(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6010019号
(P6010019)

(45)発行日　平成28年10月19日(2016.10.19)　(24)登録日　平成28年9月23日(2016.9.23)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 27/62	(2006.01)	G01N	27/62	V
G01N 30/72	(2006.01)	G01N	30/72	C
G01N 30/88	(2006.01)	G01N	30/88	J
		G01N	27/62	X

請求項の数 12　(全 33 頁)

(21)出願番号	特願2013-504295 (P2013-504295)
(86)(22)出願日	平成23年4月15日(2011.4.15)
(65)公表番号	特表2013-525759 (P2013-525759A)
(43)公表日	平成25年6月20日(2013.6.20)
(86)国際出願番号	PCT/EP2011/056056
(87)国際公開番号	WO2011/128448
(87)国際公開日	平成23年10月20日(2011.10.20)
審査請求日	平成26年3月10日(2014.3.10)
(31)優先権主張番号	61/324,941
(32)優先日	平成22年4月16日(2010.4.16)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	1006360.0
(32)優先日	平成22年4月16日(2010.4.16)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者　506258073
イマティクス　バイオテクノロジーズ　ゲーエムベーハー
ドイツ，７２０７６　テュービンゲン，パウル－エンリヒ－シュトラーセ　１５
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(74)代理人　100135208
弁理士　大杉　卓也
(74)代理人　100152319
弁理士　曽我　亜紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】がん、自己免疫および感染症の免疫療法開発用自然処理ＨＬＡ制限ペプチドの特異的定量方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

a）被験者から得られた１つ以上の疾病一次組織サンプルおよび健常組織から得られた１つ以上の健常一次組織サンプルを準備する工程、

b）前記疾病一次組織サンプルおよび健常一次組織サンプルから MHC リガンドペプチドを単離する工程、

c）HPLC-MS分析においてペプチドシグナルを生成する前記単離されたMHCリガンドペプチドの HPLC-MS 分析を実施する工程、

d）フラグメントスペクトルを生成するそれぞれの前記MHC リガンドペプチドシグナルの前駆体イオンシグナル面積を測定する工程、

e）工程d）により得られるフラグメントスペクトルのクラスタリングおよびデータベース検索により前記MHC リガンドペプチドの配列を同定する工程、並びに、
異なる疾病一次組織サンプルの間の前駆体イオンシグナル面積のグループ化を行うことにより、かつ、工程c）および工程d）の反復測定を行い、該反復測定間の技術的性能／感度の差を補正するために反復測定内の前駆体イオンシグナル面積の正規化を行うことにより、誤差推定値を含む１サンプル当たりの各ペプチドの平均量を決定する工程、

f）異なる疾病一次組織サンプル間のペプチドの比較が可能な相対量を決定する工程であって、前記相対量を決定するために、サンプル毎のサイズまたは MHC発現レベルを考慮したMHC対立遺伝子特異的配列サブグループを使った前記異なるサンプル間のペプチドの正規化を行うことを含み、前記MHC対立遺伝子特異的配列サブグループは、異なるサンプル

間のペプチドの比較により、工程e)で同定したMHCリガンドペプチド配列を個別のMHC 対立遺伝子に割り当てて生成したものである、工程、
g）MHCリガンドペプチドの工程e）に記載の平均量および工程f）に記載の相対量に基づいて、前記疾病一次組織サンプルおよび前記健常一次組織サンプルのMHCリガンドペプチドについての提示プロフィールおよび／または提示スコアを計算することにより、MHCリガンドペプチドの過剰提示を決定する工程、
h）前記 MHC リガンドペプチドを無標識定量する工程、ならびに
i）MHCリガンドペプチドが腫瘍関連ペプチド（TAA）または疾病関連ペプチド（DAA）から選択されるものであって、合成ペプチドである前記MHC リガンドペプチドについて、免疫原性をテストする工程、
を含む、一次組織サンプル中のペプチドワクチン候補の同定／無標識定量の方法。
【請求項２】
腫瘍特異的 MHC リガンドペプチドの選択をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
工程d）において、配列についての知識なしに反復測定内で対応するシグナルを割り当てるために保持時間を調整する工程、および／または
配列の知識無しに保持時間を調整することにより異なるサンプル間に対応するシグナルを割り当てる工程、
をさらに含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
in vitro で実施される方法である、請求項１～３のいずれか一に記載の方法。
【請求項５】
各工程が示される順序で実施される、請求項１～４のいずれか一に記載の方法。
【請求項６】
示される各工程からなる方法である、請求項１～５のいずれか一に記載の方法。
【請求項７】
合成機または手動で同定および／または定量される、１つ以上のMHC リガンドペプチドを合成する工程をさらに含む、請求項１～６のいずれか一に記載の方法。
【請求項８】
MHC リガンドペプチドを、免疫原性について合成ペプチドとしてテストする工程をさらに含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
サンプルは一個人に由来する、請求項１～８のいずれか一に記載の方法。
【請求項１０】
同定および／または定量時のMHC リガンドペプチドに基づいた、個人用の MHC リガンドプロフィールを生成することをさらに含んだ、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
個人用の疾病特異的 MHC リガンドプロフィールを生成するものである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
同定配列の総数の配列数は５、２５、５０、または１００を超える、請求項１～１１のいずれか一に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、大規模な一次組織標本から関連 HLA 結合ペプチド抗原を定量的に同定する方法に関する。本方法は、ペプチドワクチン開発に使用できるだけでなく、分子的に定義された免疫モニタリングおよびいかなる免疫療法を目的とした新たな抗原の同定にも非常に役立ち、それらの方法では、がんまたは感染症／自己免疫疾患における様々なサブユニットワクチンや T 細胞の養子免疫伝達法のように、HLA 制限抗原決定因子がターゲット

として機能している。

【背景技術】

【０００２】

がんと戦うために免疫系の T 細胞群の誘発を目的とする、がん免疫療法および自己免疫疾患や感染症の免疫療法の開発は、原発性悪性組織でのヒト白血球抗原（HLA）結合ペプチドの提示レベルに関する深い知識によって、かなり向上するかもしれない。この情報は、タンパク質、DNA または RNA のような分子実体に基づく他のすべての T 細胞ワクチンと同様に、特にペプチドワクチンに関連している。この種の定量的データは、以前は「オミクス」スケールでは入手不可能であった。なぜなら、一般的な定量方法はそれまで、比較するサンプルすべてが単一実験内で処理されることを要求する化学物質差次標識法に最も信頼を置いていていたためであり、それにより該開発スケールの可能性が大幅に限定されていた。

【０００３】

「逆免疫」に関連する問題を避けながら上述のペプチドを同定する方法は EP1508047B1 に開示された。上述のように、本法は前記ペプチドの定量には使用できない。ラベリング法を採用する別の方法が WO 2005/076009 で開示され、一部の定量を可能にしたが、大規模スケールでは可能でない他の標識は、例えば WO 03/025576 または Martin らにより Proteomics 2003, 3, 2208-2220 に開示された。

【０００４】

別の方法は、Fortier らによって開示された（The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome, JEM, Vol. 205, No. 3, March 17, 2008 595-610）。この方法は、酸溶出による非 MHC 結合ペプチドからMHC 結合ペプチドの解離を必要とするという欠点がある。これは、b2m ノックアウト細胞株を使って実施される。そのため、この方法は原発性 - 患者 - 腫瘍物質には使用できない。本方法では、マウス一次胸腺細胞をマウス EL4 細胞株と比較した。開始量は MHC I 分子を測定することにより調整した。これだけは、Fortier らによって開示された方法の厳しい制約である。さらに、異なるサイズの一次組織と組織源に必要とされるような正規化は適用されなかった。むしろ、バランスのとれた出発物質を使用したため、正規化はもはや使用しなかった。しかし、正規化は（患者から得た）一次材料には絶対的に必要である。

【０００５】

免疫応答の刺激は、ホストの免疫システムにより異物であると認識された抗原が存在するかに依存する。腫瘍関連および疾病坑原が存在することが発見され、腫瘍成長に介入するため、宿主の免疫系を利用する可能性が浮上した。体液性免疫応答と細胞性免疫応答の両方を結びつける様々なメカニズムが、現在、がんの免疫療法において研究されつつある。

【０００６】

細胞性免疫応答の特定の要素は腫瘍細胞を特異的に認識し破壊することができる。細胞傷害性T細胞（CTL）が腫瘍浸潤細胞群や末梢血から単離されることから、このような細胞ががんに対する自然免疫防御において重要な役割を果たしていることが示唆される。特にCD8 陽性 T 細胞（T-CD8+）は、主要な組織適合複合体（MHC）のクラス I 分子に結合したペプチドを認識する。通常 8 から10 個のアミノ酸残基を持つこれらのペプチドは、タンパク質またはシトソールに局在するデフェクトリボソームプロダクト（DRIPS）に由来し、この応答で重要な役割を果たしている。ヒトの MHC 分子はヒト白血球抗原（HLA）とも呼ばれる。

【０００７】

MHC 分子には 2 つのクラスがあり、MHC クラス I 分子は核を持つほとんどの細胞に存在していることが分かっている。MHC 分子は、それぞれ、重鎖（α鎖）と β2-ミクログロブリンから（MHC クラス I レセプター）、または、α 鎖と β 鎖（MHC クラス II レセプター）からなる。これらの分子は 3 次元構造をとると、ペプチドとの非共有結合に使われる結合溝を作り出す。MHC クラス I は、主に内在性のタンパク質の分解により生成するペプチドである、DRIP とより大きなペプチドを示す。MH Cクラ I 分子は、主にプロ

フェッショナル抗原提示細胞（APC）に認められ、エンドサイトーシスの過程で APC により取り込まれた後処理される、外因性タンパクまたは膜貫通型タンパクのペプチドを主に与える。ペプチドと MHC クラス I 分子の複合体は、適切な TCR（T 細胞レセプター）を持つ CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞により認識され、ペプチドと MHC クラス II 分子の複合体は、適切な TCR を持つ CD4 陽性ヘルパー T 細胞により認識される。TCR とペプチドと MHC 分子は 1:1:1 の量比で与えられることが良く知られている。

【０００８】

ペプチドが細胞性免疫応答を始動する（引き起こす）には、MHC 分子へ結合が必要である。この過程は MHC 分子の対立遺伝子とペプチドアミノ酸配列の固有の多型性によって決定される。MHC クラス I 結合ペプチドは通常 8 個から 12 個のアミノ酸残基長であり、MHC 分子の対応する結合溝と相互作用するペプチドの配列内に通常 2 つの保存された残基（「アンカー」）を持つ。このようにして、個々の MHC 対立遺伝子は、どのペプチドが結合溝に特異的に結合できるかを決定する「結合モチーフ」を有する。

【０００９】

MHC クラス I 依存性免疫反応において、ペプチドは、腫瘍細胞によって発現中のある種のMHC クラス I 分子と結合可能であることが必要であり、特定の T 細胞レセプター（TCR）を持つ T 細胞によって認識されることも必要である。

【００１０】

腫瘍に特異的な細胞傷害性 T 細胞に認識される抗原、つまり細胞傷害性 T 細胞のエピトープは、酵素、レセプター、転写因子などすべての種類のタンパク質に由来する分子であり、それらの分子は発現され、さらに起源が同一で変化していない細胞と比較して、各々の腫瘍細胞内でアップレギュレートされている。

【００１１】

腫瘍関連または疾病関連抗原の最新の分類は、以下にあげる主要グループからなる。

がん精巣抗原：これまでに同定された T 細胞が認識できる最初の TAA（腫瘍関連抗原の略、疾病関連抗原は DAA と略される）はこのクラスに属し、このクラスは、メンバーが、組織学的に異なるヒト腫瘍および正常組織では、精巣の精母細胞／精原細胞および時折胎盤でのみ発現していることから、初めはがん精巣（CT）抗原と呼ばれていた。精巣の細胞はクラス I 及びクラス II の HLA 分子を発現しないため、これらの抗原は通常 細胞によって認識されず、よって免疫学的には腫瘍特異的であると考えられる。CT 抗原として良く知られている例は、MAGE ファミリーのメンバーまたは NY－ESO-1 である。

分化抗原：これらの TAA は腫瘍及び腫瘍の発生源となった正常組織間で共有され、多くがメラノーマまたは正常のメラニン細胞内で見出されている。これらのメラニン細胞系列関連のタンパク質の多くはメラニンの生合成に関与しており、それゆえに腫瘍特異的でないにもかかわらずがんの免疫療法に広く使用されている。例として、チロシナーゼや Melan-A/MART-1 がメラノーマに、PSA が前立腺癌に使用されているが、これだけに限定されない。

過剰発現 TAA：広く発現している TAA をコード化している遺伝子は組織学的に異なる型の腫瘍で検出され、また正常組織でも低い発現レベルで検出される。正常組織により処理され潜在的に提示されるエピトープの多くが T 細胞に認識される閾値を下回っているが、一方、これらの腫瘍細胞の過剰発現が以前に獲得された耐性を破って抗がん作用を始動させる可能性はありうる。このクラスの TAA の代表例は、Her-2/neu、サービビン、テロメラーゼ及び WT1 である。

腫瘍特異的抗原：これらの特有の TAA は正常の遺伝子（例えば β カテニン、CDK4 など）の突然変異により生じる。これらの分子変化の一部は腫瘍性形質転換と進行の両方又は一方に関与している。腫瘍特異的抗原は正常組織に対する自己免疫反応のリスクを持たずに、通常強い免疫応答を始動させることができる。一方、これらの TAA は多くの場合、これらが同定されたまさにその腫瘍のみに関連しており、通常、個々の多数の腫瘍間では共有されない。

異常な翻訳後修飾により生ずる TAA：このような TAA は、腫瘍内で特異的でもなく過剰

発現もされないタンパク質から生ずるにもかかわらず、腫瘍内で主に活性な翻訳後工程に関連する腫瘍となる。このクラスの例として、MUC1 に関しては腫瘍細胞で新規エピトープに導く、変化したグリコシル化パターンや、腫瘍細胞に特異的または非特異的な、分解過程中のタンパク質スプライシングが挙げられる 。
がんウイルスタンパク質：これらの TAA はがん形成プロセスで非常に重要な役割を果たす可能性のあるウイルスタンパク質であり、異種（ヒト由来ではない）であるので、T 細胞応答を喚起できる。このようなタンパク質の例として、子宮頸癌で発現されるヒトのパピローマタイプ 16 ウイルスタンパク質、E6 と E7 がある。

【００１２】

タンパク質が腫瘍特異的または腫瘍関連抗原、あるいは疾病特異的または疾病関連抗原として細胞傷害性 T リンパ球に認識され、更に、治療に使用されるには、特定の条件を満たしていなければならない。抗原は腫瘍細胞または感染細胞に主に発現し、健常組織では全く発現しないか、比較的少量、例えば 5 倍、10 倍以上の少なさで発現する。

【００１３】

感染症では、2 つの可能性がある。1 つは、感染した細胞が健常細胞では発現しない抗原を発現する可能性で、これは直接感染に関連する。あるいは感染した細胞が健常細胞では極微量のみ発現する抗原を過剰発現する可能性で、これは健常細胞のペプチドームで正常に認められる抗原の過剰発現である。

【００１４】

個々の抗原は、あるタイプの腫瘍、感染または菌株に存在するだけでなく、濃度（1 細胞あたりの各々のペプチドコピー数）が高いことがさらに好ましい。腫瘍特異的抗原と腫瘍関連抗原、および疾病特異的抗原または疾病関連抗原、例えば細胞周期調節やアポトーシス抑制のような機能を原因とする、正常細胞から腫瘍細胞／感染細胞への転換に直接関わるタンパク質から生ずることが多い。

【００１５】

がんの場合、転換の直接原因となるタンパク質の別の下流ターゲットがアップレギュレートされるため、腫瘍には間接的に関連している可能性がある。このような間接的腫瘍関連抗原は、ワクチン両方のターゲットにもなることがある（Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3):187-95）。両方の場合とも、エピトープが抗原のアミノ酸配列に存在することが不可欠である。というのは、このような腫瘍関連または疾病関連抗原由来のペプチド（「免疫原性ペプチド」）が、in vitro または in vivo で T 細胞応答を引き起こすはずだからである。

【００１６】

基本的に、MHC 分子に結合できるいずれのペプチドも、T 細胞エピトープとして機能しうる。in viro または in vivo において T 細胞応答を誘発するには、対応する TCR を有する T 細胞の存在と、さらにこの固有エピトープに対する免疫学的耐性の欠損が必須条件である。

【００１７】

そのため、TAA と DAA は腫瘍ワクチンの開発における出発点である。TAA と DAA を同定し、その特性を示す方法は、患者または健康な被験者から単離できる CTL を使用することに基づくか、または腫瘍と正常組織の間の異なる転写プロフィールまたは異なるペプチド発現パターンの生成に基づいている。

【００１８】

しかしながら、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞株に過剰発現しているか、選択的にそのような組織や細胞株に発現している遺伝子の同定では、免疫療法でこれらの遺伝子から転写中の抗原を利用することに関して正確な情報は得られない。これは、対応する TCR を持つ T 細胞の存在が必要であり、また、この特定エピトープに対する免疫耐性の欠損、または最小化が必要であることから、これらの抗原エピトープの個々の亜集団のみがそのような用途に適しているからである。それゆえ、機能的 T 細胞が認められる MHC 分子と結合した状態で存在する、過剰発現または選択的に発現しているタンパクから、生ペプチドのみ

を選択することが重要となる。そのような機能的 T 細胞は、特異的抗原の刺激によって、クローンを増やし、エフェクター機能を行使できる T 細胞として定義される（「エフェクター T 細胞」）。

【００１９】

ヘルパー T 細胞は、抗腫瘍免疫性において、CTL のエフェクター機能を統合する際に重要な役割を果たす。TH1 タイプのヘルパー T 細胞応答を始動させるヘルパー T 細胞エピトープは、腫瘍関連ペプチド／MHC 複合体を細胞表面に有している腫瘍細胞に対する傷害機能など、CD8 陽性キラー T 細胞のエフェクター機能をサポートしている。このようにして、腫瘍関連ヘルパー T 細胞ペプチドのエピトープは、単独で、または他の主要関連ペプチドと共に、抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の薬剤有効成分とすることができる。

【００２０】

上記の見解から、それ故少なくともある程度次項に関する方法を提供することが本発明の目的である

- 異なる量および MHC 発現レベルの組織サンプルの取り扱いを可能にする、すなわち一次組織サンプルに容易に適用できる。
- 例えば beta2m ノックアウトサンプルを作成する必要がある細胞には限定されない、すなわち一次（ヒト）組織サンプルにも適用可能である。
- 「ハイスループット」レベルで実施できる。
- 漸増的に実施できる、すなわち数年にわたり既存の定量データベースを新しいサンプルデータで拡大する。

【００２１】

本発明の他の目的と利点は、当業者には、提供されるような以下の説明を検討すればすぐに明瞭となる。

【００２２】

以下の説明で、本発明は例としてがんについて記述している。それでもなお本発明の方法では、各免疫応答が MHC クラス I を含む応答である限り、感染症、自己免疫疾患および寄生性感染症にも適用可能である。本発明はさらに、ヒト疾患に限定されず、ほ乳類、例えばウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットやマウスのようなげっ歯動物、ヤギ、および他の家畜またはタスマニアデビルのようながん疾患により絶滅の危機にある動物にも使用できる。

【００２３】

用語の定義

「提示プロフィール」または「提示プロット」という用語は、本明細書では、棒グラフで表された異なるサンプルのペプチドに関する、平均的提示を示す。この提示は最大領域に比べた量をパーセントで表している。バラツキは測定反復数に基づき 95% 信頼区間として表示される。ペプチドはサンプル中で同定されたが、定量は不可能だった場合、NA（該当なし／領域なし）と表示される。

「提示スコア」とは 1 群の組織中のペプチド過剰発現の指標を他群と比較した結果で、0～1 の間の値で表す。提示スコアが小さければ小さいほど、過剰発現の可能性が高くなる。ペプチドがいずれの正常または非疾病サンプルで見出されなかった場合、スコアは計算されず、そのためゼロに設定される。

有意に過剰提示された TUMAP（腫瘍関連ペプチド）セットを測定するには、有意な閾値（例、0.05）を選択し、この閾値よりも小さい提示スコアを持つすべての TUMAP を含める／取得する必要がある。そのため、提示スコアは偶然に過剰提示されたTUMAP 出現の確率を反映している。

統計学的に、提示スコアは線形混合モデルの p 値であると考えられる。この場合、スコアは、変量効果としてサンプル間とサンプル内のバラツキ、および固定効果として例えば腫瘍の実体と正常組織の差を組み入れた提示データ（TUMAP 特徴領域）のモデルとなる。より簡単なアプローチでは、提示スコアは t 検定の p 値であると考えられる。

提示スコアは、FDR（偽発見率）による多変量検定に対して補正される。

「品質管理」という用語は、本明細書では、データを本発明方法で使用可能にするために、本発明方法で使用される前記データが、十分な基準に適合しているかを検証することに関連する。1 例は、同定した配列の総数および解析したサンプルすべてのペプチドの量的再現性に基づく、面積分散の小さい配列数である。すなわち、いくつのペプチド配列がサンプル中で同定できるか（好ましくは信頼性をもって同定される）、またそれらの同定ペプチドの何パーセントが（例、25%、30%、50% または 75%）少ないバラツキの信頼区間（例、CV が20% 以下）に割り当てられるかである。これは、異なるサンプル間で信頼性のある正規化を得るのに必要な条件である。通常、信頼性をもって同定できるペプチド配列数が多いほど、データの質は「より高く」なる。別の例は、同定と区間推定値の質をコントロールすることであり、例えば、ペプチド同定結果と区間再現性の「古典的な」視覚調査によるか、または統計的解析によって行う。

【発明の概要】

【００２４】

本発明の第 1 の態様において、発明の目的は、1 種以上のほ乳類の一次組織サンプル上で、以下のステップからなる MHCリガンドペプチドの同定および無標識定量方法によって解決される。

a）1 つ以上の疾病一次組織サンプルおよび 1 つ以上の健常一次組織サンプル、好ましくは疾病組織に相当するものを提供する。

b）前記サンプルから MHCリガンドペプチドを単離する。

c）前記 MHCリガンドペプチドの HPLC-MS 分析を実施する。

d）ステップ c）から派生し、各シグナルの前駆体イオンシグナル強度（面積）を抽出する。

e）異なる測定操作とサンプルの間の面積をグループ化するために、フラグメントスペクトルのクラスタリングおよびデータベース検索により前記 MHCリガンドペプチドの配列を同定し、さらに反復測定内の面積を正規化し、反復測定間の技術的性能／感度の差を補正し、誤差推定値を含む 1 サンプル当たりの各ペプチドの平均量を得る。

f）異なるサンプル間の比較で対立遺伝子特異的配列サブグループを生成するために前記配列を MHC 対立遺伝子に割り当て、さらに該対立遺伝子特異的サブグループを使って異なるサンプル間を正規化し、異なるサンプルサイズまたは MHC 発現レベルを説明する。その結果がサンプル間で比較可能な相対量となる。

g）サンプルすべてのペプチド再現性に基づきデータの品質管理を実施し、同定した配列総数および面積分散の小さい配列数ができるだけ高いことを検証する。

h）MHC リガンドペプチドの過剰発現の可能性を測定するために、提示プロフィールと提示スコアを計算する。

i）同定と区間推定値の質をコントロールするが、例えば、ペプチド同定結果と区間再現性の外観検査によるか、または統計的解析によって行う。

j）前記の 1 つ以上の疾病一次組織サンプルで検出された値を、前記の 1 つ以上の一次健常組織から得た値と比較する。

k）前記 MHC リガンドペプチドを定量する。

【００２５】

本発明の第 2 の態様おいて、本発明の目的は、一次組織サンプル上で以下のステップからなる MHC リガンドの同定および定量方法によって解決される。

a）1つ以上の疾病一次組織サンプルおよび1つ以上の健常一次組織好ましくは 1 種以上の

哺乳動物の疾病組織に相当するものを提供する。
b）前記サンプルから MHC リガンドペプチドを単離する。
c）前記 MHC リガンドペプチドの HPLC-MS 分析を実施する。
d）ステップ c）から派生し、各シグナルの前駆体イオンシグナル強度（面積）を抽出する。
e）異なる測定操作とサンプルの間の面積をグループ化するために、フラグメントスペクトルのクラスタリングおよびデータベース検索により前記 MHC リガンドペプチドの配列を同定し、さらに反復測定内の面積を正規化し、反復測定間の技術的性能／感度の差を補正し、誤差推定値を含む 1 サンプル当たりの各ペプチドの平均量を得る。
f）異なるサンプル間の比較で対立遺伝子特異的配列サブグループを生成するために前記配列を MHC 対立遺伝子に割り当て、さらに該対立遺伝子特異的サブグループを使って異なるサンプル間を正規化し、異なるサンプルサイズまたは MHC 発現レベルを説明する。その結果がサンプル間で比較可能な相対量となる。
g）ペプチド再現性に基づきデータの品質管理を実施し、同定した配列総数および面積分散の小さい配列数が25 以上、好ましくは50 以上さらに好ましくは100以上であるかを検証する。
h）MHC リガンドペプチドの過剰発現の可能性を測定するために、提示プロフィールと提示スコアを計算する。
i）統計的解析によって同定と区間推定値の質をコントロールする。
j）前記の 1 つ以上の疾病一次組織サンプルで検出された値を、前記の 1 つ以上の健常組織から得た値と比較する。
k）前記 MHC リガンドペプチドを定量する。

【００２６】
好ましくは、本発明に従う方法であって、同定した配列の総数と面積分散が小さい配列数は、定量的比較分析に含まれる他のサンプルよりも有意に低くい値（例、10% あるいは 1% のように 20% 未満）ではない。

【００２７】
好ましくは本発明の方法に従う方法であって、前記 MHC リガンドペプチドは、腫瘍関連ペプチド（TAA）または疾病関連ペプチド（DAA）から選択される。

【００２８】
さらに好ましくは、過剰提示されたおよび／または腫瘍特異的 MHC リガンドペプチドの選択からさらに構成される、本発明に従う方法である。

【００２９】
さらにもっと好ましくは、本発明に従う方法であって、前記疾病サンプルは腫瘍サンプルまたは感染組織サンプルである。本発明の状況において、患者のような被験者に直接由来するサンプルは、細胞株サンプル、例として確立された腫瘍細胞株などに比べて、一次組織または一次腫瘍サンプルなど、「一次」サンプルと呼ばれる。サンプルは本発明に従う方法に適切である限り、新しいものでも保存（例、凍結、または調製ずみ）されていてもよい。

【００３０】
好ましい例として、衝撃冷凍した（一次）組織サンプルの HLA ペプチドプールは、例えば、HLA－A、－B、－C特異的抗体 W6/32 または CNBr 活性化セファロースに結合したHLA-A*02 特異的抗体 BB7.2 を使った固体組織からの免疫沈降、引き続く酸処理と限外ろ過によって得られる。異なる HLA 対立遺伝子に対し、当該分野で既知の他の特異的抗体が使用でき、例として A*03 用の GAP-A3、B 対立遺伝子用の B1.23.2 がある。当該分野でよく知られている、他の哺乳動物用 MHC クラス I ペプチドを得るための対応する方法がある。

【００３１】
本発明に従う方法は、ウイルスまたは細菌感染など、例えば、デング熱、エボラ、マールブルグウイルス、結核（TB）、髄膜炎または梅毒のような感染症の状況でも使用でき、好

ましくは前記方法が、免疫応答が MHC クラス I 応答である限り、感染性微生物の抗生物質耐性株、関節炎などの自己免疫疾患、マラリヤなどの寄生性感染、および多発性硬化症（MS）やパーキンソン氏病など他の疾病で使用される。

【００３２】

表 1 はヒトの寄生性感染の好ましい例を示す。

【表１－１】

原生動物				
生物または疾病の一般名	ラテン名	影響を受ける臓器	有病率	感染源/伝染（保有宿主/ベクター）
バベシア症	Babesia B. divergens, B. bigemina, B. equi, B. microfti, B. duncani	赤血球	ニューヨーク州ビンヤード、ナンタケット島（別種は世界的に分布）	ダニ咬傷
バランチジウム症	Balantidium coli	腸粘膜		
ブラストシスチス症	Blastocystis	腸	集団の2～20%	感染したヒトまたは動物の便で汚染された食物の摂取
コクシジウム類	Cryptosporidium	腸	広範囲	
二核アメーバ症	Dientamoeba fragilis	腸	先進国で最大10%	便で汚染された水または食物の摂取
アメーバ症	Entamoeba histolytica	腸	不衛生で高人口密度な地域と熱帯地域	糞口腔感染
ジアルジア	Giardia lamblia	小腸内腔	広範囲	便により汚染された水/食物中の潜伏嚢胞の摂取
イソスポーラ症	Isospora belli	小腸上皮細胞	世界中－トキソプラズマまたはクリプトスポリジウムより まれ	糞口経路

【表１－２】

リーシュマニア症	Leishmania	皮膚、皮膚粘膜、内臓	内臓リーシュマニア症－世界中、皮膚リーシュマニア症－旧世界；皮膚粘膜リーシュマニア症－新世界	数種の夜行性サシチョウバエによる咬傷
原発性アメーバ性髄膜脳炎	Naegleria fowleri	脳	希少だが死に至る	汚染された暖かい真水、塩素消毒が不十分なプール、温泉、土壌の鼻への注入
マラリア	Plasmodium falciparum（80% of cases）, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae	赤血球	熱帯地域－2億5千万件/年	夜間のハマダラカによる咬傷
リノスポリジウム症	Rhinosporidium seeberi	鼻、鼻咽頭	インドとスリランカ	一般的な池で水浴び中に感染物質と鼻粘膜が接触した
トキソプラズマ症－寄生性肺炎	Toxoplasma gondii	眼、脳、心臓、肝臓	広範囲－ヒトの最大1/3	Toxoplasma bradyzoites体に感染した未調理/加熱が不十分なのブタ/ラム肉/ヤギを摂取、Toxoplasma tachyzoitesに感染した生牛乳の摂取、1日以上経たネコ便のオーシストで汚染された水食物または土壌の摂取
トリコモナス症	Trichomonas vaginalis	女性泌尿生殖器（男性は無症状）	米国人7 千4百万人	性感染症
睡眠病	Trypanosoma brucei	血液リンパと中枢神経系	5 万～7万人	ツェツェバエの夜間咬傷
シャーガス病	Trypanosoma cruzi	大腸、食道、心臓、神経、筋肉、血液	メキシコ、中央アメリカ、南アメリカ－1千6百万～1千8百万人	トリアトーマ/サシガメー昆虫ベクターによる夜間咬傷

【表１－３】

蠕虫生物(寄生虫)				
生物または疾病の一般名	ラテン名	影響を受ける臓器	有病率	伝染/ベクター
十二指腸虫症/鉤虫症	Ancylostoma duodenale, Necator americanus	肺、小腸、血液	熱帯、温帯、多湿気候で主に見られる	第3期幼虫による皮膚浸透
アニサキス症	Anisakis	アレルギー反応	偶発的宿主	生魚、イカ、コウイカ、タコの摂取
回虫－寄生性肺炎	Ascaris sp.Ascaris lumbricoides	腸、肝臓、盲腸、膵臓、肺、レフラー症候群	熱帯/亜熱帯地域で主に見られる	
回虫	Baylisascaris Baylisascaris procyonis, Baylisascaris melis, Baylisascaris transfuga, Baylisascaris columnaris, Baylisascaris devosi, Baylisascaris laevis			種によって異なる。アライグマ、アナグマ、クマ、カワウソ、テンの便汚染物の摂取
	Brugia malayi, Brugia timori	リンパ節	アジアの熱帯地域	節足動物
サナダムシ－サナダムシ感染	Cestoda	腸	希少	
肝吸虫症	Clonorchis sinensis; Clonorchis viverrini			
	Dicrocoelium dendriticum	胆嚢	希少	アリの摂取
腎虫感染症	Dioctophyme renale	腎臓(通常右腎)	世界中	加熱が不十分または生淡水魚の摂取

【表１－４】

裂頭条虫症	Diphyllobothrium latum	腸、血液	ヨーロッパ、日本、ウガンダ、ペルー、チリ	生淡水魚の摂取
ギニア虫症－メジナ虫症	Dracunculus medinensis	皮下組織、筋肉	スーダン	
エノキコックス症－条虫症	Echinococcus granulosus, Echinococcus multilocularis, E. vogeli, E. oligarthrus	肝臓、肺、腎臓、脾臓	地中海沿岸諸国	中間宿主：肉食動物の便汚染物の摂取、固有宿主：草食動物未調理肉（内蔵肉）の摂取
	Echinostoma echinatum	小腸	極東	生魚、軟体動物、カタツムリの摂取
ぎょう虫症	Enterobius vermicularis, Enterobius gregorii	腸、肛門	広範囲；温帯地方	
肝蛭症	Fasciola hepatica, Fasciola gigantica	肝臓、胆嚢	ヨーロッパ、アフリカ、オーストラリア、アメリカ大陸、オセアニアの肝蛭症；アフリカとアジアのみ巨大肝蛭、両種で240万人が感染	淡水魚、カタツムリ
肥大吸虫症―腸内吸虫	Fasciolopsis buski	腸	東アジア－1千万人	感染水生植物または水の摂取（中間宿主：両生カタツムリ）
顎口虫症	Gnathostoma spinigerum, Gnathostoma hispidum	皮下組織（皮膚下）	希少－東南アジア	生または加熱が不十分な肉（例、淡水魚、鶏肉、カタツムリ、カエル、ブタ）または汚染水の摂取
膜様条虫症	Hymenolepis nana, Hymenolepis diminuta			コクヌストモドキ、チャイロコメノゴミムシダマシ、ゴキブリによる汚染物の摂取
ロア糸状虫、カラバール腫脹	Loa loa filaria	結合組織、肺、眼	西アフリカ熱帯雨林－1千2百万～1千3百万人	アブ科ウマバエによる昼間咬傷

【表１－５】

マンソネラ症、フィラリア症	Mansonella streptocerca	皮膚の皮下層		昆虫
横川吸虫症－腸内吸虫	Metagonimus yokogawai		シベリア。満州、バルカン諸国、イスラエル、スペイン	加熱が不十分または塩漬け魚の摂取
河川盲目症	Onchocerca volvulus, Onchocerciasis	皮膚、眼、組織	アフリカ、イエーメン、中米、南米の冷たい急流河川の近く	ブユ/ブヨによる昼間咬傷
中国肝吸虫症	Opisthorchis viverrini, Opisthorchis felineus, Clonorchis sinensis	胆管	ロシアで1千5百万人	感染した生、薄塩、冷凍魚の消費
肺吸虫症	Paragonimus westernani; Paragonimus africanus; Paragonimus caliensis; Paragonimus kellicotti; Paragonimus skrjabini; Paragonimus uterobilateralis	肺	東アジア	生、加熱が不十分な淡水カニ、ザリガニ、他の甲殻類の摂取
住血吸虫症	Schistosoma sp.		アフリカ、カリブ海、南米東部、東アジア、中東－2億人	感染淡水カタツムリに汚染された水への皮膚曝露
腸住血吸虫症	Schistosoma mansoni	腸、肝臓、脾臓、肺、皮膚	アフリカ、カリブ海、南米、アジア、中東－8千3百万人	ビオンファラリア感染淡水カタツムリに汚染された水への皮膚曝露
膀胱住血吸虫症	Schistosoma haematobium	腎臓、膀胱、尿管、肺、皮膚	アフリカ、中東	ブチヌス感染カタツムリに汚染された水への皮膚曝露
日本住血吸症虫	Schistosoma japonicum	腸、肝臓、脾臓、肺、皮膚	中国、東アジア、フィリピン	日本住血吸虫感染カタツムリに汚染された水への皮膚曝露
アジアの腸住血吸虫	Schistosoma mekongi -		東南アジア	感染住血吸虫媒介貝、淡水カタツムリに汚染された水への皮膚曝露

【表１－６】

孤虫症	Spirometra erinaceieuropaei			感染したイヌまたはネコの便汚染物の摂取（ヒト：行き止まり宿主）
糞線虫症−寄生性肺炎	Strongyloides stercoralis	腸、肺、皮膚（流動幼虫）		皮膚浸透
無鉤条虫	Taenia saginata	腸	世界各地に分布	加熱が不十分な牛肉の摂取
有鉤条虫	Taenia solium			加熱が不十分な豚肉の摂取
トキソカラ症	Toxocara canis, Toxocara cati	肝臓、脳、眼（イヌ回虫−内臓幼虫移行症、眼幼虫移行症）	世界各地に分布	異食症、イヌ回虫卵で汚染された未洗浄食物、加熱が不十分なトリレバー
旋毛虫症	Trichinella spiralis, Trichinella britovi, Trichinella nelsoni, Trichinella nativa	筋肉、眼窩周囲領域、小腸	先進国では授乳方法が改善されているため、開発途上国でより一般的	加熱が不十分な豚肉の摂取
水泳者かゆみ症	Trichobilharzia regenti, Schistosomatidae			汚染水への皮膚曝露（カタツムリと脊椎動物）
鞭虫	Trichuris trichiura, Trichuris vulpis	大腸、肛門	世界中で一般的	ヒト糞便で汚染された豆、米、および様々な穀物または土壌などの乾燥品中の卵の不慮の摂取
象皮症（リンパ管フィラリア症）	Wuchereria bancrofti	リンパ系	熱帯、亜熱帯地方	蚊による夜間咬傷

【表１－７】

他の生物				
生物または疾病の一般名	ラテン名（分類）	影響を受ける臓器	有病率	伝染/ベクター
寄生蠕虫	Archiacanthocephala			
寄生虫咽頭炎症候群	Linguatula serrata	鼻咽頭	中東	生または加熱が不十分なリンパ節（例、感染したラクダおよびバッファローの肉）の摂取
ハエ蛆症	Oestroidea, Calliphoridae, Sarcophagidae	死滅または生きた組織		
ヒトウマバエ	Dermatobia hominis	皮下組織	中米と南米	蚊とサシバエ
カンディル	Trichomycteridae	尿道	アマゾン川流域	適切な防具なしで魚の生息する水への排尿

【００３３】

自己免疫疾患（自己免疫疾患であると正式に公表されていない疾患も含む）の例は、慢性閉塞性肺疾患、強直性脊椎炎、クローン病（2 種類の突発性炎症性腸疾患「IBD」の 1 つ）、皮膚筋炎、1 型糖尿病、子宮内膜症、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギランバレー症候群（GBS）、橋本病、汗腺膿症、川崎病、IgA 神経症、突発性血小板減少性紫斑病、間質性膀胱炎、紅斑性狼瘡、混合結合組織病、局限性強皮症、重症筋無力症、ナルコレプシー、神経性筋緊張病、尋常性天疱瘡、悪性貧血、乾癬、乾癬性関節炎、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、再発性多発性軟骨炎、関節リュウマチ、統合失調症、強皮症、シェーグレン症候群、全身硬直症候群、側頭動脈炎（「巨細胞性動脈炎」としても知られている）、潰瘍性大腸炎（2 種類の突発性炎症性腸疾患「IBD」の 1 つ）、脈管炎、白斑、およびヴェーゲナー肉芽腫症である。

【００３４】

本発明はヒト疾患に限定されず、ほ乳類、例えばウシ、ブタ、ウマ、好ましくは競争馬、ネコ、イヌ、ラットやマウスのようなげっ歯動物、ヤギ、およびタスマニアデビルのようながん疾患により絶滅の危機にある他の家畜やほ乳動物にも使用できる。

【００３５】

本発明に従う方法のさらに別の好ましい実施形態においては、品質管理は少なくとも一部で自動化および／あるいは手動または外観検査を利用している。

【００３６】

本発明に従う方法のさらに別の好ましい実施形態は、保持時間を調製し、配列についての知識なしに反復測定内で対応するシグナルを割り当てる、および／または配列情報なしで保持時間を調整することにより異なるサンプル間の対応するシグナルを割り当てるステップd）、遺伝子 1 つ当たり 2 以上のペプチドから相対的提示データを実行し、遺伝子中心の過剰提示スコアを計算するステップh）、および注入したペプチドに基づき品質管理を実行するステップi）のグループから選択した 1 つ以上のステップを含む。

【００３７】

最も好ましくは、本発明に従う方法は in vitroで実施される。

【００３８】

本発明に従う方法のまた別の好ましい実施形態においては、前記方法のステップは請求項または上述に示したような順序で実施される。本発明に従う方法のまた別の好ましい実施形態においては、前記方法は上述および本明細書に記述のステップから構成される。

【００３９】

本発明に従う方法のさらに好ましい態様において、前記方法はさらに、前記方法によって合成機または手動で同定および／または定量されるような、1 つ以上の前記 MHC リガンドペプチドを合成するステップを含む。

【００４０】

好ましくは、前記 MHC リガンドペプチドを、免疫原性について合成ペプチドまたは精製ペプチドとしてテストするステップをさらに含む、本発明に従う方法である。各方法は、当業者には既知であり、各参考文献および本明細書で記述されている。

【００４１】

本発明に従う方法のさらに好ましい態様において、前記方法は患者の個別治療と診断に関する。このため、分析時の前記サンプルは個人に由来している。また、同定および／または定量時の前記 MHC リガンドペプチドに基づいた、個別の MHC リガンドプロフィール、好ましくは個別の疾病特異的 MHC リガンドプロフィールは、本明細書に説明したように本発明に従う方法に基づき作成できる。

【００４２】

本発明に従う方法のさらに好ましい態様において、同定配列の前記総数および面積分散の小さい配列数は 5 を、好ましくは 25 を、さらに好ましくは 50 を、最もこのましくは 100 を超える。

【００４３】

驚いたことに、本発明の状況において発明者は、発現解析を単離／分析した抗原腫瘍ペプチドの定量と組み合わせて、個別ワクチンの特定候補がすぐに同定できることを見出した。最初に、本発明によって提供されたこの新しいアプローチは、数種の異なる非がん性組織または非感染性組織および臓器と比較した、がんおよび他の感染組織の MHC 制限好ましくは HLA 制限ペプチドレベルの直接的相対定量に基づき、関連する過剰提示ペプチドワクチン候補の同定と選択を可能にする。これは、適当なデータ解析情報ルート、配列同定用組み合わせアルゴリズム、スペクトルクラスタリング、イオン計数、および正規化よって処理された液体クロマトグラフィー質量分析データを使った無標識分別定量の開発によって達成された。このアプローチはいずれの HLA クラス I 対立遺伝子からのペプチドへも適用でき、ルーチンの定量法は、一例として 2 つの非常に一般的な対立遺伝子および数種の異なる腫瘍実体についてすでに実施されている。広範囲に及ぶ検証実験が我々の結果の確度を裏付けた。正規化方法は、アフィニティークロマトグラフィー溶出液中の

β2 ミクロブロブリンレベルの測定により確証された。

【００４４】

一般的に使用される「逆免疫」アプローチは、タンパク質配列から HLA 結合ペプチドを選択するための予測アルゴリズムに基づいているが、これらのアプローチが抗原処理の重要ステップを無視するという問題から阻まれている。この方法を選択した殆どのペプチドは、HLA と結合していているがタンパク質から処理されていないので、一次組織の細胞または細胞株上で生理学的に存在しない。

【００４５】

本発明に従う方法の別の好ましい実施形態において、前記方法は無標識、すなわち、標識を使用していない。特に化学物質標識で、例えば分析されるペプチドに対して無標識である。

【００４６】

本発明に従う方法のさらに別の好ましい実施形態においては、前記方法ではさらに、ノックアウト細胞、細胞株、および動物の使用を考慮していない。

【００４７】

本発明に従う方法のもう一つの好ましい態様において、単離された MHC/HLA リガンドは、逆相クロマトグラフィー（例、nanoAcquity UPLC システム、Waters）により疎水性に従って分離され、続いて LTQ-Orbitrap ハイブリッド質量分析計（ThermoElectron）により検出される。各サンプルは LCMS 測定を5回繰り返し、無標識で分析される。LCMS データは、LCMS 調査とタンデム MS（MS/MS）データを分析することにより処理される。データ解析は、漸増し反復されるサンプル収集に対処するように最適化される。

【００４８】

発生するタンデム MS スペクトルは、msn 抽出（ThermoScientific）によって抽出され、IPI データベースのようなタンパク質データベースに対抗する Sequest で検索された。タンパク質データベースのヒットはその後、HLA ペプチドミクスデータ用に最適化した閾値を使い、自動品質フィルタリングにより検証された。

【００４９】

同定感度の増大に対して、社内で開発したスペクトルクラスタリングアルゴリズムを使用して、スペクトルを、IFL（Immatics Fragment spectra Library）に収集されている既知ペプチド MS/MS に割り当てた。新たな LCMS 測定の MS/MS スキャンを、IFL のスキャン毎に徐々に増大させながら追加した。クラスタリングは、スペクトルデータに採用された、成長している k 平均法クラスタリングアルゴリズムを使用している。

【００５０】

配列同定とフラグメントスペクトルクラスタリングのため、そこで、異なる測定とサンプルから同一の配列またはクラスターに対する強度値（面積）をグループ化することは可能である。

【００５１】

異なるサンプル間で同じ HLA 対立遺伝子に制限されたペプチドグループの比較は、精製に使用された一般的な対立遺伝子特異的抗体に基づいて、もし入手可能か代替になるなら、アンカーアミノ酸パターン法による配列の一般的 HLA 対立遺伝子への割り当てに基づいて可能である。

【００５２】

各新しいデータセットはデータベースに統合され（例えば MySQL）、得られるプロテオミックデータおよびゲノミックデータ、さらに文献データと相互参照される。

【００５３】

LCMS 調査データは、イオン計数および高質量確度を使用することで、独立して解析される。LCMS シグナルと統合シグナル領域を抽出するには、例えば、プログラム SuperHirn によって実施されるアルゴリズムを見つけ出す特徴（L. N. Mueller, O. Rinner, A. Schmidt, S. Letarte, B. Bodenmiller, M. Y. Brusniak, O. Vitek, R. Aebersold, and M. Muller. SuperHirn - a novel tool for high resolution LC-MS-based peptide/protei

n profiling. Proteomics. 7 (19):3470-3480, 2007）が使用できる。
【００５４】
両データセットを組み合わせると、各同定されたペプチドに対する定量的データが得られ、それらは後に、技術的な反復回数間（LC-MS 測定）および腫瘍や健常組織（上述参照）のように異なる組織源のサンプル間のバラツキを説明するために、中心傾向正規化に基づいて2 段階アプローチによって正規化され得る。後者の差は、例えば、異なる MHC 発現レベルまたは出発物質の異なる量が原因であるか、これに由来する。
【００５５】
好ましい実施形態におい、最大の信頼性に対して反復領域間で 25% 好ましくは 20% 未満の変動係数（CV）を有するペプチドのみが、最初の正規化ステップで考慮される。
【００５６】
過剰提示されたペプチドを抽出するために、提示プロフィールが計算されサンプル提示の中央値と反復測定のバラツキを示す。プロフィールは、関心のある腫瘍実体サンプルを正常組織サンプルのベースラインと対比させるために並べて置く。これらの各プロフィールは続いて、誤発見率（False Discovery Rate: FDR）（Y. Benjamini and Y. Hochberg. Controlling the False Discovery Rate:A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (No.1):289-300, 1995）による多変量検定を補正する線形混合効果モデル（J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, Sarkar D., R Core team. nlme:Linear and Nonlinear Mixed Effects Models.2008）の p 値を計算することにより、過剰提示スコアに整理統合されうる。
【００５７】
可能な候補ワクチンとして選択されたペプチドの配列割当と領域は、手動による検査によって確認される。
【００５８】
本発明のさらに好ましい選択的ステップは、LC-MS の反復測定間の保持時間を調整し、最初の正規化ステップで、シグナルへの配列割当の必要性を回避することである。
【００５９】
本発明のさらに好ましい選択的ステップは、異なるサンプル間の保持時間を調整し、2番目の正規化ステップで、シグナルへの配列割当の必要性を回避することである。
【００６０】
本発明でさらに好ましい選択的ステップは、同一遺伝子から 1 つ以上のペプチドが同定される場合、単一ペプチド過剰提示スコアを組み合わせて、遺伝子中心の過剰提示スコアを計算することである。
【００６１】
本発明のさらに好ましい選択的ステップは、サンプルに注入された明確な量の分子に基づいて、反復測定の正規化を自動的に品質管理することである。
【００６２】
抗原性ペプチドを単離し、それらを遺伝子発現および腫瘍性組織のプロフィールに至る細胞提示と一致させると、膨大な数の免疫活性ペプチドの取得が避けられる。むしろ、特定のペプチドが本発明に従って同定され、それらは MHC 分子によって実際に提示され、そのため免疫活性ペプチドとして適切である。
【００６３】
本発明に従う方法により、患者特異的ペプチドを同定することはさらに可能であり、すなわち、今後ワクチンとして使用されるようなペプチドを、患者と正確に一致させ、特異的免疫反応を誘発することが可能となる。
【００６４】
例えば、産業研究所は患者サンプルを受け取った後、本方法を系統的に効果的に実施でき、適切な免疫活性ペプチドを同定した後、ペプチド配列の決定はクリックに任せる。つまりクリニックはそこで、ペプチドを合成し投与できる。それでもなお、研究所は各患者に

適切なペプチドの同定および生産の実施も可能である。
【００６５】
そのため、本発明の新しい方法は、単なるサービスの範囲内で適用でき、また同定した免疫活性ペプチドの供給と組み合わせても適用できる。
【００６６】
さらに本発明の態様は免疫活性ペプチドであり、本発明に従う方法によって同定および／または調製される。同定後これらのペプチドは、患者の治療用に選択的に特異的に調製できる。
【００６７】
本発明の別の態様は次に、本発明に従う方法によって同定および／または調製された 1 つ以上のペプチドを含む薬剤組成に関する。
【００６８】
この組成は、例えば、非経口、例えば皮下、皮内、または筋注で投与される可能性もあり、処方と標的疾患によって経口投与されることもある。このようにするには、ペプチドは製剤的に使用可能な担体、好ましくは水溶性担体に溶解または懸濁させる。さらに組成は、添加物、例えばバッファー、結合剤などを含むことができる。
ペプチドは、免疫刺激物質、例えばサイトカインなどと共に投与することもできる。
【００６９】
本発明の1 態様に従い、ペプチドは腫瘍性疾患の治療に、さらに腫瘍性疾患の治療薬の調製に使用される可能性がある。
【００７０】
治療される腫瘍性疾患には、腎臓癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、睾丸癌および／または皮膚がんまたはAML（急性骨髄性白血病）などの血液がんのような固形がんを含む。この一連の腫瘍性疾患は単に例であって、適用範囲を限定するものではない。
【００７１】
ペプチドは、さらに腫瘍性疾患の治療コースの評価に使用できる。
【００７２】
本ペプチドは、他の予防接種または療法のモニターにも使用できる。そのため、本ペプチドは治療だけでなく診断にも使用できる可能性がある。
【００７３】
本発明のさらなる態様は次いで、抗体発生のペプチドの使用に関する。ポリクローナル抗体は、一般的な方法、動物の予防接種、ペプチド注射、および引き続く免疫グロブリンの精製で得られる。モノクローナル抗体は、当分野で既知の標準化プロトコールに従って作成できる。
【００７４】
本発明のさらなる態様は、本発明に従う方法で単離されたペプチドをコード化する核酸分子である。核酸分子はDNA または RNA 分子であり、同様にがんの免疫療法に使用できる。本発明の1 態様に従い、核酸分子は、例として発現ベクターのようなベクター内で提供されうる。
【００７５】
本発明のさらなる態様は、細胞が本発明に従って同定されたペプチドを生成するような核酸分子（例、発現ベクター内で）によって、遺伝的に修飾される細胞に関する。
【００７６】
本発明の別の態様は、開示された方法に従ってペプチドが同定され、同定ペプチドが in vitro または in vivo で化学的に合成される、免疫活性ペプチドの製造方法に関する。
ペプチドは、当該分野で既知の標準的方法に従い、アミノ酸の化学的結合によって調製できる。
【００７７】
ペプチドは例えば、in vitro では無細胞系で、in vivo では細胞を使って調製できる。
ペプチドは、例えば EP2111867 でLewandrowski らによって開示されているように製剤化

できる。
【００７８】
その上、さらなる 1 態様は、末梢血白血球、好ましくは T 白血球の単離抗原性ペプチドに対する反応性をテストするさらなるステップを含む、本発明に従う方法に関する。
【００７９】
さらなる 1 態様は、単離抗原性ペプチドに対する末梢血白血球の反応性は、白血球により合成される γ インターフェロン mRNA および／またはサイトカイン mRNA を測定することによりテストされる、本発明に従う方法に関する。
【００８０】
γ インターフェロンまたはサイトカイン mRNA を検出することにより、白血球、好ましくは T リンパ球の抗原性ペプチドに対する反応性を正確に証明することが可能である。両物質は、対応する抗原性ペプチドによる活性化後、活性化された T リンパ球によって分泌される。
【００８１】
その上、別の態様は、T リンパ球の存在が検出されるさらなるステップが実施される、本発明に従う方法に関する。この方法を使うと、単離同定したペプチドを認識する T リンパ球がどの程度事前に患者に存在しているかを特異的に検出することが可能である。このステップを実施すると、患者に事前に存在している T リンパ球が認識するこれらのペプチドのみをワクチンとして適用することが可能である。そこで、前記ペプチドはこれらの特異的 T リンパ球を活性化するために使用できる。
【００８２】
さらなる 1 態様は、事前に存在する特異的 T リンパ球の検出が、抗原提示分子と抗原性ペプチドの再構築複合体により白血球をラベルすることにより実施される、本発明に従う方法に関する。
【００８３】
現在まで本発明者によって、11,000 種類を超えるペプチドが、70 件のがんサンプルと 40 件の非がんサンプルにおいて定量された。個別のがん実体内の過剰提示と、すべての単一ペプチドおよびサンプルの信頼区間を含む平均提示レベルについて、有意なスコアが確立された。非がん性組織と臓器に対し、腫瘍組織だけに提示されるペプチドおよび腫瘍に過剰提示されるペプチドが同定された。
【００８４】
「ペプチド」という用語は、本明細書では、隣接したアミノ酸の α アミノ基及びカルボニル基間のペプチド結合によって、通常お互いの間を接続する一連のアミノ酸残基を表すために使用される。前記ペプチドは、好ましくは 9 アミノ酸長であるが、最短で 8 アミノ酸長、最長で 10、11、12、13、または 14 アミノ酸長である。
【００８５】
「オリゴペプチド」という用語は、本明細書では、隣接したアミノ酸の α アミノ基とカルボニル基間のペプチド結合によって、通常互いに結合された一連のアミノ酸残基を表すために使用される。正しいエピトープの 1 つあるいは複数がそこに維持される限り、オリゴペプチドの長さは本発明に決定的なものではない。オリゴペプチドの長さは通常、アミノ酸残基約 30 個未満で、アミノ酸は約 14 個を超える。
【００８６】
「ポリペプチド」という用語は、隣接したアミノ酸の α アミノ基とカルボニル基間のペプチド結合によって、通常互いに結合された一連のアミノ酸残基を表す。正しいエピトープがそこに維持される限り、ポリペプチドの長さは本発明に決定的なものではない。ペプチドやオリゴペプチドという用語に比べ、ポリペプチドという用語は、アミノ酸残基が約 30 個を超えるタンパク質分子を示す。
【００８７】
かかる分子をコード化するペプチド、オリゴペプチド、タンパク質、またはポリヌクレオチドは、免疫応答を誘発できる場合、「免疫原性」（従って、本発明内では「免疫原」）

である。本発明の場合には、免疫原性は T 細胞が介在する応答を誘発する能力としてより明確に定義される。従って、「免疫原」は、免疫応答の誘発が可能な分子で、本発明の場合は、T 細胞応答を誘発できる分子と考えられる。

【００８８】

T 細胞の「エピトープ」は、クラス I MHC 受容体に結合し、三元複合体（MHC クラス I α 鎖、β－2－ミクログロブリン、およびペプチド）を形成する短鎖ペプチドを必要とし、この三元複合体は、適度な親和性で MHC／ペプチド複合体と結合する対応 T 細胞受容体を有する T 細胞によって認識されうる。MHC クラス I 分子と結合するペプチドは通常、8～14 個のアミノ酸長で、最も典型的には 9 個のアミノ酸長である。

【００８９】

ヒトでは、MHC クラス I 分子をコード化する 3 つの異なる遺伝子座、HLA-A、HLA-B および HLA-C がある（ヒト MHC 分子はヒト白血球抗原（HLA）とも呼ばれる）。

HLA-A*01、HLA-A*02 および HLA-A*024 は、これらの遺伝子座から発現されうる、異なる MHC クラス I 対立遺伝子の例である。

【００９０】

治療の免疫療法アプローチ

【００９１】

免疫応答の刺激は、ホストの免疫システムにより異物であると認識された抗原が存在するかに依存する。腫瘍関連抗原が存在することが発見され、現在、腫瘍の発育に介入するため、宿主の免疫系を利用する可能性が浮上している。体液性免疫系と細胞性免疫系の両方を結びつける様々なメカニズムが、現在、がんの免疫療法において研究されつつある。

【００９２】

細胞性免疫応答の特定の要素は腫瘍細胞を特異的に認識し破壊することができる。細胞傷害性 T 細胞（CTL）が腫瘍浸潤細胞群や末梢血から単離されることから、このような細胞ががんに対する自然免疫防御において重要な役割を果たしていることが示唆される。タンパク質に由来する通常 8 個から 12 個の残基ペプチドを持つ、主要組織適合遺伝子複合体クラス I 分子（MHC クラス I 分子）、つまりシトソールに存在するデフェクトリボゾームプロダクト（defect ribosomal products 、DRIP）を認識する CD8 陽性T細胞は特に、この応答に重要な働きをしている。ヒトの MHC 分子はヒト白血球抗原（HLA）とも呼ばれる。

【００９３】

MHC クラス I 分子は、核を有する殆どの細胞にみられ、主に内因性、細胞質性または核タンパク質、DRIPS、より大きなペプチドのタンパク質分解的切断によって生じたペプチドを提示する。しかし、エンドソーム区画または外因性供給源に由来するペプチドも、MHC クラス I 分子に認められることが多い。この非古典的なクラス I の提示方法は、文献ではクロスプレゼンテーションと呼ばれている。

【００９４】

タンパク質が腫瘍特異抗原または腫瘍関連抗原として細胞傷害性 T リンパ球に認識され、更に、治療に使用されるには、特定の条件を満たしていなければならない。この抗原は主に腫瘍細胞に発現されるものであり、正常な健康組織には発現されないか、比較的少量で発現される。個々の抗原はあるタイプの腫瘍細胞に存在するだけでなく、濃度（1 細胞につき各々のペプチドのコピー数）が高いことがさらに好ましい。腫瘍特異抗原および腫瘍関連抗原は、例えば細胞周期の制御やアポトーシスのような機能により、正常細胞から腫瘍細胞への形質転換に直接関わるタンパク質から生ずる。更に、形質転換の直接原因となるタンパク質の下流ターゲットはアップレギュレートされるため、腫瘍に間接的に関連している可能性がある。このような間接的腫瘍関連抗原が、ワクチン療法のターゲットであってもよい。いずれの場合も、エピトープが抗原のアミノ酸配列に存在することが不可欠であり、これは、このような腫瘍関連または疾患関連抗原由来のペプチド（「免疫原性ペプチド」）が、in vitro または in vivo で T 細胞応答を引き起こすためである。

【００９５】

基本的に、MHC 分子に結合できるいずれのペプチドも、T 細胞エピトープとして機能しうる。in viro または in vivo において T 細胞応答を誘発するには、対応する TCR を有する T 細胞の存在と、さらにこの固有エピトープに対する免疫学的耐性の欠損が必須条件である。そのため、TAA は腫瘍ワクチンの開発における出発点である。TAA を同定し、その特性を示す方法は、患者または健康な被験者から単離できる CTL を使用することに基づくか、または腫瘍と正常組織の間に異なる転写プロフィールまたは異なるペプチド発現パターンが生じることに基づいている（Lemmel et al. 450-54;Weinschenk et al. 5818-27）。しかしながら、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞株に過剰発現しているか、選択的にそのような組織や細胞株に発現している遺伝子の同定では、免疫療法でこれらの遺伝子から転写中の抗原を利用することに関して正確な情報は得られない。これは、対応する TCR を持つ T 細胞の存在が必要であり、また、この特定エピトープに対する免疫耐性の欠損、または最小化が必要であることから、これらの抗原エピトープの個々の亜集団のみがそのような用途に適しているからである。それゆえ、機能的T細胞が認められる MHC 分子と結合した状態で存在する、過剰発現または選択的に発現しているタンパクから生ペプチドのみを選択することが重要となる。そのような機能的 T 細胞は、特異抗原の刺激によって、クローンを増やし、エフェクター機能を行使できる T 細胞として定義される（「エフェクター T 細胞」）。

【００９６】

ヘルパー T 細胞は、抗腫瘍免疫性において、CTL のエフェクター機能を統合する際に重要な役割を果たす。TH1 タイプのヘルパー T 細胞応答を始動させるヘルパー T 細胞エピトープは、腫瘍関連ペプチド／MHC 複合体を細胞表面に有している腫瘍細胞に対する傷害機能など、CD8 陽性キラー T 細胞のエフェクター機能をサポートしている。このようにして、腫瘍関連ヘルパー T 細胞ペプチドのエピトープは、単独または他の主要関連ペプチドと共に、抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の薬剤有効成分として働く。

【００９７】

CD8 および CD4 依存型の 2 つの免疫応答タイプは共に、連携し、相乗的に抗腫瘍効果に寄与しているため、CD8+ CTL（MHC クラス I 分子）または CD4 陽性 CTL（MHC クラス II 分子）のいずれかにより認識される腫瘍関連抗原の同定と特徴決定は腫瘍ワクチンの開発において重要である。そのため、いずれかのクラスの MHC 複合体に結合するペプチドを含むペプチド組成物を提供することが、本発明の目的である。

【００９８】

重度な副作用とがん治療、予後改善、診断法に関連する費用を考慮することは必要不可欠である。それ故、がん、特に胃癌に対するバイオマーカーを代表する他の要因を同定する必要がある。さらに、がん治療全般、特に胃癌で使用されうる要因を同定することも必要である。

【００９９】

さらに、前立腺全摘術後、局所進行性がんの増殖があり、腫瘍の原発部位での残存が通常原因である生化学的な再発を伴う、胃癌患者に対する治療デザインは確立されていない。現在使用できる治療方法に比べ、治療の有効性は同等であるが罹患率が低い新たな治療方法が望ましいのである。

【０１００】

本発明は、胃癌および本発明のペプチドを過剰提示させる他の腫瘍の治療に有用であるペプチドを提供する。これらのペプチドはヒト原発性胃癌サンプル上で HLA 分子によって自然に提示されることが質量分析法により示された（例 1 および図 1）。

【０１０１】

ペプチドが由来する遺伝子源は、正常組織と比較して、胃癌、腎細胞癌、大腸癌、非小細胞肺癌、腺癌、前立腺癌、良性新生物、および悪性黒色腫で高く過剰発現することが示され（例 2 と図 2 を参照）、ペプチドが腫瘍に高く関与していることを証明している。すなわち、これらのペプチドは正常組織ではなく腫瘍組織で強く提示される。

【０１０２】

免疫系、特に T リンパ球／T 細胞は、MHC/HLA と結合したペプチドを認識できる。T 細胞は、例えば、由来ペプチドを提示する胃癌細胞など、認識さる MHC または HLA ペプチド複合体を提示する細胞を破壊できる。

【０１０３】

本発明は、これから以下の例でさらに説明されるものであるが、それだけに限定されない。添付された図および配列リストは以下の通りである。

【図面の簡単な説明】

【０１０４】

【図１－１】原発性腫瘍サンプル GC2464 に提示されることが示された CDC2-001 の典型的な質量スペクトルを示す。NanoESI-LCMS は、GC サンプル 2464 から溶出したペプチドプールで実施された。A）m/z 597.3501 ± 0.001 Da, z = 2 での質量分析クロマトグラムは、保持時間 151.63 min でペプチドピークを示している。 B）マスクロマトグラムで検出された 151.63 min のピークは、質量スペクトルでは m/z 597.3501 のシグナルを示した。C）特定の保持時間でのnanoESI-LCMS 実験で記録された、選択した前駆体 m/z 597.3501 から衝突誘発された減衰質量スペクトルで、GC2464 腫瘍サンプル中の CDC2-001 の存在が確認された。D）合成 CDC2-0011 のフラグメンテーションパターンが記録され、配列確認のために C で示した、生成した天然 TUMAP のフラグメンテーションパターンと比較された。

【図１－２】同上

【図２－１】正常組織と胃癌サンプル25件で選択したタンパク質（CDC2（Probeset ID:203213_at）、ASPM（Probeset ID:219918_s_at））の mRNA の発現プロフィールを示す。

【図２－２】同上

【図３】クラス I TUMAP のペプチド特異的 in vitro 免疫原性の典型的な結果を示す。CD8+T 細胞は、関連（左パネル）および非関連ペプチド（右パネル）を各々装填した人工 APC を使ってプライムされた。刺激サイクルを 3 回実施後、関連 A*2402 多量体と非関連を合わせた二重染色により、ペプチド反応細胞の検出が行われた。示された細胞は CD8+ リンパ球のゲートを通過させ、プロットの数値は多量体陽性細胞の割合を示す。

【図４】PTPRZ1（チロシンホスファターセ、受容体タイプ、Z ポリペプチド 1）HLA クラス I ペプチドの提示プロフィールを示す。

【図５】CDK1（サイクリン依存性キナーゼ 1）の HLA クラス I ペプチドの提示プロフィールを示す。

【図６】ASPM（asp（異常紡錘体）ホモログ、小頭症に関連（ショウジョウバエ））の HLA クラス I ペプチドの提示プロフィールを示す。

【図７】相対的な b2m タンパク質発現は、異なる組織サブタイプで顕著に変化しないことを示している。

【図８】酵母アルコールデヒロトゲナーゼ 1 の合成ペプチドを注入して得た、そのままのシグナル領域と正規化シグナル領域を示す。 異なる保持時間を示す 合計 7 種の注入ペプチドにおいて、荷電状態と配列長が品質管理に使用される。そのままのシグナル領域は、サンプル内およびサンプル間のバラツキを捉える、例えば、質量分析計の設定の変更によるバイアスを除くなど、2 段階アプローチによって正規化された。反復測定内の差が正常肺組織の 969 サンプルで示されている。

【図９】手術で切除した正常および腫瘍組織および健常ドナーの血液サンプルが以下の段階的アプローチで分析されたことを示す。1. 悪性および健常組織の HLA リガンドが同定され、過剰発現された TUMAP（腫瘍関連ペプチド）を測定するため、無標識液体クロマトグラフィー質量分析（TUMAP）によって発現差異が定量された。2. マイクロアレイによるゲノム規模のメッセンジャーリボ核酸（mRNA）発現分析を利用し、一連の正常な臓器および組織と比較し、悪性組織で過剰発現した遺伝子を同定した。3. 同定した HLA リガンドを遺伝子発現データと比較した。第 2 段階で検出された、選択的に発現または過剰発現された遺伝子によりコード化される過剰提示 TUMAP は、マルチペプチドワクチンを開発するために適切な候補 TUMAP とみなした。4. TUMAP として同定したペプチドの関連性を

支持する別の証拠を明確にし、別の経路で不可欠な役割を果たすタンパク質の可能性を除外するために、文献検索を実施した。5. 健常個人の血液の末梢 T 細胞について、数種の免疫アッセイ（in vitro T 細胞アッセイ）により TUMAP 候補に対する反応性をテストした。

【図１０】ペプチド YLLPAIVHI の 122 分におけるシグナルで OpenMS（M. Sturm and O. Kohlbacher.TOPPView:an open-source viewer for mass spectrometry data.J Proteome. Res 8 (7):3760-3763, 2009）法によりプロットした部分的 LCMS マップを示す。

【０１０５】

SEQ ID No. 1～27 は表 3 のペプチドとその例を示す。

【発明を実施するための形態】

【０１０６】

以下の例は、TAA／がんの状況における本発明の方法を説明している。これらの例は、本発明の好ましい 1 実施形態にすぎず、本発明はこれらに限定されない。本発明の目的のため、本明細書で引用されている全ての参考文献が、その全体の参照として組み込まれている。

【０１０７】

方法：

組織サンプル

患者の腫瘍組織および正常組織は、分析された腫瘍実体によって異なる数箇所の病院から提供された。手術前にすべての患者から書面でインフォームドコンセントを得た。組織は、術後直ちに液体窒素で衝撃冷凍し、TUMAP を単離するまで －80℃で保存した。

【０１０８】

組織サンプルからの HLA ペプチドの単離

衝撃冷凍した組織サンプルの HLA ペプチドプールは、わずかに修飾したプロトコールに従い、HLA－A、－B、－C 特異的抗体 W6/32、HLA-A*02 特異的抗体 BB7.2、CNBr－活性化セファロース、酸処理、および限外ろ過により、固体組織から免疫沈降によって得た。異なる HLA 対立遺伝子に対し、当分野で既知の他の特異的抗体が使用でき、例として A*03 用の GAP-A3、B 対立遺伝子用のB1.23.2 がある。

【０１０９】

質量分析

得られた HLA ペプチドプールをその疎水性に従い逆相クロマトグラフィー（nanoAcquity UPLC system、Waters）により分離し、溶出したペプチドは、ESI 源付き LTQ オービトラップ型ハイブリッド質量分析計（ThermoElectron）で分析した。ペプチドプールを 1.7 μm C18 逆相充填剤（Waters）が詰まった分析用溶融シリカミクロキャピラリーカラム（75μm 内径 x 250 mm）に、流速 400 nL／min で直接装填した。その後ペプチドを，流速 300iL/分で 10%から 33%まで，2 段階の 180 分バイナリ勾配をかけて分離した。勾配は、溶媒 A（0.1% 蟻酸水溶液）と溶媒B（0.1% 蟻酸アセトニトリル溶液）から成る。金被覆ガラスキャピラリー（PicoTip, New Objective）を nanoESI 源の導入に使った。LTQ オービトラップ型質量分析計は TOP5 法と TOP3 法を使ってデータ依存モードで操作した。手短に言えば、オービトラップで（TOP3 では R＝30,000、TOP5 では R＝60000）、高い質量確度の全スキャンからスキャンサイクルを開始し、続いて、以前に選択したイオン（TOP5）を動的排除した 5 つの最も多量に存在する前駆イオンについてはオービトラップで（R＝7500）、または以前に選択したイオン（TOP3）を動的排除した 3 つの最も多量に存在する前駆イオンについては LTQ で、MS/MS スキャンを実施した。

【０１１０】

データ解析

各サンプルについて、TOP5 モードで 2 回、TOP3 モードで 3 回の 5 回の無標識 LCMS 反復測定を得た。LCMS データは、LCMS 調査とタンデム MS（MS/MS）データを分析する自家パイプラインにより処理された。我々の漸増する反復取得の設定、および標準的プロテミクスソフトウェアによって満足に取り扱われないペプチドミクスデータについては、専

用のデータ解析で最適化され、採用されている。新しい各データセットは、Immatics Discovery データベース（MySQL）に統合される。全データは、入手可能なプロテオームデータ、ゲノムデータ、および文献データと相互参照される。

【０１１１】

配列の同定

タンデム MS スペクトルは msn_extract（ThermoScientific）を使って抽出し、IPI データベースに対して Sequest で検索した。タンパク質データベースのヒットはその後、HLA ペプチドミクスデータ用に最適化した閾値を使い、自動品質フィルタリングにより検証される。増大するペプチドワクチン候補はさらに手動点検によって確認される。

【０１１２】

同定したペプチド配列は、発生した天然ペプチドの断片化パターンを、合成配列の同一参照ペプチドの断片化パターンと比較して確認した。図 1 は、ペプチド CDC2-001 関連 MHC クラス I の腫瘍、および UPLC 系のその溶出プロフィールから得られた典型的なスペクトルを示す。

【０１１３】

同定感度の増大に対して、社内で開発したスペクトルクラスタリングアルゴリズムを使用して、スペクトルを、IFL（Immatics Fragment spectra Library）に収集されている既知ペプチド MS/MS に割り当てた。新たな LCMS 測定の MS/MS スキャンを、IFL のスキャン毎に徐々に増大させながら追加する。クラスタリングは、スペクトルデータに採用された、成長している k 平均法クラスタリングアルゴリズムを使用している。スキャン間の対類似性は MuQest（ThermoScientific）によって測定する。各クラスターはコンセンサススペクトルによって示される。これらのコンセンサススペクトルは、余分なスペクトルを除くことにより、下流解析をスピードアップするために使用できる。コンセンサススペクトルは実験 MS/MS スペクトルの平均化の結果であるので、前駆体の質量は、より正確であり、そのスペクトルのノイズはより少ない。

【０１１４】

TUMAP の相対的定量

LCMS 調査データは、高質量確度を使用するタンデム MS とは独立して解析された。LCMS シグナルとそのシグナル領域（イオン計数）を抽出するために、プログラム SuperHirn（ETH Zurich）が使用された。そのため、各同定ペプチドは定量的データと関連づけることができ、サンプルと組織間の相対的定量を可能にする。

【０１１５】

技術的および生物学的反復測定間のバラツキを説明するために、中心傾向による正規化に基づき 2 段階の正規化スキームが使用された。この正規化は、ほとんどの測定シグナルがハウスキーピングペプチドの結果であり、過剰提示されるペプチドの少量画分はデータの中心傾向に有意に影響しないことを前提としている。最初の正規化ステップにおいて、同一サンプルの反復測定は、各ペプチドの各々の反復測定セット中の各ペプチドの平均提示を計算することにより、正規化される。この平均値は、各ペプチドおよび LC-MS 測定に対する正規化係数を計算するのに使用される。全ペプチドを平均化すると、結果として、特定の LCMS 測定の全ペプチドに適用される、測定正規化係数が得られる。このアプローチでは、例として反復測定間で注入量が異なることによる、系統的な内部サンプルのバラツキが除かれることを保証する。

【０１１６】

反復測定領域間で 25% 未満の変動係数を有するペプチドのみが、次の正規化ステップで考慮される。ここでも、各ペプチドの平均提示が、この時点では定義した提示抗体（例 BB7.2）の全サンプルについて計算される。この平均値は、各ペプチドおよびサンプルに対する正規化係数を計算するのに使用される。全ペプチドを平均化すると、結果として、特定のサンプルの全ペプチドに適用される、サンプル正規化係数が得られる。その故、異なる組織重量または MHC 発現レベルによる系統的バイアスが除かれる。

【０１１７】

過剰提示されたペプチドを抽出するために、各ペプチドに対し提示プロフィールが計算され、サンプル提示の平均値と反復測定のバラツキを示す。プロフィールは、関心のある腫瘍実体サンプルを正常組織サンプルのベースラインと対比させるために並べて置く。これらの各プロフィールは、誤発見率（False Discovery Rate: FDR）による多変量検定を補正する線形混合効果モデル（GNU R）の p 値を計算することにより、過剰提示スコア内に整理統合された。それらの p 値により全ペプチドをランク付けすると、提示の観点から、最も期待できるワクチン候補が出てくる。

【０１１８】

β2m ミクログロプリンの定量

β-2m-ミクログロプリン（b2m）は、基準タンパク質として β アクチンを使用してウェスタンブロッティングによって定量し、ゲル上に負荷したタンパク質量に対して正規化した。

【０１１９】

結果

細胞株による TUMAP 定量法の開発

定量パイプラインを確立するために、異なる方法が適用された。第 1 にサンプルのバラツキをシミュレーションするために、2% と 20% に希釈したJY 細胞株を使って希釈実験を実施した各希釈サンプルについて、反復測定を3回行った。測定間およびサンプル間のバラツキを正規化後、2 つのサンプル間の正規化係数は 9.95 であった。

【０１２０】

第 2 の実験では別の JY サンプルを、トリプシン消化された MassPREP™（Waters）タンパク質混合物（ホスホリラーゼ b、BSA、ウシヘモグロビン、エノラーゼ、ADH）を 100、10 および 1 fmol に希釈して注入した。再び、各濃度を3回反復測定した。データ解析後、既知の注入ペプチド間の平均比は、1 対 100 fmol、100 対 10 fmol、および 10 対 1 fmol のサンプルを比較した場合、各々 90、8、11 であった。

さらに、異なる取得方法を比較し、ペプチド同定数と確度、さらに本実験の設定における定量精度を最大にした。この目的に対し、異なる MS/MS モードにおいて、JY サンプルを約 50 回反復測定した。

【０１２１】

原発性腫瘍および正常組織

相対的に定量された TUMAP の例を以下に示す。

【０１２２】

例 1：

神経膠芽細胞腫ワクチンカクテルの一部である、PTPRZ1（チロシンホスファターゼ、受容体タイプ、Z ポリペプチド 1）HLA クラス I ペプチドの提示プロフィール。赤は、異なる臓器の正常組織サンプルと比較した腫瘍サンプルを示している。各バーは、前記ペプチドに対し正規化したサンプル領域の中央値を表し、一方、エラーバーは、測定のバラツキのインジケータとして最小と最大の反復測定領域を示す。

【０１２３】

例 2：CDC2-001

CDK1 でコード化された胃癌関連 TUMAP の提示プロフィールについては、図 5 を参照。

【０１２４】

例 3：ASPM-002

ASPM でコード化された胃癌関連 TUMAP の提示プロフィールについては、図 6 を参照。

異なる組織実体中のMHC タンパク質の発現

本発明者らは、3 重 MHC α鎖／β-2-ミクログロブリン／ペプチド複合体（図 7 参照）の代表的化合物として、β-2-ミクログロブリンを使って MHC 発現レベルの範囲を知るために、異なる組織実体中の MHC 分子発現を解析した。

【０１２５】

MHC の相対的発現（b2m/βアクチン）は、中央値 b2m/ βアクチン＝0.52 付近でわずか 5 の係数で変動するので、異なる組織実体間では比較的一定である。この範囲は、質量分析データに基づく正規化に対し十分に狭くなっている。

ウェスタンブロッティング（WB）に比較した質量分析に基づく MHC 量の正規化

表 2：MHC の WB に基づく正規化と MS に基づく正規化の比較
【表２】

	TC001T	RCC2216N	RCC2216T	RCC2223N	RCC2223T
相対的WB正規化係数	0.07	2.03	2.58	1	0.17
相対的MS正規化係数	0.05	2.53	1.11	1	0.3
組織重量［g］	3.56	0.29	0.89	0.65	1.54
MS 正規化の ID	119	540	47	908	877

【０１２６】
要約すると、MS および WB に基づく正規化は非常に類似しており、これらの正規化方法間のバラツキはわずか係数 2 程度である。
MS 正規化係数は、計算においてより多くの同定数を使用すれば、正確度が向上する。そのため、MS に基づく正規化は、一次組織免疫沈降から得た MHC 分子量の変動を補正する信頼性のある方法である。
【０１２７】
品質保証
定量的性能を継続的にチェックするために、我々は保持時間とシグナル領域の精度管理用に 7 つの非ヒト由来合成ペプチドを確立し導入した。
【０１２８】
各サンプルは 5 回の反復測定により分析されるので、ペプチドの定量にはバラツキの推定が付随し、測定問題が検出される。付随して、品質管理の手動手順を確立し、ペプチドデータの一貫性と正確さを検証しながら確認した。
【０１２９】
ペプチドの免疫原性および発現プロフィールの測定例
【０１３０】
本発明のペプチドをコード化する遺伝子の発現プロフィール
MHC 分子による腫瘍細胞表面に提示されることが同定されたペプチドすべてが、免疫療法に適しているとはいえないが、その理由は、これらの多くのペプチドが多数の細胞タイプにより発現された正常の細胞タンパク質に由来しているからである。これらのペプチドのほんの僅かだけが、腫瘍に関連しており、由来する腫瘍を認識するのに高い特異性を有する T 細胞を誘発できる傾向を有している。このようなペプチドを同定し、ワクチン接種により誘発される自己免疫のリスクを最小限にするため、本発明者は多数の正常組織と比較して、腫瘍細胞で過剰発現されるタンパク質に由来するこれらのペプチドに焦点を当てた。
【０１３１】
理想的なペプチドは、腫瘍に特異的で他の組織には提示されないタンパク質に由来する。理想的なペプチドに近い発現プロフィールを有する遺伝子に由来するペプチドを同定するために、同定したペプチドを、それらが由来するタンパク質と遺伝子にそれぞれ割り当て、これらの発現プロフィールを生成した。
【０１３２】
RNA 源と予備調製
書面によるインフォームドコンセントを各患者から得たのちに、外科的に切除した組織標本が異なる 2 ヶ所の臨床施設（例 1 を参照）から提供された。腫瘍組織標本は、術後直ちに液体窒素でスナップ凍結し、その後、液体窒素下で乳鉢と乳棒を使い均質化した。総

RNAを TRI 試薬（Ambion、ドイツ、ダルムシュタット）、続いて RNeasy（QIAGEN、ドイツ、ヒルデン）によるクリーンアップによりこれらのサンプルから調製し、両方法とも製造者のプロトコールに従って実施した。

【０１３３】

健常ヒト組織の総 RNA は市販品から得た（Ambion、英国ハンティンドン；Clontech、ドイツ、ハイデルベルク；Stratagene、オランダ、アムステルダム；BioChain、米国カリフォルニア州ヘーワード）。数人（2 名から 123 名の間）の RNA を混合し、各個人の RNA を等重量にした。白血球は 4 名の健常ボランティアの血液サンプルから単離した。

【０１３４】

総 RNA サンプルの質と量は、RNA 6000 Pico LabChip Kit（Agilent）を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer（Agilent、ドイツ、ヴァルトブロン）で測定した。

【０１３５】

マイクロアレイ実験

すべての腫瘍と正常組織の RNA サンプルの遺伝子発現解析は、Affymetrix Human Genome（HG）U133A または HG-U133 Plus 2.0 オリゴヌクレオチドマイクロアレイ（Affymetrix、米国カリフォルニア州サンタクララ）を使って実施した。すべてのステップは Affymetrix マニュアルに従って実施された。簡単にいうと、二本鎖 cDNA を総 RNA 5～8μg から SuperScript RTII（Invitrogen）とオリゴ-dT-T7 プライマー（MWG Biotech、ドイツ、エーバースベルク）を使って取扱説明書の説明通りに合成した。In vitro 転写は、U133A アレイには BioArray 高収率 RNA 転写ラベルキット（ENZO Diagnostics, Inc.、米国ニューヨーク州ファーミンデール）で、U133 Plus 2.0 アレイには GeneChip IVT ラベルキット（Affymetrix）で実施した後、cRNA フラグメンテーション、ハイブリダイゼーション、およびストレプトアビジン－フィコエリトリンとビオチン化抗ストレプトアビジン抗体（Molecular Probes、オランダ、ライデン）による染色を行った。画像は Agilent 2500A 遺伝子アレイスキャナー（U133A）または Affymetrix 遺伝子チップスキャナー 3000（U133 Plus 2.0）でスキャンし、データは全パラメータの初期設定値を用いて GCOS ソフトウェア（Affymetrix）で解析した。正規化は、Affymetrix により提供された 100 個のハウスキーピング遺伝子を使った。相対的発現値は、ソフトウェアで得たシングルログ比から計算し、正常腎サンプルは適宜 1.0 に設定した。

【０１３６】

胃癌で高く過剰発現する本発明の遺伝子源の発現プロフィールを図 2 に示す。

【０１３７】

例 3：

IMA941 MHC クラス I 提示ペプチドの in vitro 免疫原性

本発明の TUMAP の免疫原性について情報を得るため、すでに（Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhring, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J.Immunol., 171, 4974-4978）により報告され、十分確立された in vitro 刺激プラットフォームを用いて検討を行った。我々が 32 HLA-A*2402 の免疫原性を示すことができた前記方法は、本発明の TUMAP を限定し、これらのペプチドが T 細胞エピトープであり、このエピトープに対して CD8+ 前駆体 T 細胞がヒトに存在することを立証した（表 3）。

【０１３８】

CD8+ T 細胞の in vitro プライミング

ペプチド-MHC 複合体（pMHC）および抗 CD28 抗体を載せた人工抗原提示細胞（aAPC）による in vitro 刺激を実行するために、発明者はまず、血液バンク Tuebingen から得た健常ドナーの新鮮 HLA-A*24 白血球分離生成物から CD8 T 細胞を単離した。

【０１３９】

CD8 T 細胞は、白血球分離生成物から直接栄養強化されたか、または標準的な密度勾配分離用溶媒を使って PBMC（末梢血単核細胞）が最初に単離された（PAA、ドイツ、ケルベ）

。単離された PBMC を、10％熱不活性化ヒト AB 血清（PAN-Biotech、ドイツ、アイデンバッハ）が補充された RPMI－グルタマックス（Invitrogen、ドイツ、カルルスルーエ）、100U/ml ペニシリン／100μg/ml ストレプトマイシン（Cambrex、ドイツ、コローニュ）、1mM ピルビン酸ナトリウム（CC Pro、ドイツ、オーベルドルラ）、および 20μgml／ゲンタマイシン（Cambrex）で構成される、ヒト in vitro プライミング用 T 細胞培地（TCM）で一晩インキュベートした。2.5 ng/ml IL-7（PromoCell、ドイツ、ハイデルベルグ）および10 U/ml IL-2（Novartis Pharma、ドイツ、ニュルンベルグ）もこの培養ステップの TCM に添加された。CD8+ リンパ球の単離は、CD8 MicroBeads（Miltenyi Biotec、ドイツ、ベルギッシュグラートバハ）を使って陽性選択により実施した。

【０１４０】

pMHC／抗 CD28 被覆ビーズの作成、T 細胞刺激および読み出しなどは、わずかな変更を行い、すでに報告の通り（Walter et al. 4974-78）に実施した。簡単に説明すると、膜貫通ドメインを欠損し、重鎖のカルボキシ末端でビオチン化された、ビオチン化ペプチド負荷組み換え HLA-A*2402 分子が生成された。精製した共刺激マウス IgG2a 抗ヒト CD28 Ab 9.3（Jung, Ledbetter, and Muller-Eberhard 4611-15）は、製造業者が推奨するように、スルホ－N－ヒドロキシコハク酸イミドビオチンで化学的にビオチン化した（Perbio、ドイツ、ボン）。使用したビーズは、5.6 μm の大きなストレプトビジン被覆ポリスチレン粒子（Bangs Laboratories、米国イリノイ州）であった。コントロールとして使用した pMHC は、各々 A*0201/MLA-00（修飾 Melan-A/MART-1 由来ペプチド ELAGIGILTV（SEQ ID No. 26））および A*0201/DDX5-001（DDX5 由来 YLLPAIVHI（SEQ ID No. 27））であった。

【０１４１】

800.000 ビーズ／200μl を、ビオチン抗 CD28 600 ng＋関連ビオチン-pMHC 200 ng 共存下で、96 ウェルプレートにおいて被覆した（高密度ビーズ）。5 ng/ml IL-12（PromoCell）で補給された 200μl TCM 中で $2x10^5$ 洗浄済み被覆ビーズと共に $1x10^6$ CD8+ T 細胞を、37°Cで3～4日間共インキュベートして、96 ウェルプレート中、刺激を開始した。続いて、培地の半分を 80U/ml IL-2 が補充された新しい TCM と交換し、インキュベーションは 37°C で 3～4 日間続けた。この刺激サイクルを合計 3 回実施した。最終的に Live/dead-Aqua 色素（Invitrogen、ドイツ、カルルスルーエ）、CD8-FITC 抗体クローン SK1（BD、ドイツ、ハイデルベルク）、および PE または APC カップリング A*2402 MHC 多量体で細胞を染色して多量体解析を実施した。解析は、適切なレーザーとフィルターを装備した BD LSRII SORP サイトメータを使用した。ペプチド特異的細胞を総 CD8+ T 細胞のパーセンテージとして計算した。多量体解析の評価は、FlowJo ソフトウェアによって行った（Tree Star、米国オレゴン州）。特定の多量体＋CD8+ リンパ球の in vitro プライミングは、適切なゲート開閉と陰性コントロール刺激との比較によって、検出した。一例の健常ドナーについて in vitro で刺激された評価可能な少なくとも 1 つのウェルに、in vitro 刺激後、特異的な CD8+ T 細胞株が含まれることが発見された場合（すなわち、このウェルが CD8+ T 細胞中に少なくとも 1％の特異的多量体＋を含んでおり、特異的多量体＋細胞のパーセンテージが陰性コントロール刺激の中央値の少なくとも 10 倍であった場合）、特定抗原の免疫原性が検出された。

【０１４２】

ペプチドの in vitro 免疫原性

検討した HLA クラス I ペプチド 25 個について、in vitro 免疫原性をペプチド特異的 T 細胞株を生成させることにより証明できた。本発明の 2 つのペプチドに対する、TUMAP 特異的多量体染色後の典型的なフローサイトメトリーの結果を、対応する負のコントロールと共に図 3 に示す。本発明 25 個のペプチドの結果を表 3 に要約する。

【０１４３】

表3：本発明の HLA クラス I ペプチドの in vitro 免疫原性

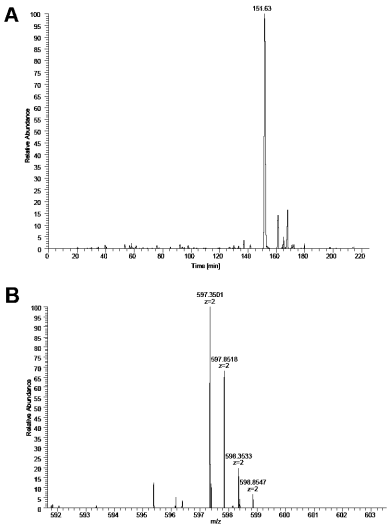
本発明者により実施された in vitro 免疫原性の結果が、評価可能な陽性試験ドナーとウェルのパーセンテージを示している。少なくとも 2 つのドナーと 24 個のウェルが各ペ

プチドについて評価可能であった。

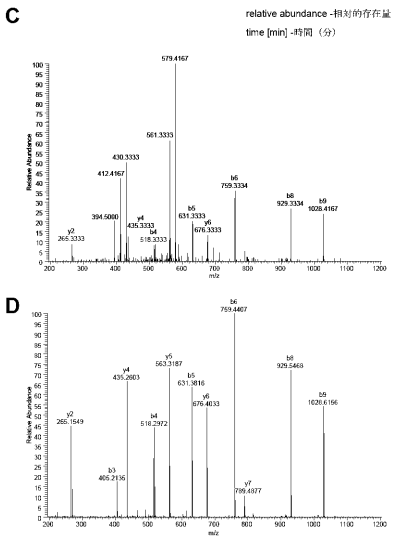
【表３】

SEQ ID NO	抗原	配列	陽性ドナー数／試験ドナー数[%]	陽性ウェル数／試験ウェル数[%]
1	CDC2-001	LYQILQGIVF	88	28
2	ASPM-002	SYNPLWLRI	63	31
3	MMP3-001	VFIFKGNQF	13	1
4	MET-006	SYIDVLPEF	63	22
5	UCHL5-001	NYLPFIMEL	75	14
6	MST1R-001	NYLLYVSNF	50	14
7	KIF2C-001	IYNGKLFDLL	13	2
8	SMC4-001	HYKPTPLYF	75	9
9	PROM1-001	VWSDVTPLTF	83	26
10	MMP11-001	NYLLYVSNF	33	11
11	NFYB-001	VYTTSYQQI	50	7
12	ASPM-001	RYLWATVTI	17	3
13	PLK4-001	QYASRFVQL	60	5
14	ABL1-001	TYGNLLDYL	50	13
15	ATAD2-001	AYAIIKEEL	50	4
16	AVL9-001	FYISPVNKL	100	50
17	HSP90B1-001	KYNDTFWKEF	50	4
18	MUC6-001	NYEETFPHI	50	21
19	NUF2-001	VYGIRLEHF	100	25
20	NUF2-002	RFLSGIINF	50	4
21	PPAP2C-001	AYLVYTDRL	100	54
22	SIAH2-001	VFDTAIAHLF	50	4
23	UQCRB-001	YYNAAGFNKL	100	38
24	IQGAP3-001	VYKVVGNLL	100	24
25	ERBB3-001	VYIEKNDKL	83	15

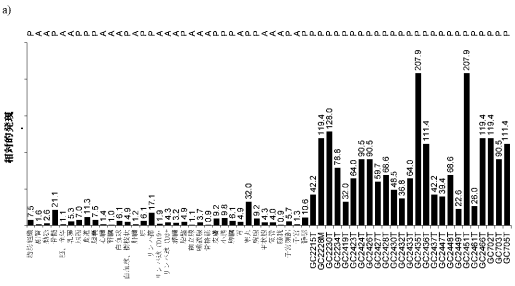
【図１－１】



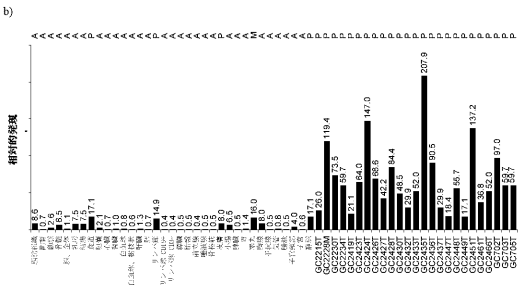
【図１－２】



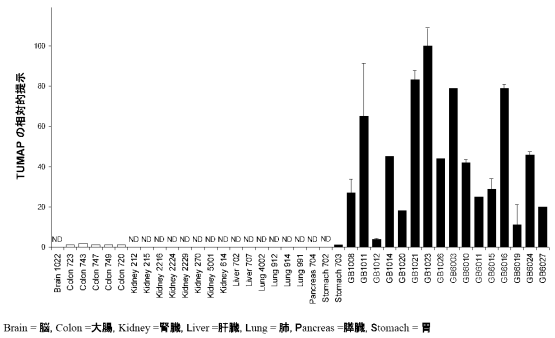
【図２－１】



【図２－２】

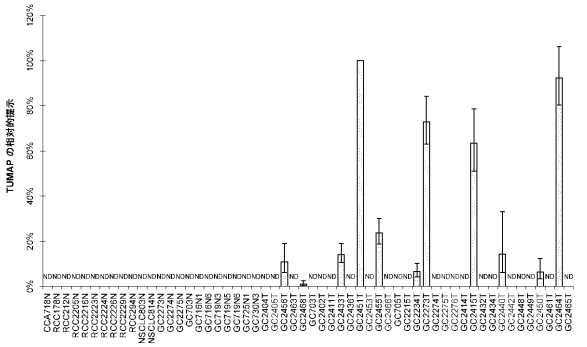


【図４】

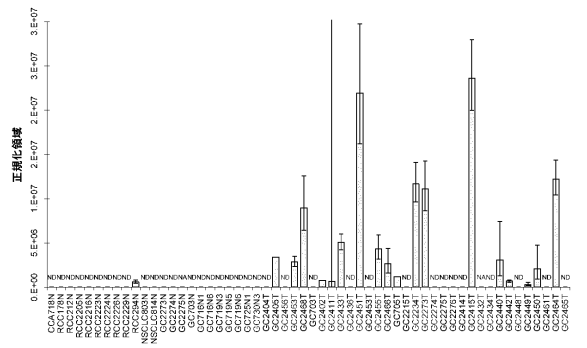


Brain = 脳, Colon =大腸, Kidney =腎臓, Liver =肝臓, Lung = 肺, Pancreas =膵臓, Stomach = 胃

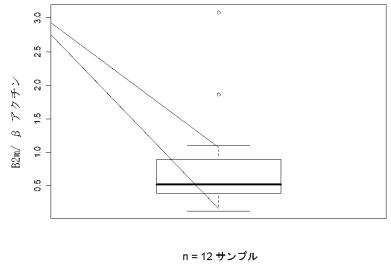
【図５】



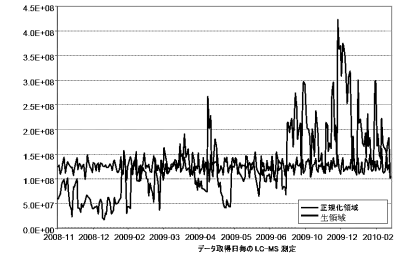
【図６】

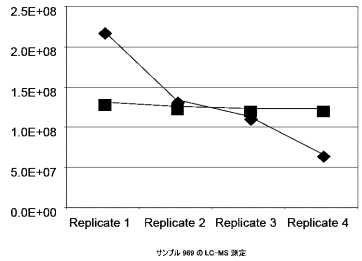


【図７】

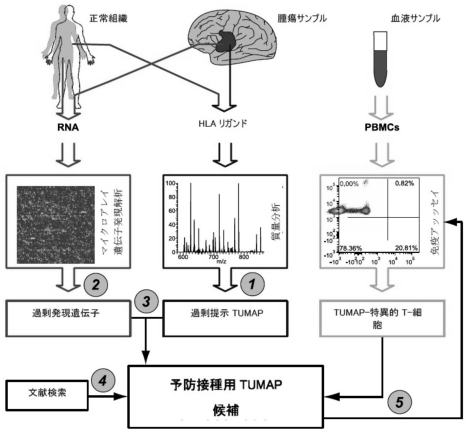


【図８】

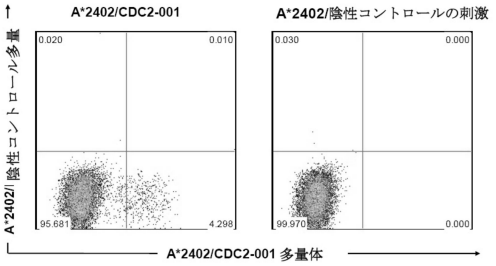


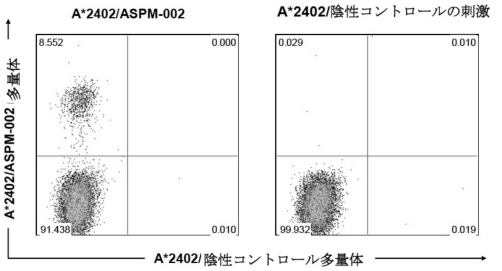


【図９】

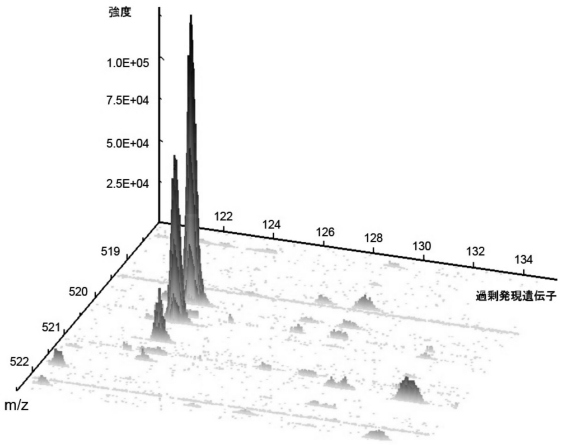


【図３】





【図１０】



【配列表】
0006010019000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ヴァインシェンク，トニ
ドイツ，７３７７３ アイヒヴァルト，イム モルゲンレイン １５
(72)発明者 フリッチェ，イェンス
ドイツ，７２０７６ テュービンゲン，イム ションブリック ４８

審査官 大竹 秀紀

(56)参考文献 特表２００９－５０６７６２（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５４０３１９（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５１９９１０（ＪＰ，Ａ）
M.-H. FORTIER, THE MHC CLASS I PEPTIDE REPERTOIRE IS MOLDED BY THE TRANSCRIPTOME, JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ２００８年 1月 1日, V205 N3, P595-610
LEMMEL C, DIFFERENTIAL QUANTITATIVE ANALYSIS OF MHC LIGANDS BY MASS SPECTROMETRY USING STABLE ISOTOPE LABELING, NATURE BIOTECHNOLOGY, 米国, NATURE PUBLISHING GROUP, ２００４年 4月 1日, V22 N4, P450-454
STEPHEN J. HATTAN, METHODOLOGY UTILIZING MS SIGNAL INTENSITY AND LC RETENTION TIME FOR QUANTITATIVE 以下備考, ANALYTICAL CHEMISTRY, ２００６年１２月 1日, V78 N23, P7986-7996, ANALYSIS AND PRECURSOR ION SELECTION IN PROTEOMIC LC-MALDI ANALYSES
LUKAS N. MUELLER, AN ASSESSMENT OF SOFTWARE SOLUTIONS FOR THE ANALYSIS OF MASS SPECTROMETRY BASED以下備考, JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, ２００８年 1月 1日, V7 N1, P51-61, QUANTITATIVE PROTEOMICS DATA
FELIX KLUNG, CHARACTERIZATION OF MHC LIGANDS FOR PEPTIDE BASED TUMOR VACCINATION, CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, ２００９年１０月 1日, V15 N28, P3221-3236
MCCORMACK,A.L. 他, “Microcolumn Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Analysis of Immunological Samples”, ACS Symposium Series, １９９６年 5月 5日, Volume 619, Chapter 10, Pages 207-225, [Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry]
WEINSCHENK,T. 他, “QUANTITATIVE HLA-PEPTIDOMICS BY XPRESIDENTTM: Differential quantitation of naturally processed HLA-restricted peptides for cancer immunotherapy development”, CANCER RESEARCH [online], ２０１０年 4月１５日, Volume 70, Issue 8_Supplement, Abstract Number 4773, [Proceedings: AACR 101st Annual Meeting 2010], ＵＲＬ, doi: 10.1158/1538-7445.AM10-4773

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ２７／６２－２７／７０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）