

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第6735741号
(P6735741)

(45) 発行日 令和2年8月5日(2020. 8. 5)

(24) 登録日 令和2年7月16日(2020. 7. 16)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68

請求項の数 12 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2017-521534 (P2017-521534)	(73) 特許権者 506258073 イマティクス バイオテクノロジーズ ゲー ーエムペーハー ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, パ ウルーエンリヒエシュトラッセ 1 5
(86) (22) 出願日 平成27年12月15日 (2015. 12. 15)	(74) 代理人 100088904 弁理士 庄司 隆
(65) 公表番号 特表2018-500004 (P2018-500004A)	(74) 代理人 100124453 弁理士 資延 由利子
(43) 公表日 平成30年1月11日 (2018. 1. 11)	(74) 代理人 100135208 弁理士 大杉 卓也
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/079873	(72) 発明者 ヴァインシェンク, トーニ ドイツ, 7 3 7 7 3 アイヒヴァルト, イ ム モルゲンライン 1 5
(87) 国際公開番号 W02016/107740	
(87) 国際公開日 平成28年7月7日 (2016. 7. 7)	
審査請求日 平成30年1月22日 (2018. 1. 22)	
(31) 優先権主張番号 1423361.3	
(32) 優先日 平成26年12月30日 (2014. 12. 30)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)	
(31) 優先権主張番号 62/097,994	
(32) 優先日 平成26年12月30日 (2014. 12. 30)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自然にプロセスされたHLA拘束性がんペプチドを絶対的定量化する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞上で少なくとも1つのMHCペプチドリガンドの絶対的定量化をする方法であって、

a) 前記少なくとも1つのMHCペプチドリガンドを提示する細胞を、組織サンプル、血液サンプル、腫瘍サンプル、または感染組織のサンプルから選択される生物学的サンプルから調製するステップであって、前記調製するステップは組織の酵素消化、および/または細胞溶解を含むものと、

b) ステップa)の前記調製品の細胞数を判定するステップであって、前記細胞数を判定するステップは細胞核計数、光度分析DNA定量、蛍光分析DNA定量、または定量PCRから選択される方法を含むものと、

c) 前記少なくとも1つのペプチドMHCリガンドおよび/または定量化されるペプチドMHCリガンド複合体の既知量を細胞溶解直後細胞溶解物から上清を採取する操作を行わずにステップa)の前記調製品に添加するステップと(「添加I」)、

d) ペプチド溶出液を得るために、少なくとも1つのMHCペプチドリガンドをステップc)の前記調製品から単離するステップと、

e) 定量化される少なくとも1つのMHCペプチドリガンドの既知量を前記ペプチド溶出液に添加するステップと(「添加II」)、

f) a) ステップd)の単離効率のシグナル、

b) ステップe)で添加された前記少なくとも1つのMHCペプチドリガンドの既知量のシグナル、

c c) ステップ a) の前記調製された細胞からの前記少なくとも 1 つの M H C ペプチドリガンドのシグナルの少なくとも 1 つを生じさせるために、前記少なくとも 1 つの M H C ペプチドリガンドに対して質量分析を実施するステップと、

g) ステップ f) で得られたシグナルと

a a) 得られた細胞数、

b b) ステップ c) で添加された前記少なくとも 1 つのペプチド M H C リガンドおよび / または定量化されるペプチド M H C リガンド複合体の既知量、および

c c) ステップ e) で添加された定量化される少なくとも 1 つの M H C ペプチドリガンドの既知量

との比較に基づいて、前記少なくとも 1 つの M H C ペプチドリガンドを定量化するステップとを含んでなり、それによって細胞上の少なくとも 1 つの M H C ペプチドリガンドの絶対的定量が得られる、方法。

10

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの M H C ペプチドリガンドが、腫瘍関連ペプチド (T A A) または疾患関連ペプチド (D A A) から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ a) の前記調製品中の少なくとも 1 つのタイプの H L A 分子の量を判定するステップをさらに含んでなる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

添加される少なくとも 1 つのペプチド M H C 複合体、および / または添加される少なくとも 1 つの M H C ペプチドリガンドが、同位体によって標識される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

添加される少なくとも 1 つのペプチド M H C 複合体、および / または添加される少なくとも 1 つの M H C ペプチドリガンドが、同位体によって示差的に標識される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

単離するステップが、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

分析のために、過剰提示され、過剰発現されおよび / または腫瘍特異的である、M H C ペプチドリガンドを選択するステップをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

ハイスループットベースで実施される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

示されるステップからなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記生物学的サンプルが、一個人、または同一疾患を患っている個人群に由来する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

定量化された前記 M H C ペプチドリガンドに基づいて、個別化 M H C リガンドプロファイルを作成するステップをさらに含んでなる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

個別化 M H C リガンドプロファイルが個別化疾患特異的 M H C リガンドプロファイルである、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本発明は、自然にプロセスされた H L A 拘束性がんペプチドを絶対的定量化する、すな

50

わち、提示される細胞あたりペプチドコピー数を判定する方法に関する。本発明は、抗体療法またはペプチドワクチンを開発するために使用され得るだけでなく、分子的に定義される免疫モニタリングにとって非常に有益であり、がん、感染性および/または自己免疫疾患における、それぞれのワクチン、抗体ベースの治療法または養子T細胞移入アプローチなどの免疫療法戦略のための新規ペプチド抗原を同定する過程にとっても有用である。

【技術分野】

【0002】

免疫系のT細胞アームががんと戦うように誘導することを目指す、がん免疫療法剤および自己免疫および伝染性疾患の免疫療法の開発は、一次病的組織上のヒト白血球抗原（HLA）結合ペプチド提示レベルに関する深い知識によって、実質的に改善されるかもしれない。この情報は、特に、抗体ベースの治療法またはペプチドワクチンに、ならびにタンパク質、DNAまたはRNAなどの分子実体ベースのその他のあらゆるタイプのT細胞ワクチンに、関連性がある。この種の定量的データは、患者由来組織では、細胞あたりコピーの絶対的尺度で得られていない。

【0003】

「逆免疫」関連問題を回避する、上記のようなペプチドを同定する方法が、欧州特許第1508047B1号明細書で開示された。上述されたように、この方法は、前記ペプチドを定量化するためには使用され得ない。標識戦略を用いるもう一つの方法が国際公開第2005/076009号パンフレットで開示され、それはいくらかの定量化をできるようにしたが、絶対的尺度ではなかった。その他の標識は、例えば、国際公開第03/025576号パンフレット、またはMartin et alによってProteomics 2003, 3, 2208-2220で開示された。

【0004】

もう一つの方法は、Fortier et al (The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome, JEM, Vol. 205, No. 3, March 17, 2008 595-610)によって開示された。この方法は、酸溶出のために、非MHC結合ペプチドからのMHC結合ペプチドの解離を要するという不都合を有する。これは、b2mノックアウト細胞株を使用して実施され：したがって、この方法は、一次患者瘍材料では使用され得ない。方法では、一次マウス胸腺細胞が、マウスEL4細胞株と比較された。出発量は、MHC I分子を測定することで調節されている。これだけでも、Fortier et al.によって開示される方法の強力な制限である。さらに、異なるサイズおよび組織起源の一次組織に必要な正規化は、適用されなかった。むしろ、均衡のとれた出発原料が使用されて、正規化は廃止された。しかし、正規化は、一次（患者）材料にとって絶対的に必要である。

【0005】

国際公開第2011/128448号パンフレットは、標識アプローチなしで、大規模に、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を開示する。方法は、前記MHCペプチドリガンドを標識なしで相対的に定量化するために、少なくとも1つの病的一次組織サンプルと、好ましくは患部組織に対応する少なくとも1つの一次健常組織サンプルとを供給するステップと、MHCペプチドリガンドを前記サンプルから単離するステップと、前記MHCリガンドペプチドに対してPLC-MS分析を実施するステップと、分析から誘導された各シグナルについて前駆イオンシグナル強度（面積）を抽出するステップと、前記MHCリガンドペプチドの配列を同定するステップと、正規化するステップと、データ品質管理ステップとを含んでなる。

【0006】

Hassan et al. (in: Hassan C, et al, Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled pept

10

20

30

40

50

ide MHC complexes, J Prot (2014)、<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.009>)は、その中で同位体標識ペプチドMHC単量体(hpMHC)が調製されて、細胞溶解直後に、すなわち、通常のサンプル処理の前に、添加されるアプローチを開示する。このアプローチを使用することで、サンプル処理中の全ての損失が考慮され得て、特異的MHCクラスI提示リガンドの正確な判定ができるようになる。研究は、サンプル前処理中のかなり極度な損失の原因として、免疫精製ステップを特定し、これらの損失を補償する解決策を提供する。提示される戦略は、エピトープコピー数の信頼できる見解を得るために使用され得て、したがってワクチンデザインおよび免疫療法戦略の改善ができるようにするとされる。

10

【0007】

免疫応答の刺激は、宿主免疫系によって外来性として認識される抗原の存在に依存する。腫瘍関連および疾患抗原の存在の発見は、宿主の免疫系を利用して腫瘍成長に介入する可能性を高めた。免疫系の体液性および細胞性アームの双方を活用する様々な機構が、がん免疫療法のために目下探求されている。

【0008】

細胞性免疫応答の特異的要素は、腫瘍細胞を特異的に認識して破壊できる。腫瘍浸潤性細胞集団からの、または末梢血からの細胞傷害性T細胞(CTL)の単離は、がんに対する自然免疫防御において、このような細胞が重要な役割を果たすことを示唆する。特に、ペプチドを認識するCD8陽性T細胞(T-CD8⁺)は、主要組織適合性複合体(MHC)のクラスI分子と結合する。通常は8~12アミノ酸残基のこれらのペプチドは、細胞質ゾルにあるタンパク質または欠陥リボソーム産物(DRIPS)に由来して、この反応で重要な役割を果たす。ヒトMHC分子はまた、ヒト白血球抗原(HLA)とも称される。

20

【0009】

MHC分子には、2つのクラスがある：核を有するほとんどの細胞に見られる、MHCクラスI分子。MHC分子は、それぞれ、重鎖と、 β -2-ミクログロブリン(MHCクラスI受容体)または α および β 鎖(MHCクラスII受容体)とから、構成される。それらの三次元立体構造は結合溝をもたらし、それはペプチドとの非共有結合相互作用のために使用される。MHCクラスIは、大部分が内在性タンパク質である、DRIPおよびより大型のペプチドのタンパク質分解的切断から得られる、ペプチドを提示する。MHCクラスII分子は、大部分はプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)上に見られ、エンドサイトーシス過程でAPCに取り込まれて引き続きプロセッシングされる、外来性または膜貫通タンパク質のペプチドを主に提示する。ペプチドとMHCクラスI分子の複合体が、適切なTCR(T細胞受容体)を有するCD8陽性細胞傷害性Tリンパ球によって認識される一方で、ペプチドとMHCクラスII分子の複合体は、適切なTCRを有するCD4陽性ヘルパーT細胞によって認識される。その結果、TCR、ペプチド、およびMHCは、1:1:1の化学量論的量で存在することが良く知られている。

30

【0010】

ペプチドが細胞性免疫応答を引き起こす(誘発する)ためには、それはMHC分子と結合しなくてはならない。この過程は、MHC分子の対立遺伝子と、ペプチドのアミノ酸配列の特定の多形性とに依存する。MHCクラスI結合ペプチドは、通常は8~12アミノ酸残基長であり、通常は、MHC分子の対応する結合溝と相互作用するそれらの配列中に、2つの保存残基(「アンカー」)を含有する。このようにして、それぞれMHC対立遺伝子は、結合溝に特異的に結合するペプチドの能力を制御する、結合モチーフを有する。

40

【0011】

MHCクラスI依存免疫反応では、ペプチドは、腫瘍細胞によって発現される特定のMHCクラスI分子に結合できるのみならず、それらはまた、特異的T細胞受容体(TCR)を有するT細胞によって認識されなくてはならない。

【0012】

50

腫瘍特異的細胞傷害性Ｔリンパ球によって認識される抗原、すなわちそれらのエピトープは、酵素、受容体、転写因子などの全てのタンパク質クラスに由来する分子であり得て、それらはそれぞれの腫瘍細胞で発現されて、同一起源の非改変細胞と比較して上方制御される。

【 0 0 1 3 】

腫瘍関連または疾患関連抗原の現行の分類は、以下の主要群を含んでなる：

がん精巣抗原：Ｔ細胞によって認識され得るこれまでに同定された最初のＴＡＡ〔腫瘍関連抗原；疾患関連抗原はＤＡＡと略記される〕は、このクラスに属し、元々はがん精巣（ＣＴ）抗原と称されたが、それは、そのメンバーが組織学的に異なるヒト腫瘍で発現し、正常組織では、精巣の精母細胞／精原細胞のみに存在し、時として胎盤に存在するためであった。精巣の細胞は、クラスⅠおよびⅡ ＨＬＡ分子を発現しないので、これらの抗原は正常組織のＴ細胞によって認識され得ず、したがって免疫学的に腫瘍特異的と見なされ得る。ＣＴ抗原の周知の例は、ＭＡＧＥファミリーメンバーまたはＮＹ－ＥＳＯ－１である。

分化抗原：これらのＴＡＡは、腫瘍と、それから腫瘍が生じる正常組織との間で共有され；ほとんどは、メラノーマおよび正常なメラノサイトに見られる。これらのメラノサイト系関連タンパク質の多くは、メラニン生合成に関与し、したがって腫瘍特異的でないが、それでもなおがん免疫療法のために広く利用されている。例としては、黒色腫に対するチロシナーゼおよびＭｅｌａｎ－Ａ／ＭＡＲＴ－１、または前立腺がんに対するＰＳＡが挙げられるが、これに限定されるものではない。

過剰発現ＴＡＡ：広範に発現されるＴＡＡをエンコードする遺伝子は、組織学的に異なるタイプの腫瘍で、ならびに多数の正常組織で、概してより低い発現レベルで検出されている。正常組織によってプロセシングされ潜在的に提示されるエピトープの多くは、Ｔ細胞認識閾値レベルに満たない可能性がある一方で、腫瘍細胞におけるそれらの過剰発現は、先に確立された免疫寛容を破壊することで抗がん応答を引き起こし得る。このクラスのＴＡＡの顕著な例は、Ｈｅｒ－２／ｎｅｕ、サバイピン、テロメラーゼまたはＷＴ１である。

腫瘍特異的抗原：これらのユニークなＴＡＡは、正常遺伝子（－カテニン、ＣＤＫ４など）の変異から生じる。これらの分子変化のいくつかは、腫瘍性形質転換および／または進行に関連する。腫瘍特異的抗原は、通常、正常組織に対する自己免疫反応のリスクなしに、強力な免疫応答を誘導できる。他方、これらのＴＡＡは、ほとんどの場合、その上でそれらが同定されるまさにその腫瘍のみと関係があり、通常は、多くの個々の腫瘍間で共有されない。

異常な翻訳後修飾から生じるＴＡＡ：このようなＴＡＡは、特異的でなく腫瘍で過剰発現もされないタンパク質から生じてよいが、それでもなお、腫瘍で主に活性である翻訳後プロセスによって、腫瘍関連になる。このクラスの例は、腫瘍でＭＵＣ１のような新規エピトープをもたらず改変グリコシル化パターンから、または腫瘍特異的であってもなくてもよい分解中のタンパク質スプライシング事象から生じる。

オンコウイルスタンパク質：これらのＴＡＡは、ウイルスタンパク質であり、それらは発がん過程で重要な役割を果たしてもよく、外来性である（ヒト由来でない）ため、それらはＴ細胞応答を誘起し得る。このようなタンパク質の例は、ヒト乳頭腫１６型ウイルスタンパク質Ｅ６およびＥ７であり、これらは子宮頸がんで発現される。

【 0 0 1 4 】

タンパク質が、細胞毒性Ｔリンパ球によって、腫瘍特異的または腫瘍関連抗原として、または疾患特異的または疾患関連抗原として認識されるためには、そして治療法で利用されるためには、特定の必要条件が満たされなくてはならない。抗原は、主に腫瘍細胞または感染細胞によって発現されるべきであり、健常組織によっては、全く発現されず、または例えば５倍、１０倍、またはそれ以上低いなど、比較的少量のみ発現される。

【 0 0 1 5 】

感染性疾患では、２つの可能性があり、第１に感染細胞は、健常細胞によって発現され

10

20

30

40

50

ない、感染症と直接関連する抗原を発現し、あるいは感染細胞は健常細胞によって非常に少量のみ発現される抗原を過剰発現して、抗原の過剰発現は、通常は健常細胞のペプチドーム中に見られる。

【0016】

それぞれの抗原は、ある種の腫瘍、感染症または株に存在するだけでなく、高い密度（すなわち、細胞あたりの各ペプチドのコピー数）で存在することもさらに望ましい。腫瘍特異的および腫瘍関連抗原および疾患特異的または疾患関連抗原は、例えば、細胞周期制御またはアポトーシス抑制における機能のために、正常細胞から腫瘍/感染細胞への形質転換に直接関与するタンパク質に由来することが多い。

【0017】

がんの場合、形質転換の直接原因となるタンパク質の追加的な下流標的が上方制御されてもよく、したがって間接的に腫瘍関連であってもよい。このような間接的腫瘍関連抗原もまた、ワクチン接種アプローチの標的であってもよい（Singh - Jasuja H., Emmerich N.P., Rammensee H.G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453(3): 187-95）。どちらの場合も、腫瘍関連または疾患関連抗原に由来するこのようなペプチド（「免疫原性ペプチド」）は、生体外または生体内T細胞応答をもたらすべきであるので、抗原のアミノ酸配列中にエピトープが存在することが必須である。

【0018】

基本的に、MHC分子に結合できるあらゆるペプチドが、T細胞エピトープとして機能してもよい。生体外または生体内T細胞応答誘導のための必要条件是、対応するTCRがあるT細胞の存在、およびこの特定のエピトープに対する免疫寛容の不在である。

【0019】

したがって、TAAおよびDAAは、腫瘍ワクチン開発のための出発点である。TAAおよびDAAを同定し特性決定する方法は、患者または健常者から単離され得るCTLの使用に基づき、またはそれらは、腫瘍および正常組織間の差次的転写プロファイル、または差次的ペプチド発現パターンの生成に基づく。

【0020】

しかし、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞系で過剰発現され、またはこのような組織または細胞系で選択的に発現される遺伝子の同定は、免疫療法においてこれらの遺伝子から転写される抗原の使用に関する、正確な情報を提供しない。これは、これらの抗原のエピトープの個々の亜集団のみが、このような用途に適するためであり、その理由は、対応するTCRがあるT細胞が存在しなくてはならず、またこの特定のエピトープに対する免疫寛容が不在または最小でなくてはならないからである。したがってそれに対して機能性T細胞が見られる、MHC分子に関連して提示される、過剰発現または選択的発現されるタンパク質からのペプチドのみを選択することが重要である。このような機能性T細胞は、特異的抗原による刺激時に、クローン増殖し得てエフェクター機能を果たすことができるT細胞（「エフェクターT細胞」）と定義される。

【0021】

Tヘルパー細胞は、抗腫瘍免疫において、CTLのエフェクター機能を統合する上で重要な役割を果たす。T_{H1}型のTヘルパー細胞応答を始動するTヘルパー細胞エピトープは、CD8陽性キラーT細胞のエフェクター機能を支持し、それは、それらの細胞表面に腫瘍関連ペプチド/MHC複合体を提示する腫瘍細胞に向けられた、細胞傷害機能を含む。このようにして腫瘍関連Tヘルパー細胞ペプチドエピトープは、単独で、またはその他の腫瘍関連ペプチドとの組み合わせで、抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の活性医薬品成分の役割を果たし得る。

【0022】

HLAクラスIまたはIIが提示するリガンドの正確なコピー数の知識は、基礎および臨床免疫学において重要である。現在、最良のコピー数判定は、同位体標識ペプチドの既知量と組み合わせ、単一回反応モニタリング（SRM）を用いる、質量分析法に基づく

10

20

30

40

50

。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

それでもなお、これらのアプローチは、上記アプローチで効率的に用いるためには、未だに十分精密でない。

【課題を解決するための手段】

【0024】

したがって上記を鑑みて、精密かつ効率的で取り扱いが簡単な、そしてまた「ハイスループット」レベルで実施され得る、HLAクラスⅠまたはⅡ提示リガンドのコピー数を絶対的に判定する方法を提供することが、本発明の目的である。本発明の目的および利点は、提供される以下の説明を検討すれば、当業者には容易に分かるであろう。

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明の第1の態様では、本発明の目的は、

a) 少なくとも1つのMHCペプチドリガンドを提示する細胞を含んでなる生物学的サンプルから調製するステップと、

b) ステップa)の前記調製品の細胞数を判定するステップと、

c) 前記少なくとも1つのペプチドMHCリガンドおよび/または定量化されるペプチドMHCリガンド複合体の既知量をステップa)の前記調製品に添加するステップと(「添加Ⅰ」)、

d) ペプチド溶出液を得るために、少なくとも1つのMHCペプチドリガンドをステップc)の前記調製品から単離するステップと、

e) 定量化される少なくとも1つのMHCペプチドリガンドの既知量を前記ペプチド溶出液に添加するステップと(「添加Ⅱ」)、

f) a)ステップd)の単離効率のシグナル、

b) ステップe)で添加された前記少なくとも1つのMHCペプチドリガンドの既知量のシグナル、

c) ステップa)の前記調製された細胞からの前記少なくとも1つのMHCペプチドリガンドのシグナル

の少なくとも1つを生じさせるために、前記少なくとも1つのMHCペプチドリガンドに対して質量分析を実施するステップと、

g) ステップf)で得られたシグナルと

a) 得られた細胞数、

b) ステップc)で添加された前記少なくとも1つのペプチドMHCリガンドおよび/または定量化されるペプチドMHCリガンド複合体の既知量、および

c) ステップe)で添加された定量化される少なくとも1つのMHCペプチドリガンドの既知量

との比較に基づいて、前記少なくとも1つのMHCペプチドリガンドを定量化するステップと

を含んでなる、細胞上で少なくとも1つのMHCペプチドリガンドの絶対的定量をする方法によって解決され、それによって細胞上の少なくとも1つのMHCペプチドリガンドの絶対的定量化が、少なくとも部分的に達成される。

【0026】

いくつかのサンプルが並行して分析される本発明による方法では、ひとたび単離効率が確立されれば、1サンプルの効率を使用して、第2のMHCペプチドリガンドおよび/またはMHCペプチドリガンド複合体の単離効率が推定され得る(すなわち相互参照値として使用され得る)ので、上記のようなステップc)が省かれ得る。

【0027】

好ましいのは、これらの2つのシグナル間の比率を計算することで、単離された少なく

10

20

30

40

50

とも1つのMHCペプチドリガンドから得られるシグナルのための一定の保存された(対照)標準として、e)の内部較正(添加II)から得られるシグナルをさらに利用する方法である。この比率は、好ましくはこのような内検量体部の同一アリコートを使用することで、全く同じ量で内部検量体もまた含む、確立された検量線と比較される。次に、検量線は、これらの比率とペプチド量の間の関係を描写する。図3およびその説明文もまた参照されたい。

【0028】

驚くことに、本発明の文脈では本発明者らは、初めて、上記分析ステップを組み合わせることで、いくつかの異なる非がん性組織または非感染組織および臓器と比較して、がんまたはその他の感染組織上で、MHC、好ましくはHLA拘束性ペプチドレベルの直接的な絶対的定量化が可能になることを発見した。

10

【0029】

本発明の文脈では、「添加」は、例えば、調製品などのサンプル(ここで「添加I」と称される)、またはペプチド溶出液など(ここで「添加II」と称される)への、例えば、少なくとも1つの定量化される既知の非結合(「遊離」)MHCペプチドリガンドの既知量または濃度の添加を指す。添加されるペプチドの量/濃度は、容易に調節され得て、それが添加されるサンプル、そして分析のために使用される方法に、少なくともある程度左右される。

【0030】

好ましいのは、少なくとも1つのMHCペプチドリガンドが、腫瘍関連ペプチド(TAA)または疾患関連ペプチド(DAA)から選択される、本発明による方法である。

20

【0031】

さらに好ましいのは、前記生物学的サンプルが、組織サンプル、血液サンプル、腫瘍サンプル、または感染組織サンプルから選択される細胞を含んでなる、本発明による方法である。本発明の文脈では、患者などの対象に直接由来するサンプルは、例えば、確立した腫瘍細胞株などの細胞株サンプルとは対照的に、一次組織または腫瘍サンプルなどのように、「一次」サンプルと称される。サンプルは、本発明による方法に適しさえすれば、新鮮または保存(例えば、冷凍または調製)サンプルであり得る。好ましいのは、恒久的な細胞株を含まない生物学的サンプルである。

【0032】

30

好ましい例として、衝撃凍結(一次)組織サンプルからのHLAペプチド貯留が、例えば、CNBr-活性化セファロースと結合しているHLA-A、-B、-C-特異的抗体w6/32またはHLA-A*02-特異的抗体BB7.2を使用した免疫沈殿と、それに続く酸処理、および限外濾過によって、固形組織から得られ得る。異なるHLA対立遺伝子では、例えば、A*03対立遺伝子に対するGAP-A3、B対立遺伝子に対するB1.23.2があるので、当該技術分野で公知の別の特異的抗体が使用され得る。その他の哺乳類では、当該技術分野で周知である、MHCクラスIペプチドを得るための対応する方法がある。

【0033】

本発明による方法はまた、標的部分がMHCクラスI結合ペプチドでありさえすれば、例えば、デング熱、エボラ、マールブルグウイルス、結核(TB)、髄膜炎または梅毒などのウイルスまたは細菌などの感染性疾患の文脈で使用され得て、好ましくは、方法は、感染性生物の抗生物質耐性株、関節炎などの自己免疫疾患、マラリアなどの寄生虫感染症、およびMSおよびパーキンソン病などのその他の疾患に対して使用される。

40

【0034】

自己免疫疾患の例(自己免疫疾患として正式に宣言されていない疾患を含む)は、慢性閉塞性肺疾患、強直性脊椎炎、クローン病(特発性炎症性腸疾患「IBD」の2つの型の1つ)、皮膚筋炎、I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、化膿性汗腺炎、川崎病、IgA腎障害、特発性血小板減少性紫斑病、間質性膀胱炎、紅斑性狼瘡、混合性結合組織疾患、限局性強皮症、

50

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、関節リウマチ、統合失調症、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフパーソン症候群、側頭動脈炎（巨細胞動脈炎）、潰瘍性大腸炎（特発性炎症性腸疾患「IBD」の2つの型の1つ）、血管炎、白斑、およびウェゲネル肉芽腫である。

【0035】

本発明は、ヒト疾患に限定されず、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットやマウスなどの齧歯類、ヤギ、およびその他の飼育動物などの哺乳類で使用され得る。

【0036】

本発明による方法のさらに別の好ましい実施形態では、細胞を調製するステップは、少なくともある程度、組織の酵素消化および/または細胞溶解を含んでなる。

10

【0037】

好ましいのは、前記細胞数が、細胞核計数、光度分析DNA判定、蛍光分析DNA判定（例えば、Qubit（登録商標）技術などを使用する）、および定量PCRから選択される方法を使用して判定される、本発明による方法である。

【0038】

さらに好ましいのは、ステップa)の前記調製品中の少なくとも1つのタイプのHLA分子の量を判定するステップをさらに含んでなる、本発明による方法である。量を判定するステップは、例えば、ELISA、ゲル、細胞選別、および/またはクロマトグラフィーにおいて、特異的抗体が関与する方法などの当該技術分野で一般的な方法を使用して実施され得る。

20

【0039】

さらに好ましいのは、添加される少なくとも1つのペプチドMHC複合体および/または添加される少なくとも1つのMHCペプチドリガンドが標識され、好ましくは示差的に標識される、本発明による方法である。それぞれの標識は当業者に知られており、同位体標識、放射性および非放射性標識、酵素、および好ましくは異なる質量のその他のグループが含まれる好ましくは、標識は、定量化される特異的ペプチドに対して特異的である。最も好ましいのは、例えば、同一実験中で、2つの示差的に標識された添加が必要な状況における、二重標識TAA/TUMAPである（下の実施例を参照されたい）。

【0040】

30

好ましいのは、単離するステップが、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを含んでなる、本発明による方法である。したがって、単離されたMHC/HLAリガンドは、逆相クロマトグラフィー（例えば、nanoAcquity UPLCシステム、Waters）によって、それらの疎水性に応じて分離され得て、Orbitrapハイブリッド質量分光計（ThermoElectron）による検出がそれに続く。各サンプルは、好ましくは、反復（例えば）LCMS試験を取得することで、分析される。次に、LCMSデータは、タンデムMS（MS/MS）データを分析することで処理される。

【0041】

定量化されるペプチドのm/z値に焦点を合わせた、標的化方法で記録されたタンデムMSスペクトルは、好ましくは、事前定義遷移の予備選択フラグメントイオンの強度を抽出するソフトウェアによって評価される。このようなソフトウェアの一例は、並行反応モニタリング（PRM標的化MS/MS）のために、データ非依存的取得（DIA）実験の質量分光計データを分析するアプリである、Skyline（MacLean Bet al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. Bioinformatics. 2010 Apr 1; 26(7): 966-8.、<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>）である。このソフトウェアは、特異性の目的のために、ならびにさらなる処理のために単一遷移強度を抽出するた

40

50

めに、共溶出同位体標識ペプチドに対して使用され得る。

【0042】

異なるサンプル間で同一HLA対立遺伝子に限定されるペプチド群の相互比較性は、利用可能であれば、精製のために使用される共通対立遺伝子特異的抗体に基づいて可能であり、あるいは代案としては、アンカーアミノ酸パターンの手段による、共通HLA対立遺伝子の配列割り当てに基づいて可能である。

【0043】

統計学理由から、好ましいのは、それぞれ少なくとも1つのMHCリガンドペプチドについて、少なくとも2回の反復質量分析試験が実施される、本発明による方法である。

【0044】

したがって、本発明のさらに別の態様は、分析のために、過剰提示され、過剰発現されおよび/または腫瘍特異的なMHCペプチドリガンドを選択するステップをさらに含んでなる、本発明による方法に関する。

【0045】

本発明のさらに別の態様は、前記方法が、ハイスループットベースで実施でき、または実施され、好ましくは、最高50～100個のペプチドリガンドが並行して分析され得る、発明による方法に関する。

【0046】

本発明による方法のなおも別の好ましい実施形態では、前記方法のステップは、添付の特許請求の範囲に示されるような、または上記のような順序で実施される。本発明によるなおも別の好ましい方法では、前記方法は、上記および本明細書に示されるようなステップからなる。

【0047】

本発明による方法のさらに好ましい態様では、前記方法は、個別化治療法および診断に関する。このためには、分析される前記サンプルは、本明細書に記載されるように、一個人に由来し、または同一疾患を患っている個人群に由来する。また、本明細書に記載されるように定量化される前記MHCペプチドリガンドに基づく、個別化MHCリガンドプロファイル、好ましくは、個別化定量化疾患特異的MHCリガンドプロファイルが、本発明による方法に基づいて作成され得る。

【0048】

最も好ましくは、本発明による方法は、生体外で実施される。

【0049】

本発明による方法のさらに好ましい態様では、前記方法は、合成機上でまたは手動で、前記方法によって定量化されるような、前記少なくとも1つのMHCペプチドリガンドを合成し、好ましくは化学的に合成するステップをさらに含んでなる。したがって本発明のもう一つの態様は、免疫反応性ペプチドを調製する方法に関し、それを用いて、開示される方法に従ってペプチドが定量化され、前記ペプチドは、生体外でまたは生体内で化学的に合成される。ペプチドは、当該技術分野で公知の標準法によって、アミノ酸の化学結合によって、調製され得る。

【0050】

ペプチドは、例えば、無細胞システム中などの生体外で、そして細胞を使用して生体内で調製され得る。ペプチドは、例えば、Lewandrowskiらに付与された、欧州特許第2111867号明細書で開示されるようにして調合され得る。

【0051】

さらに別の態様は、その中でさらなるステップが実施され、その中でTリンパ球の存在が検出される、本発明による方法に関する。この方法を使用して、単離され同定されたペプチドに対するTリンパ球が、患者においてどの程度既存であ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ことで、患者においてそれに対するTリンパ球が既に既存である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。次にペプチドは、これらの特異的Tリンパ球を活性化するのに使用され得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

さらなる態様は、特定の既存のＴリンパ球の検出が、抗原提示分子と抗原ペプチドの再構成複合体で白血球を標識することで実施される、本発明による方法に関する。

【 0 0 5 3 】

本発明による方法のさらに別の好ましい実施形態では、前記方法は、ロックアウト細胞、細胞株または動物の使用をさらに排除する。

【 0 0 5 4 】

本発明のさらに好ましい任意選択のステップは、規定量でサンプルに添加される分子に基づく、自動品質管理である。

【 0 0 5 5 】

本発明による方法を用いて、患者特異的ペプチドを同定することがさらに可能であり、すなわち、特異的免疫応答を誘導するために、ワクチンとして使用されるペプチドを患者に正確に一致させることが可能である。

【 0 0 5 6 】

次に、本発明のもう一つの態様は、本発明による方法によって定量化された、規定量の１つまたは複数のＴＡＡおよび／またはＤＡＡペプチドを含んでなる、医薬組成物に関する。

【 0 0 5 7 】

組成物は、製剤および標的疾患次第で、例えば、皮下、皮内または筋肉内などで非経口的に適用されてもよく、または経口的に投与されてもよい。その際に、ペプチドは、好ましくは水性担体である、薬学的に許容できる担体に溶解され、またはそれに懸濁され；組成物は、例えば緩衝液、バインダーなどの添加剤をさらに含んでなり得る。ペプチドはまた、例えば、サイトカインなどの免疫賦活性物質と共に投与され得る。

【 0 0 5 8 】

本発明の一態様に従って、腫瘍性疾患を治療するために、および腫瘍疾患を治療する薬物を調製するために、ペプチドが使用されてもよい。治療される腫瘍性疾患は、腎臓、乳房、脾臓、胃、精巣などの固形腫瘍、および／または皮膚がんまたはＡＭＬなどの血液がんを含んでなる、腫瘍疾患のこの一覧は単なる例示であり、応用分野を制限することは意図されない。

【 0 0 5 9 】

ペプチドは、さらに腫瘍疾患の治療経過を評価するために使用され得る。

【 0 0 6 0 】

ペプチドはまた、その他の免疫化または治療法において治療法をモニタリングするために使用され得る。したがって、ペプチドは、治療だけでなく、診断的に使用されてもよい。

【 0 0 6 1 】

次に、本発明のさらなる態様は、抗体を生成するための定量化されたペプチドの使用に関する。ポリクローナル抗体は、ペプチドの注射の手段による動物の免疫化と、引き続く免疫グロブリン精製によって、一般的な様式で得られ得る。モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の標準化プロトコルによって作成され得る。

【 0 0 6 2 】

本発明は、抗体ベースのアプローチに特に関連性があるが、それは、標的細胞の細胞表面の標的のコピー数が、標的が抗体にとって少しなりとも取り組み可能であるか、そうであれば、コンジュゲートされた薬物、毒素、二重特異性抗体動員Ｔ細胞またはその他のエフェクター細胞などのいずれのエフェクター機能が使用され得るかを決定し、および／または反映するためである。その他の側面は、アプタマー（標的結合オリゴ核酸またはペプチド分子）および／または可溶性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）などのいわゆる足場形成分子の文脈における使用に関する。ここでもまた、抗体と同様に、コピー数が、必要な結合活性およびエフェクター機能を決定する。前記足場分子のために。

【 0 0 6 3 】

免疫応答の刺激は、宿主免疫系によって外来性として認識される抗原の存在に依存する。腫瘍関連抗原の存在の発見は、今や、宿主の免疫系を用いて、腫瘍成長に介入する可能性を高めた。免疫系の体液性および細胞性アームの双方を活用する様々な機構が、がん免疫療法のために目下探求されている。

【0064】

細胞性免疫応答の特異的要素は、腫瘍細胞を特異的に認識して破壊できる。腫瘍浸潤性細胞集団からの、または末梢血からの細胞傷害性T細胞（CTL）の単離は、がんに対する自然免疫防御において、このような細胞が重要な役割を果たすことを示唆する。特に、主要組織適合性複合体（MHC）を保有して、細胞質ゾル内に位置するタンパク質または欠陥リボソーム産物（DRIPS）に由来する、通常は8～12残基のペプチドのクラスI分子を認識するCD8陽性T細胞が、この応答において重要な役割を果たす。ヒトのMHC分子はまた、ヒト白血球抗原（HLA）とも称される。

【0065】

MHCクラスI分子は、核を有するほとんどの細胞上にあり、それは、主に内在性の細胞質または核タンパク質、DRIPS、およびより大型のペプチドのタンパク質分解的切断から得られる、ペプチドを提示する。しかし、エンドソームコンパートメントまたは外来性起源に由来するペプチドもまた、MHCクラスI分子上に頻繁に見られる。この非古典的様式のクラスI提示は、文献中で交差提示と称される。

【0066】

タンパク質が、細胞傷害性Tリンパ球によって腫瘍特異的または腫瘍関連抗原として認識され、治療で利用されるためには、特定の必要条件が満たされなくてはならない。抗原は、主に腫瘍細胞によって発現されて、健常組織によっては発現されず、または比較的少量発現されるべきである。それぞれの抗原は、ある種の腫瘍に存在するだけでなく、高い密度（すなわち、細胞あたりの各ペプチドのコピー数）で存在することも、さらに望ましい。腫瘍特異的および腫瘍関連抗原は、例えば、細胞周期制御またはアポトーシスにおける機能のために、正常細胞から腫瘍細胞への形質転換に直接関与するタンパク質に、由来することが多い。さらに、形質転換の直接原因となるタンパク質の下流標的もまた、上方制御されてもよく、したがって間接的に腫瘍関連である。このような間接的腫瘍関連抗原もまた、ワクチン接種アプローチの標的であってもよい。腫瘍関連または疾患関連抗原に由来するペプチド（「免疫原性ペプチド」）は、生体外または生体内T細胞応答をもたらすべきであるので、どちらの場合でも必須であるのは、抗原のアミノ酸配列内のエピトープの存在である。

【0067】

基本的に、MHC分子に結合できるあらゆるペプチドが、T細胞エピトープとして機能してもよい。生体外または生体内T細胞応答誘導のための必要条件是、対応するTCRがあるT細胞の存在、およびこの特定のエピトープに対する免疫寛容の不在である。したがって、TAAは、腫瘍ワクチン開発のための出発点である。TAAを同定し特性決定する方法は、患者または健常者から単離され得るCTLの使用に基づき、またはそれらは、腫瘍および正常組織間の差次的転写プロファイル、または差次的ペプチド発現パターンの作成に基づく（Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27）。しかし、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞系で過剰発現され、またはこのような組織または細胞系で選択的に発現される遺伝子の同定は、免疫療法においてこれらの遺伝子から転写される抗原の使用に関する、正確な情報を提供しない。これは、これらの抗原のエピトープの個々の亜集団のみが、このような用途に適するためであり、その理由は、対応するTCRがあるT細胞が存在しなくてはならず、またこの特定のエピトープに対する免疫寛容が不在または最小でなくてはならないからである。したがってそれに対して機能性T細胞が見られる、MHC分子に関連して提示される、過剰発現または選択的発現されるタンパク質からのペプチドのみを選択することが重要である。このような機能性T細胞は、特異的抗原による刺激時に、クローン増殖し得てエフェクター機能を果たすことができるT細胞（「エフェクターT細胞」）と定義される。

【 0 0 6 8 】

がん治療に関連する重篤な副作用および費用を考慮すると、より良い予後診断法および診断法がぜひとも必要である。

【 0 0 6 9 】

「ペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の α -アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。ペプチドは、好ましくは9アミノ酸長であるが、8アミノ酸長程度に短く、10、11、12、13または14アミノ酸程度に長くあり得る。

【 0 0 7 0 】

「オリゴペプチドペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の α -アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。オリゴペプチドの長さは、その中で正しいエピトープまたはエピトープ群が保持されれば、本発明には重要でない。オリゴペプチドは、典型的に、約30アミノ酸残基長未満であり、約14アミノ酸長を超える。

10

【 0 0 7 1 】

「ポリペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の α -アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を指す。正しいエピトープが保持されれば、ポリペプチドの長さは、本発明には重要でない。ペプチドまたはオリゴペプチドという用語とは対照的に、ポリペプチドという用語は、約30を超えるアミノ酸残基を含有する分子を指すことが意図される。

20

【 0 0 7 2 】

このような分子をコードする、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、免疫応答を誘導できれば「免疫原性」である（したがって本発明内における「免疫原」である）。本発明の場合、免疫原性は、より具体的にはT細胞応答を誘導する能力と定義される。したがって「免疫原」は、免疫応答を誘導できる分子であり、本発明の場合は、T細胞応答を誘導できる分子である。

【 0 0 7 3 】

T細胞「エピトープ」は、クラスI MHC受容体に結合する短いペプチドを必要として、三成分複合体（MHCクラスI鎖、 β -2-ミクログロブリン、およびペプチド）を形成し、それは、適切な親和性でMHC/ペプチド複合体に結合する適合T細胞受容体を保有するT細胞によって、認識され得る。MHCクラスI分子に結合するペプチドは、典型的に8~14アミノ酸長であり、最も典型的には9アミノ酸長である。

30

【 0 0 7 4 】

本明細書において、本発明は、一例として、がんを使用して説明される。それでもなお、発明の方法は、それぞれの免疫応答が、MHCクラスIが関与する応答でありさえすれば、感染性疾患、自己免疫疾患、および寄生虫感染症でもまた用いられ得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 5 】

ここで以下の実施例において、本発明をさらに説明するが、それでもなお制限は意図されない。添付の図面および配列表において、

40

【図1】本発明による実験的アプローチの一般的な概略図を示す。

【図2】表1のTUMAPあたり10fmolのTUMAP混合物の比較MS分析を示す。各ペプチドは、異なるMSシグナルをもたらして、ペプチド依存性の検出可能性を示す。ペプチド5は表1に収載されておらず、すなわち、表1の配列1~4は図2の番号1~4に対応し、表1の配列5~11は図2の番号6~12に対応する。さらに、図2のペプチド19、21、および22は表2に収載されておらず、すなわち、図2の配列13~18は表2の番号12~17に対応し、図2の配列20は表2の番号18に対応し、図2の配列23~28は表2の19~24に対応する。

【図3】内部標準法の原理を示す。検量線は、TUMAPの同位体標識バージョン（淡灰色で示される）の力価測定によって作成される。全てのMS測定で、TUMAP内標準ペ

50

プチドの別の同位体標識バージョンの一定量（暗灰色で示される）が、MSサンプルに添加される。検量線関数は、ロジスティック回帰によって、MSシグナル比から計算される。LLQは、目視検査によって、直線性からの偏差を考慮して定義される。「定量化サンプル」（緑色で示される）は、TUMAP数の絶対的定量化のために選択された腫瘍サンプル中で測定された、シグナル強度を表す。

【図4】絶対的定量化のために選択されたHLA-A*02 TUMAPの検量線を示す。細胞あたりの絶対的なTUMAP数の分析のために使用された、腫瘍組織サンプル（「定量化サンプル」）中のそれぞれのTUMAPのMSの結果が、各チャートに含まれる。

【図5】絶対的定量化のために選択されたHLA-A*02 TUMAPの追加的な検量線を示す。細胞あたりの絶対的なTUMAP数の分析のために使用された、腫瘍組織サンプル（「定量化サンプル」）中のそれぞれのTUMAPのMSの結果が、各チャートに含まれる。

10

【図6】絶対的定量化のために選択されたHLA-A*24 TUMAPの検量線を示す。細胞あたりの絶対的なTUMAP数の分析のために使用された、腫瘍組織サンプル（「定量化サンプル」）中のそれぞれのTUMAPのMSの結果が、各チャートに含まれる。

【図7】絶対的定量化のために選択されたHLA-A*24 TUMAPの追加的な検量線を示す。細胞あたりの絶対的なTUMAP数の分析のために使用された、腫瘍組織サンプル（「定量化サンプル」）中のそれぞれのTUMAPのMSの結果が、各チャートに含まれる。

【図8】分析された全てのTUMAPにわたる、MS反復測定値の推定された変動を示す。各ドットは、1つの特異的組織サンプル中の個々のTUMAPのMS反復試験について、変動係数（CV%）を表す。全てのTUMAPにわたるCVの中央値は、MS反復試験の平均変動と見なされる。

20

【図9】ペプチドMHC単離の効率を示す。ペプチドMHC単離の効率は、A*02 TUMAP（A）では8個のA*02陽性サンプル、A*24 TUMAP（B）では6個のA*24陽性サンプルで評価された。単離効率は、平均してそれぞれ、A*02 TUMAPでは24%、A*24 TUMAPでは32%変動する（C）。

【図10】DNA含有量分析を評価する方法を示す。A．腫瘍細胞株（暗灰色）から、健常ドナー由来PBMC（灰色）から作成された標準曲線を使用した、およびヒト二倍体ゲノムの理論的重量（淡灰色）を使用した、所与のDNA量からの細胞数の内挿のための3つの異なる方法の比較。生物学的反復試験、すなわち、同一腫瘍の異なる小片からの独立した組織溶解産物調製品は、灰色で強調表示される。B．絶対的なTUMAP定量化において分析された組織サンプルの総細胞数を判定するために使用された、PBMC標準曲線のプロット。

30

【図11】固体冷凍組織サンプルからの細胞数の判定を示す。A*02陽性およびA*24陽性腫瘍サンプルの細胞数分析（A）、および細胞数分析の推定された変動（B）。生物学的反復試験は、灰色で強調表示される。

【図12】HLA-A*02 TUMAPについて、細胞あたりペプチドコピーの結果を示す。8個の異なるGC腫瘍が分析され、それらの内3個は二重反復試験された（生物学的二重反復試験はグループ分けされ、灰色で強調表示される）。LLQは、1回のMS実験における定量範囲を指し、サンプルおよびTUMAP特異的LLQ、すなわち、特定のサンプル中で数量化できる特異的TUMAP（灰色で示される）の最低コピー数に外挿される。

40

【図13】HLA-A*02 TUMAPについて、細胞あたりペプチドコピーの追加的な結果を示す。8個の異なるGC腫瘍が分析され、それらの内3個は二重反復試験された（生物学的二重反復試験はグループ分けされ、灰色で強調表示される）。LLQは、1回のMS実験における定量範囲を指し、サンプルおよびTUMAP特異的LLQ、すなわち、特定のサンプル中で数量化できる特異的TUMAP（灰色で示される）の最低コピー数に外挿される。

【図14】HLA-A*24 TUMAPについて、細胞あたりペプチドコピーの結果を

50

示す。6個の異なるGC腫瘍が分析され、それらの内3個は二重反復試験された（生物学的二重反復試験はグループ分けされ、灰色で強調表示される）。LLOQは、1回のMS実験における定量範囲を指し、サンプルおよびTUMAP特異的LLOQ、すなわち、特定のサンプル中で数量化できる特異的TUMAP（灰色で示される）の最低コピー数に外挿される。

【図15】HLA-A*24 TUMAPについて、細胞あたりペプチドコピーの追加的結果を示す。6個の異なるGC腫瘍が分析され、それらの内3つは二重反復試験された（生物学的二重反復試験はグループ分けされ、灰色で強調表示される）。LLOQは、1回のMS実験における定量範囲を指し、サンプルおよびTUMAP特異的LLOQ、すなわち、特定サンプル中で数量化できる特異的TUMAP（灰色で示される）の最低コピー数に外挿される。

10

【図16】MHC/ペプチドモノマー調製品中の500 fmolの遊離ペプチドを使用した、サンプルへの添加の影響の試験を示す。分析中の遊離ペプチドは、示されるようなペプチドに対する実質的影響を有しない。

【図17】標準曲線と対比した、Qubit HS（蛍光）を使用した、DNA単離再現性試験の結果を示す。サンプル（NSCLCなどのがんサンプル）は、十分な均質性を示す。DNAは、3×50 μlのアリコートから単離された。配列番号1～24は、実施例に従って絶対的定量化のために選択された、表1および2のペプチドを示す。

【実施例】

【0076】

20

以下の実施例は、本発明の方法をTAA/がんの文脈で説明する。実施例は、単に本発明の好ましい一実施形態であるので、本発明はそれらに限定されない。本発明の目的で、本明細書で引用される全ての参考文献は、その内容全体を参照によって援用する。

【0077】

【表 1】

表 1：絶対的定量化について選択されたHLA-A*02:01 TUMAP
11個のペプチドが絶対的定量化について選択された。

番号	ペプチドコード	配列
1	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
2	FAP-003	YVYQNNIYL
3	COL12A1-002	FLVDGSWSV
4	MXRA5-001	TLSSIKVEV
5	NCAPG-001	YLLSYIQSI
6	COL6A3-002	FLLDGSANV
7	WNT5A-001	AMSSKFFLV
8	F2R-001	TLDPRSFLI
9	HIF1A-001	ALDGFVMVL
10	MET-001	YVDPVITSI
11	CCNB1-002	ILIDWLQVQ

10

20

【 0 0 7 8 】

【表 2】

表 2：絶対的定量化について選択されたHLA-A*24 TUMAP

14個のペプチドが絶対的定量化について選択された。1つのペプチド（PLK4-001）の性質は、さらなる実験に適さないことが判明した。残りの13個のペプチドについては、絶対的定量化実験が完了した。

番号	ペプチドコード	配列
12	ASPM-002	SYNPLWLRI
13	SLC6A6-001	VYPNWAIGL
14	MMP3-001	VFIFKGNQF
15	CDC2-001	LYQILQGIVF
16	PLK4-001	QYASRFVQL
17	ASPM-001	RYLWATVTI
18	ATAD2-002	KYLTVKDYL
19	KIF2C-001	IYNGKLFDDL
20	MET-006	SYIDVLPEF
21	AVL9-001	FYISPVNKL
22	PPAP2C-001	AYLVYTDRL
23	UCHL5-001	NYLPFIMEL
24	UQCRB-001	YYNAAGFNKL

【0079】

固形腫瘍サンプル中の細胞あたりTUMAPコピーの定量化は、

- a) 単離されたTUMAP、
- b) 単離中のTUMAPの損失、および
- c) 分析組織サンプルの細胞数の（下位）定量化を必要とする。

本発明による実験的アプローチの概要は、図1に示される。

【0080】

ナノLC-MS/MSによるペプチド定量化

質量分析法によるペプチドの正確な定量化のためには、ペプチド量とMSシグナルのペプチド特異的相関に関する基礎知識が、最初に習得される必要がある。一例として、ペプチドあたり10 fmolのペプチド混合物のMS測定は、MSシグナルに大きなペプチド特異的差異があることを明らかにする（図2）。これはまた、その中でペプチドがMSによって信頼性をもって定量化されてもよい範囲が、個々のペプチド特性に左右されることを暗示する。

【0081】

さらに、特異的ペプチドの量とMSシグナルの間の線形相関は、特定の範囲内のみで予測され得る。したがって本発明者らは、各ペプチドについて個々の検量線を判定すること

にした。各検量線の範囲は、個々のペプチド定量化範囲だけでなく、以前分析された腫瘍サンプル中で、各ペプチドのMSシグナル範囲もまた反映するように選択された。目的は、各検量線が、本発明者らの通例のサンプルの少なくとも80%のペプチド特異的MSシグナル範囲を含むことであった。

【0082】

正確な検量線の作成は、合成標準物質を必要とし、それは、独立した方法で定量化されなくてはならず、天然TUMAPと同一特性を有する。本発明者らは、TUMAPの二重同位体標識バージョンを使用し、すなわちTUMAP合成中に、2つの同位体標識アミノ酸が包含された。二重標識バージョンは、標識アミノ酸次第で、12~18ダルトンの質量差によって天然TUMAPと区別され得る。質量を除いて、同位体標識は、MS中のペプチドの性質を改変せず、すなわち、同一配列があるペプチドがもたらされるが、異なる同位体標識は、同一MSシグナル強度をもたらす(Anderson et al., 2012)。合成後、二重標識TUMAPは、窒素分析によって正確に定量化され、ペプチド量とMSシグナルの正確な相関ができるようにする。

【0083】

検量線は、少なくとも3つの異なるマトリックス中で、すなわち、通例のMSサンプルと類似した天然サンプルからのHLAペプチド溶出液中で作成され、各調製品は、MS実験において二連で測定された。MS実験間のあらゆる技術的変動を代償するために、全ての測定に内標準ペプチドが包含された。力価測定されたペプチド対固定内標準のMSシグナル比がプロットされ、検量線はロジスティック回帰によって計算された(図3)。定量下限(LLoQ)は、直線性からの偏差を考慮して、目視で評価された。ペプチドFAP-003(図4)などのように直線性からの偏差が明らかでない場合は、最低ペプチド量の平均比を使用してLLoQが計算された。定量上限、すなわち、より高い濃度における直線性からの偏差は、いかなる検量線にも達しなかった。

【0084】

実際の定量化実験では、検量線を作成するために、同一量の内標準が各サンプルに添加されて、天然対内標準ペプチドの比率が計算された。この「内標準法」は、例えば、生物学的サンプル中の生物マーカーを分析するためのMSベースのタンパク質定量化の一般的方法である(Sturm et al., 2012; Prasad and Unadkat, 2014; Sato et al., 2012)。実際の腫瘍サンプル中で測定された検量線および値は、絶対的定量化のために選択された全てのTUMAPについて、HLA-A*02が図4および図5に、HLA-A*24が図6および図7に示される。

【0085】

定量的MS測定値の変動を推定するために、各MSサンプルのペプチド含有量の変動係数(CV%)が計算された。MSサンプルあたりのCVがプロットされて、MS測定値の全体的変動が中央値CVとして推定された(図8)。

【0086】

ペプチド/MHC単離の効率

あらゆるタンパク質精製処理では、組織サンプルからのタンパク質の単離が、関心のあるタンパク質の特定の損失と関連している。TUMAP単離の効率を判定するために、絶対的定量化のために選択された全てのTUMAPに対して、ペプチドMHC複合体が作成された。添加ペプチドを天然ペプチドMHC複合体から識別できるようにするために、TUMAPの単一同位体標識バージョンが使用され、すなわち、1つの同位体標識アミノ酸がTUMAP合成中に導入された。これらの複合体は、新鮮に調製された組織溶解産物に、すなわち、TUMAP単離手順の可能な限り早い時点で、添加され、次に、続く親和性精製において天然ペプチドMHC複合体と同様に捕捉された。したがって単一標識TUMAPの回収率の測定は、個々の天然TUMAPの単離効率に関する結論を可能にする。

【0087】

単離効率は、絶対的なTUMAP定量化のために選択された、13個のサンプル(7個のHLA-A*02陽性、5個のHLA-A*24陽性、および1個のHLA-A*02

10

20

30

40

50

/ A * 2 4 二重陽性サンプル) 中で評価された。8 個の A * 0 2 陽性サンプルが A * 0 2 T U M A P の単離効率について、6 個の A * 2 4 陽性サンプルが A * 2 4 T U M A P の単離効率について、分析された (図 9 A、B)。結果は、ほとんどのペプチドで、異なる組織サンプル間の単離効率が同等であることを示唆する。対照的に、個々のペプチド間では、単離効率は異なる。これは、単離効率が、限定数の組織サンプル中でのみ評価されるが、任意のその他の組織調製品に外挿されてもよいことを提案する。しかし、単離効率は、1 つのペプチドからその他に外挿されないこともあるので、各 T U M A P を個別に分析することが必要である。

【 0 0 8 8 】

少数例では、例えば、ペプチド N C A P G - 0 0 1 (図 9 A) などでは、単離効率が非現実的に高く、および / または大きく変動する。例えば、ペプチド依存性の定量化の困難さ (例えば、ペプチド C C N B 1 - 0 0 2、A S P M - 0 0 1 の高い L L O Q レベル) のために、その中で効率が評価され得ない場合、または 1 0 0 % よりも高い効率が計算された場合は、本発明者らは、1 0 0 % の単離効率を仮定した。これは、単離効率を九分通り過大評価し、それによって最終的に細胞あたりペプチドコピーの過小評価をもたらす、保守的なアプローチである。

【 0 0 8 9 】

T U M A P 単離効率の変動を推定するために、6 ~ 8 個のサンプルからの個々の T U M A P の単離の変動係数 (C V %) がプロットされた (図 9 C)。全体的に、平均的変動は、それぞれ、A * 0 2 T U M A P で 2 4 %、A * 2 4 T U M A P では 3 2 % であった。

【 0 0 9 0 】

固体冷凍組織中の細胞数の判定

細胞あたりペプチドコピー数を計算する上での別の決定的因子は、T U M A P 単離のために使用された組織サンプルの総細胞数の推定である。本発明者らは、異なる起源の広範なサンプルに、最も重要なことには、冷凍サンプルに応用可能であることから、DNA 含有量分析を使用することにした (F o r s e y a n d C h a u d h u r i , 2 0 0 9 ; A l c o s e r e t a l . , 2 0 1 1 ; A l c o s e r e t a l . , 2 0 1 1 ; S i l v a e t a l . , 2 0 1 3)。

【 0 0 9 1 】

腫瘍内の不均一性を考慮して、T U M A P 単離のために使用された完全な組織サンプルを代表する組織画分からの細胞数を判定することが必要である。T U M A P 単離中に調製される組織溶解産物は、固形組織画分と比較してより均質であることから、DNA 分析のための適切なサンプルである。DNA 単離後、蛍光ベースのアッセイ (L i f e T e c h n o l o g i e s , Q u b i t H S D N A A s s a y) で、全 DNA 濃度が定量化され、サンプルの全 DNA 含有量が計算された。

【 0 0 9 2 】

所与の DNA 量から細胞数を計算するために、本発明者らは、2 つの異なる方法を検討した。第 1 に、細胞数は、二倍体ゲノムあたりおよそ 6 . 6 7 p g の DNA と推定されているヒトゲノムの理論的質量を使用して、計算されてもよい (A l c o s e r e t a l . , 2 0 1 1 ; K o n i g s h o f f e t a l . , 2 0 0 3)。代案としては、既知の細胞数を有するサンプルを使用して、組織サンプルで使用されるのと同じ方法によって、DNA 標準曲線が調製されてもよい。この方法は、DNA の単離および定量化手順のあらゆる影響を十分に補償し、したがって本発明者らの結果の確度を改善する。本発明者らは、1 つは 7 種の異なる腫瘍細胞株からの、もう 1 つは 6 人の異なる健常ドナーの末梢血単核細胞 (P B M C) からの 2 つの異なる標準曲線を作成した。

【 0 0 9 3 】

全ての 3 つの評価法 (理論的 DNA 質量および 2 つの異なる細胞ベースの標準曲線) を比較するために、いくつかのサンプルで 1 g の組織あたりの細胞数が計算された (図 1 0 A)。細胞株標準を使用した計算は、P B M C 標準の使用と比較して、実質的により低い細胞数をもたらす (最大で 3 . 6 倍の過小評価)。これは、腫瘍細胞株が、健常二倍体 P

10

20

30

40

50

BMCと比較して、より高いDNA含有量がある異数体細胞のより大きな部分を有する傾向があることを考慮すれば、予測された。文献では、二倍体胃腫瘍の比率は、治験によって25～67%で変動する(Hiyama et al., 1995; Tamura et al., 1991; Wiksten et al., 2008; Zhang et al., 2005; Sugai et al., 2005)。組織サンプルの倍数性および異数体細胞の割合は不明であるので、どちらの標準曲線も真の細胞数に対する推定値のみを与えてもよく、個々の組織サンプルの全ての性質は考慮しない。変動のもう一つの原因は、組織サンプルの未知の増殖状態、または壊死性細胞の存在である。特に、増殖性細胞中のDNA含有量の倍増は、DNA量を細胞数と比較して増大させ、ひいては細胞数計算を偏らせる。全ての3つのアプローチによって、本発明者らは、2つの正常胃組織サンプル中で、腫瘍サンプルと比較してより低い、1gの組織あたりの細胞数を計算した。

10

【0094】

保守的なアプローチとして、本発明者らはPBM C標準曲線(図10B)を使用することにしたが、これは、過剰二倍体組織サンプルの一部における細胞数の過大評価をもたらしてもよく、このようなサンプル中の細胞あたりペプチドコピーの過小評価につながるが、いかなるサンプル中の細胞あたりペプチドコピーも過大評価することはない。

【0095】

絶対的なTUMAP定量化のために選択された組織サンプルを分析するために、本発明者らは、組織溶解産物の2～3つのアリコートからDNAを単離し、各DNA調製品は、蛍光ベースのアッセイによって2～3つの反復試験中で定量化された。総細胞数および1gの組織あたりの細胞数は、PBM C標準曲線を使用して、全DNA含有量から計算された(図11A)。細胞数分析の全体的変動の推定値を得るために、変動係数(%)が、最初に各サンプルレベルで、または利用できれば生物学的反復試験(すなわち、同一腫瘍の異なる小片からの独立した組織溶解産物調製品)レベルで、判定された。この計算は、組織溶解産物のアリコート間、ならびに蛍光アッセイにおける反復測定値間の変動を考慮に入れた。これらのCVは図11Bに示され、全体的変動は、示されるCVの中央値として判定された。変動性は、組織溶解産物が完全に均質化されていない、すなわち、非解離細胞を含有する残留組織粒子が、個々の単離反復試験についてより高い細胞数をもたらすという事実によって、部分的に説明されてもよい(例えば、図11AのGC816Tを参照されたい)。

20

30

【0096】

細胞あたりペプチドコピー

ナノLC-MS/MS試験(「総ペプチド」)におけるペプチド定量化、TUMAP単離の効率(「%単離効率」)、および利用できる各腫瘍サンプルの細胞数に関するデータを用いて、次式に従って、細胞あたりTUMAPコピー数を計算することが可能である: 総ペプチド量は、図4～図7に示される検量線を使用して、2～4ナノLC-MS/MS実験(「ペプチド/試験[fmol]」)の結果から計算される。

【数1】

$$\text{total peptide} = \left(\frac{\text{peptide}}{\text{run}} [\text{fmol}] \right) \times \frac{6.022 \times 10^{23} \left[\frac{1}{\text{mol}} \right]}{10^{15} \left[\frac{\text{fmol}}{\text{mol}} \right]} \times \frac{\text{peptide eluate} [\mu\text{L}]}{\text{MS sample per run} [\mu\text{L}]} \times \frac{100\%}{\% \text{ of lysate used for TUMAP isolation}}$$

40

(2)

total peptide	総ペプチド
peptide	ペプチド
run	試験
peptide eluate	ペプチド溶出液
MS sample per run	試験あたりのMSサンプル
% of lysate used for TUMAP isolation	TUMAP単離に使用された溶解産物の%

【0097】

50

検量線を使用して定義される L L O Q を超える M S 測定値のみが、絶対的なペプチドコピー数計算のために使用される。この L L O Q は、ナノ L C - M S / M S 実験 (「 L L O Q / 試験 [f m o l] 」) における T U M A P 量を指す。

【 0 0 9 8 】

定量化され得る全てのペプチドについて、細胞あたりコピー数は、細胞あたり 5 0 ~ 3 0 0 0 0 コピーの範囲にわたる (表 3 を参照されたい)。

【 0 0 9 9 】

【表 3】

表 3 : HLA-A*02 および HLA-A*24 TUMAP 細胞あたりのコピー数の概要

HLA-A*02 TUMAP は 8 個のサンプル中で、HLA-A*24 TUMAP は 6 個のサンプル中で分析された。nq = ペプチド量が LLOQ 未満であるため定量化されなかった

HLA対立遺伝子	ペプチドコード	n個のサンプル中で定量化された (分析サンプルの%)	細胞あたりのコピー (個別サンプルおよび生物学的反復試験の範囲)
A*02	IGF2BP3-001	1 (13%)	350-450
A*02	FAP-003	1 (13%)	200-250
A*02	COL12A1-002	0 (0%)	nq
A*02	MXRA5-001	1 (13%)	450
A*02	NCAPG-001	1 (13%)	1000
A*02	COL6A3-002	0 (0%)	nq
A*02	WNT5A-001	1 (13%)	400
A*02	F2R-001	5 (63%)	50-300
A*02	HIF1A-001	3 (38%)	9000-30000
A*02	MET-001	2 (25%)	200-250
A*02	CCNB1-002	0 (0%)	nq
A*24	ASPM-002	0 (0%)	nq
A*24	SLC6A6-001	2 (33%)	1000-5000
A*24	MMP3-001	2 (33%)	100-250
A*24	CDC2-001	0 (0%)	nq
A*24	ASPM-001	0 (0%)	nq
A*24	ATAD2-001	2 (33%)	1500-6000
A*24	KIF2C-001	1 (17%)	3500
A*24	MET-006	3 (50%)	2500-13500
A*24	AVL9-001	4 (67%)	1000-10000
A*24	PPAP2C-001	5 (83%)	200-1500
A*24	UCHL5-001	1 (17%)	2500
A*24	UQCRB-001	1 (17%)	900

「細胞あたりペプチドコピー」の文脈で L L O Q を視覚化するために、上に示す 2 つの式を使用して、各サンプル中で各 T U M A P について「細胞あたり L L O Q」が計算された。サンプルは総細胞数が異なるので、細胞あたり L L O Q は、各サンプルで異なる (A * 0 2 T U M A P については図 1 2 および図 1 3、A * 2 4 T U M A P については図 1 4 および図 1 5 を参照されたい)。

【 0 1 0 1 】

絶対的な T U M A P 定量化の誤差の推定

絶対的な T U M A P 定量化の変動を推定するために、本発明者らは、上述されたような 3 つの主要な実験結果の相対的変動を考慮した。

a) 単離 T U M A P 量：相対偏差 1 . 8 % (A * 0 2) および 2 . 1 % (A * 2 4)

10

b) T U M A P 単離効率：相対偏差 2 4 % (A * 0 2) および 3 2 % (A * 2 4)

c) 分析組織サンプル細胞数：相対偏差 2 7 %

変数値の正規分布を仮定すると、「細胞あたりコピー」の相対誤差 () は、各変数の二次相対誤差の合計の平方根として計算されてもよい：

【 数 2 】

【 数 2 】

$$\sigma_{copies} = \sqrt{(\sigma_{total\ cell\ count})^2 + (\sigma_{total\ peptide})^2 + (\sigma_{isolation\ efficiency})^2}$$

copies	コピー
total cell count	総細胞数
total peptide	総ペプチド
isolation efficiency	単離効率

20

【 0 1 0 2 】

上述の値によって、細胞あたりの絶対的なペプチドコピー数の変動係数は、H L A - A * 0 2 ペプチドでは約 3 6 %、H L A - A * 2 4 ペプチドでは 4 2 % である。結果の変動に対する所見を与えるために、モデルペプチドおよびサンプルについて、細胞あたりペプチドコピーの絶対誤差および相対誤差が計算された (表 4)。

【 0 1 0 3 】

【 表 4 】

30

表 4：モデルペプチドに対する絶対的 T U M A P 定量化における絶対および相対誤差の例示的計算

	値	A*02		A*24	
		相対誤差 (%)	絶対誤差	相対誤差 (%)	絶対誤差
総細胞数/サンプル	1x10 ⁸	27%	-	27%	-
全ペプチド [fmol]	16.25	1.8%	-	2.1%	-
ペプチドMHC単離の効率	10%	24%	-	32%	--
細胞あたりのペプチドコピー	1000	36%	360	42%	420

【 0 1 0 4 】

40

このモデル計算は、絶対的定量化の複雑な多段階合成分析について、結果の変動がなおも許容範囲であることを示唆する。個々の T U M A P では、相対誤差は、ここで計算された平均誤差から外れてもよい。細胞あたり T U M A P コピー数は、異なる T U M A P 間で定量的に比較されて、優先順位の T U M A P が、適切な抗体および / または可溶性 T 細胞受容体標的を選択できるようにしてもよい。

【 0 1 0 5 】

既知の公開された方法の T U M A P 定量化法の比較

細胞あたりの M H C 関連ペプチドコピー数の絶対的定量化に対する正確なアプローチは、これまで示されていなかった。最も重要なことには、以前公開された、M S 分析を使用して M H C 結合ペプチドを定量化する方法は、試料調製中の抗原の損失を考慮しなかった

50

(Tan et al., 2011; Hogan et al., 2005)。Peter A. von Veltenのグループは、「MHC結合ペプチドの正確な定量化」の方法を最近出版した(Hassan et al., 2014)。この技術注記では、EBV-LCL JYpp65細胞上で、2つの副組織適合抗原、LB-NISCH-1AおよびLB-SSR1-1Sを定量化するアプローチが使用された。しかし、個々の実験段階は実質的に異なり、それは下の表に要約される：

【0106】

【表5】

表5：Hassan et al.、および本発明によるTUMAP定量化法の比較

	Hassan et al.	本発明
ペプチド検量線	全てのペプチドが、ペプチド量およびMSシグナルの同一相関を有すると仮定して(勾配=1)線形範囲を判定するためだけに使用される	線形範囲、LLOQを判定し、ペプチドを定量化するために；個々のペプチドについて量およびMSシグナルのペプチド特異的相関を考慮する
ペプチド定量化	一点校正：添加標準ペプチドに対するシグナル比	内部標準法、ペプチド特異的検量線、LLOQ近くにおけるサンプル定量化に基づく
単離効率	ペプチドMHC複合体は、2時間の溶解および遠心分離による浄化後に溶解産物に添加され、これらのステップにおけるペプチド損失は無視される	ペプチドMHC複合体は、組織均質化直後、すなわち、ペプチド単離の最初期点で添加される
サンプル	細胞株	固体腫瘍組織
試料調製	最終的なナノLC-MS/MSに先だつ追加的なC18クロマトグラフィーステップが使用されて、サンプルの複雑度を低下させる。	ナノLC-MS/MSのための免疫沈降および濾過サンプルの即時使用
細胞数の判定	細胞ペレット調製中における細胞の計数	固形組織の溶解産物からのDNA含有量分析
誤差計算	MS反復試験の変動(0.1～7.1%のCV)のみが考慮され、ペプチドMHC単離の変動(それぞれ26%および91%)、および細胞数の変動は考慮されない。	MS反復試験の変動(平均で1.8～2.1%のCV)、ペプチドMHC単離効率の変動(平均で24～32%のCV)、および細胞数判定の変動(平均で27%のCV)が考慮される。

10

20

30

【0107】

Hassan et al.によって分析された2つのペプチドのコピー数は800～5300(相対偏差74%)、細胞あたりコピーは3000～12000(相対偏差60%)で、生物学的反復試験間でそれぞれ変動した。この変動の理由は明確に考察されなかったが、異なるMS装置の使用に起因してもよい。

40

【0108】

要約すると、本発明のより精製な方法は、より正確かつ信頼できる結果に寄与することが期待される。

【0109】

低コピー数を有するペプチドの定量化

本発明の方法の能力を示すために、以下の表に示されるようなデータを生成した。非常に小さなコピー数でのみ存在するペプチドが同定され、ペプチドPDE11-001はその1つである。方法は、細胞あたり約10コピー程度にわずかなペプチドの判定を可能にすることが分かる。

【0110】

50

【表 6】

表 6：低コピー数を有するペプチドの定量化

PC：前立腺がん 配列 PDE11-001 は ALLESRVNL（配列番号 25）である

ペプチドコード	細胞あたりのコピー			サンプル数			起源/HLA
	最小	中央値	最大	> LLOQ	> LOD	評価可能	
ペプチド1	20	20	20	1	5	16	NSCLC/A*02
ペプチド2	10	30	300	13	16	17	NSCLC/A*02
ペプチド3	10	30	50	4	10	18	NSCLC/A*02
ペプチド4	10	30	100	17	17	19	NSCLC/A*02
ペプチド5	20	20	90	7	8	11	NSCLC/A*02
ペプチド6	10	20	50	6	6	10	NSCLC/A*02
ペプチド7	< 10	30	200	9	12	15	PC/A*02
PDE11-001	< 10	10	30	8	9	10	PC/A*02

10

【 0 1 1 1 】

PDE11-001 は、リン酸ジエステラーゼ 11A（PDE11A）に由来する HLA-A*02 結合ペプチドであり、cAMP および cGMP の加水分解を触媒し、したがってそれぞれのシグナル伝達経路を下方制御する。PDE11A の変異は、副腎皮質過形成ならびに家族性精巣胚細胞腫瘍と連付けられている。ペプチドは、前立腺がんサンプル上で、そしてまた肝細胞、脾臓、および腎細胞がんにおいて検出され、いかなる正常組織でも検出されなかった。

20

【 0 1 1 2 】

参考文献

Alcoser SY, Kimmel DJ, Borgel SD, Carter JP, Dougherty KM, Hollingshead MG (2011). Real-time PCR-based assay to quantify the relative amount of human and mouse tissue present in tumor xenografts. BMC. Biotechnol. 11, 124.

30

Anderson NL, Razavi M, Pearson TW, Kruppa G, Paape R, Suckau D (2012). Precision of heavy-light peptide ratios measured by maldi-tof mass spectrometry. J Proteome Res 11, 1868-1878.

Forsey RW, Chaudhuri JB (2009). Validity of DNA analysis to determine cell numbers in tissue engineering scaffolds. Biotechnol. Lett. 31, 819-823.

Hassan C, Kester MG, Oudgenoeg G, de Ru AH, Janssen GM, Drijfhout JW, Spaapen RM, Jimenez CR, Heemskerk MH, Falkenburg JH, van Veelen PA (2014). Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes. J Proteomics.

40

Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y (1995). Telomerase activity in gastric cancer. Cancer Res 55, 3258-3262.

Hogan KT, Sutton JN, Chu KU, Busby JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Slingluff CL, Jr. (2005). Use of selected reaction monitoring mass spectrometry for the detection of specific MHC class I peptide antigens on A3 supertype family members. Cancer Immunol. Immunother. 54, 359-371.

50

Konigshoff M, Wilhelm J, Bohler M, Pingoud A, Hahn M (2003). HER-2/neu gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. *Clin Chem.* 49,219-229.

Prasad B, Unadkat JD (2014). Comparison of Heavy Labeled (SIL) Peptide versus SIL AC Protein Internal Standards for LC-MS/MS Quantification of Hepatic Drug Transporters. *Int. J Proteomics.* 2014, 451510.

10

Sato Y, Miyashita A, Iwatsubo T, Usui T (2012). Simultaneous absolute protein quantification of carboxylesterases 1 and 2 in human liver tissue fractions using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* 40,1389-1396.

Silva AL, Rosalia RA, Sazak A, Carstens MG, Ossendorp F, Oostendorp J, Jiskoot W (2013). Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: low-burst release is crucial for efficient CD8(+) T cell activation. *Eur. J Pharm. Biopharm.* 83, 338-345.

Sturm R, Sheynkman G, Booth C, Smith LM, Pedersen JA, Li L (2012). Absolute quantification of prion protein(90-231) using stable isotope-labeled chymotryptic peptide standards in a LC-MRM AQUA workflow. *J Am. Soc. Mass Spectrom.* 23,1522-1533.

20

Sugai T, Habano W, Jiao YF, Suzuki M, Takagane A, Nakamura S (2005). Analysis of genetic alterations associated with DNA diploidy, aneuploidy and multiploidy in gastric cancers. *Oncology* 68, 548-557.

Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S (1991). Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 51,3056-3058.

30

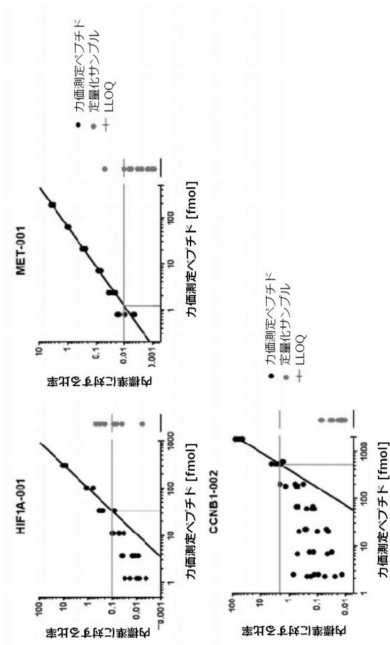
Tan CT, Croft NP, Dudek NL, Williamson NA, Purcell AW (2011). Direct quantitation of MHC-bound peptide epitopes by selected reaction monitoring. *Proteomics.* 11, 2336-2340.

Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Kokkola A, Haglund C (2008). Comparison of the prognostic value of a panel of tissue tumor markers and established clinicopathological factors in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 28, 2279-2287.

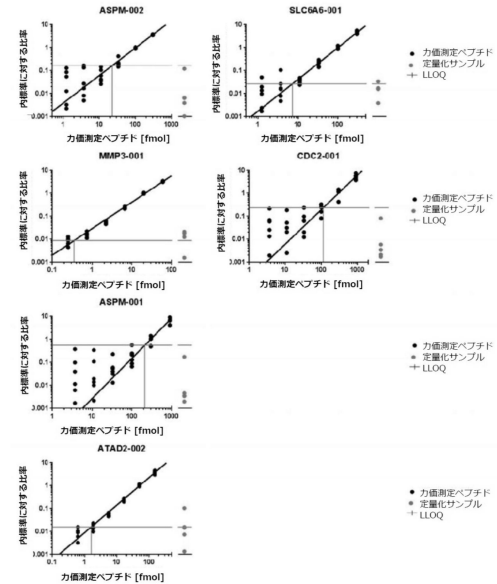
40

Zhang H, Yi EC, Li XJ, Mallick P, Kelly-Spratt KS, Masselon CD, Camp DG, Smith RD, Kemp CJ, Aebersold R (2005). High throughput quantitative analysis of serum proteins using glycopeptide capture and liquid chromatography mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics.* 4, 144-155.

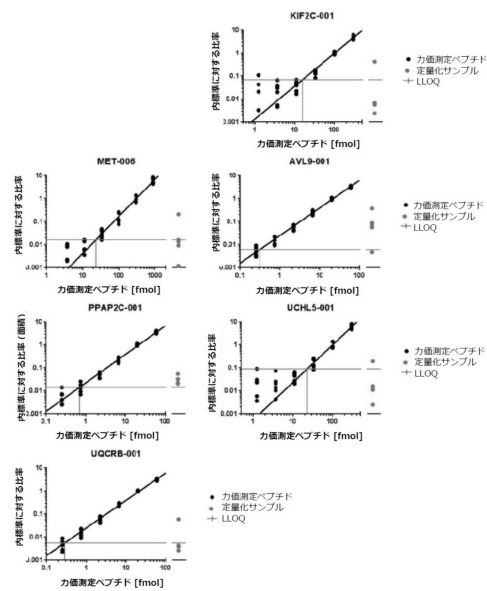
【図 5】



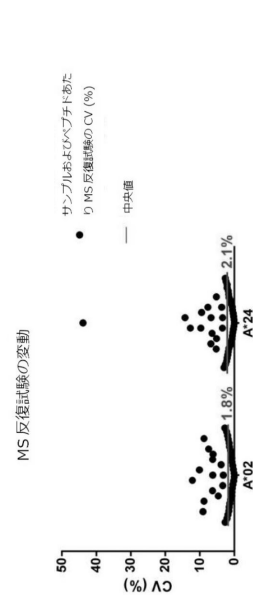
【図 6】



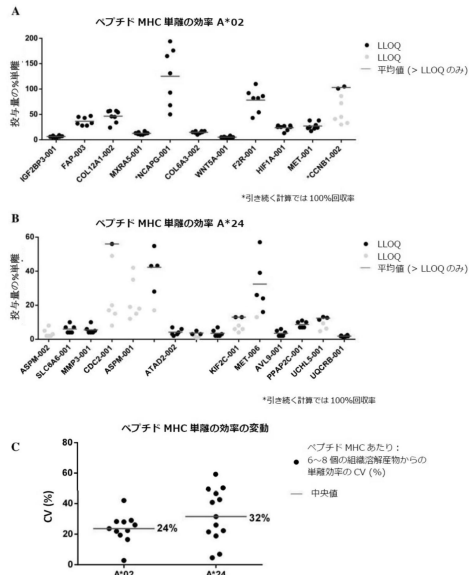
【図 7】



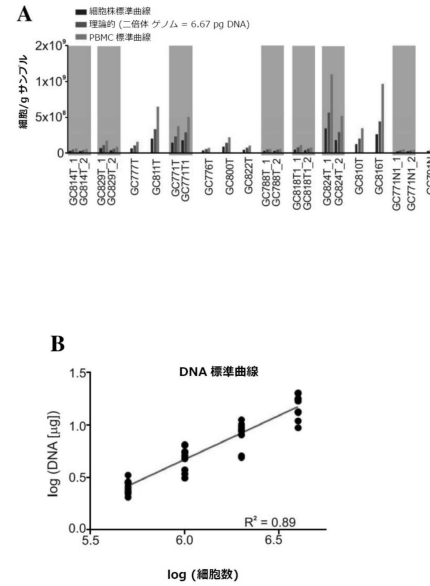
【図 8】



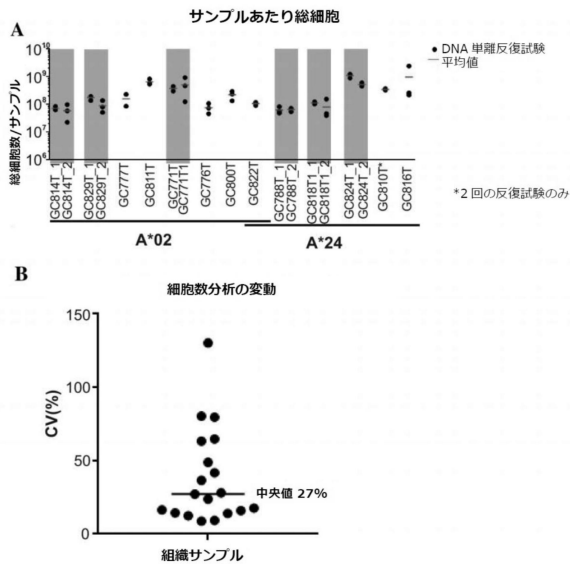
【図 9】



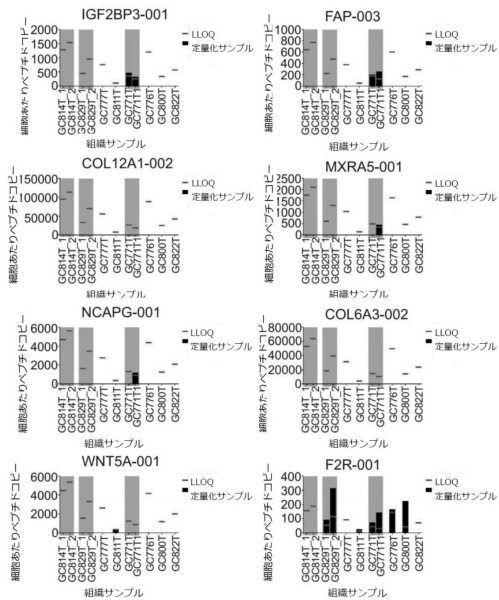
【図 10】



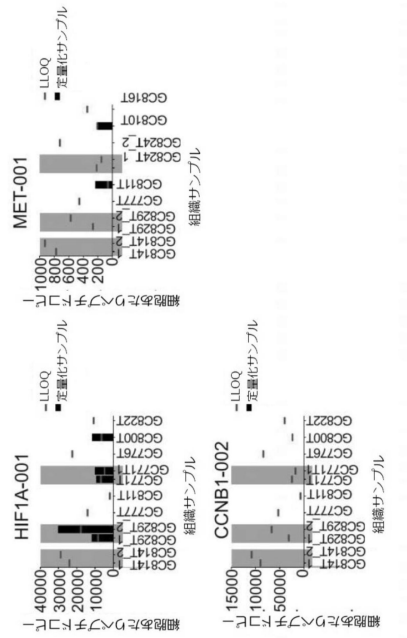
【図 11】



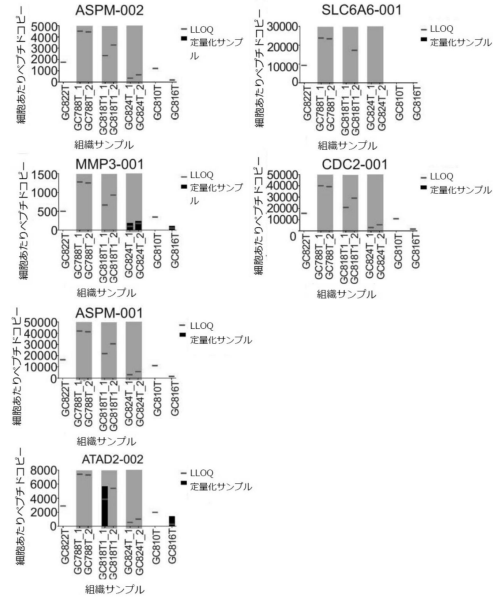
【図 12】



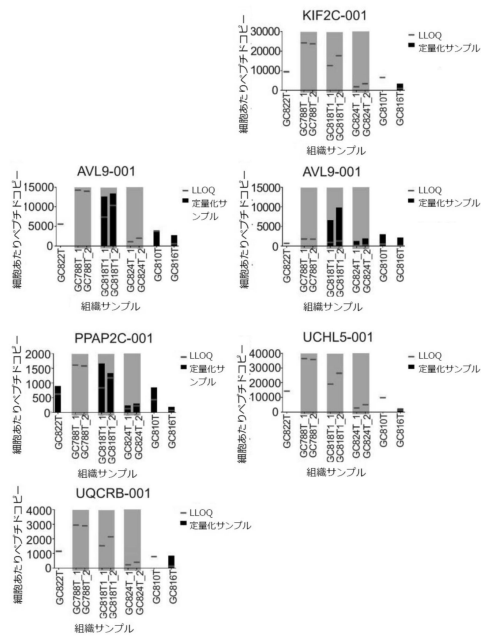
【図 13】



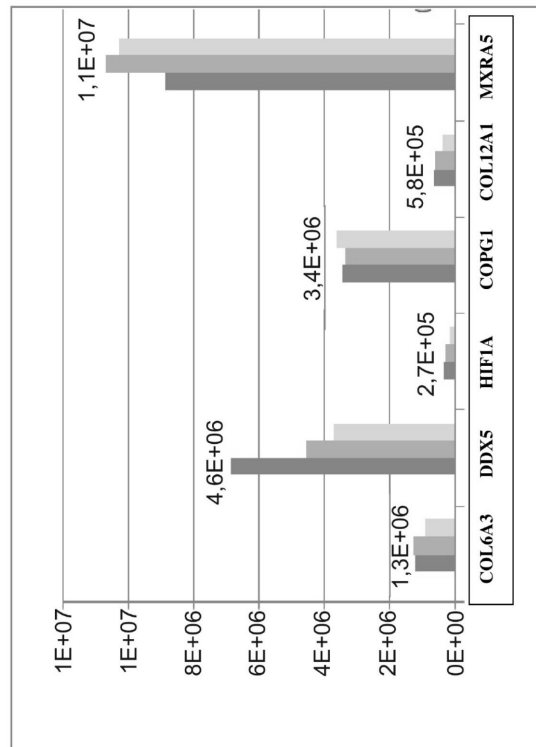
【図 14】



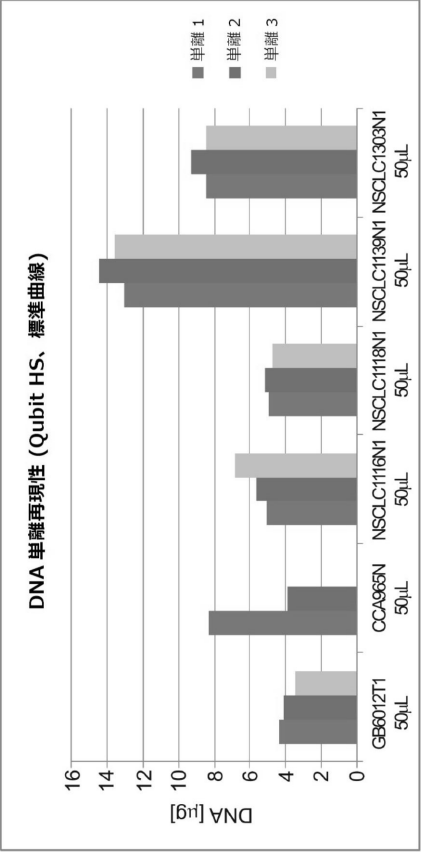
【図 15】



【図 16】



【図 17】



【配列表】

0006735741000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ライボルト, ユリア
オーストリア, 6305 イッター, シュヴェンター ヴェーク 37

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 特表2013-525759(JP, A)
特開2008-043332(JP, A)
国際公開第2004/042401(WO, A1)
J. Proteomics, 2014, 109, pp.240-244, Epub 2014 Jul 19

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/00 - 3/00
G01N 27/60 - 27/70
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)