7XB (GB). HELLENDORRN, Koen [GB/GB]; 307 Hethersett Close, Newmarket CB8 7AT (GB).
- (74) Agent: BENZ, Jürgen; c/o Merck Patent GmbH, 64271 Darmstadt (DE).
- (81) Designated States (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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 7 November 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/012899 A3

(54) Title: PEPTIDES PRESENTED BY CELLS

(57) Abstract: The present invention relates to methods to determine peptides presented on the surface of mammalian cells following addition to the cells of a protein. The present invention also relates to diagnostic tests based on the determination of such peptides or modified molecules resulting from determination of such peptides, such as pharmaceutical entities preferably having specific biological activity and reduced or enhanced immunogenicity when compared with the corresponding non-modified molecules. The methods according to this invention are preferably established with tools using mass spectroscopy (MS).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/08625

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RAPOSO G ET AL: "BETA LYMPHOCYTES SECRETE ANTIGEN-PRESENTING VESICLES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 183, 1996, pages 1161-1172, XP002060486 ISSN: 0022-1007 abstract	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International Application No.
 PCT/EP 01/08625

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0034317	A	15-06-2000	AU 1667600 A	26-06-2000
			CN 1294596 T	09-05-2001
			EP 1051432 A2	15-11-2000
			WO 0034317 A2	15-06-2000
			AU 4635699 A	24-01-2000
WO 9852976	A	26-11-1998	AU 736549 B2	02-08-2001
			AU 7539398 A	11-12-1998
			EP 0983303 A1	08-03-2000
			WO 9852976 A1	26-11-1998
			GB 2339430 A	26-01-2000
			JP 2002512624 T	23-04-2002

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,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74)代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72)発明者 カー、 フランシス、 ジェイ .

イギリス国 エービー 2 3 8 エックスユー アバディーン バルメディー ザ ホールディングズ パーチリア

(72)発明者 カーター、 グラム

イギリス国 エービー 2 1 7 エックスビー アバディーンシャー パイ ニューメイチャー ロングヒルズ コテージ

(72)発明者 ヘレンドーン、 コーン

イギリス国 シービー 8 7 エーティー ニューマーケット ヘザーセット クローズ 3 0 7

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA18 BA44 MA01 NA05 NA06 ZB332

4C085 AA03 CC03 CC32