

(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2004-536554

(P2004-536554A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|-------------------|------------------|
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| C O 7 K 14/08 | C O 7 K 14/08 | 2 G O 4 5 |
| C O 7 K 14/47 | C O 7 K 14/47 | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 P 21/02 | C 1 2 P 21/02 | 4 B O 6 3 |
| C 1 2 Q 1/02 | C 1 2 Q 1/02 | C |
| | | 4 B O 6 4 |
| | | 4 H O 4 5 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 | (全 212 頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-534349 (P2002-534349) | (71) 出願人 | 500201831 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年10月10日 (2001.10.10) | | ザ ボード オブ リージェンツ オブ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年4月10日 (2003.4.10) | | ザ ユニヴァーシティー オブ オクラホ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/031931 | | マ |
| (87) 国際公開番号 | W02002/030964 | | アメリカ合衆国オクラホマ州、ノーマン、 |
| (87) 国際公開日 | 平成14年4月18日 (2002.4.18) | | パーリントン、オバール、660 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/240, 143 | (74) 代理人 | 100075812 |
| (32) 優先日 | 平成12年10月10日 (2000.10.10) | | 弁理士 吉武 賢次 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100091487 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/256, 409 | | 弁理士 中村 行孝 |
| (32) 優先日 | 平成12年12月18日 (2000.12.18) | (74) 代理人 | 100094640 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 紺野 昭男 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/256, 410 | (74) 代理人 | 100107342 |
| (32) 優先日 | 平成12年12月18日 (2000.12.18) | | 弁理士 横田 修孝 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MHC陽性細胞からの比較リガンドマッピング

(57) 【要約】

本発明は、一般にMHC陽性細胞によって提示されるペプチドリガンドの単離、精製および同定の方法に関する。特に、本発明の方法は、未感染、感染または腫瘍形成性であることがある可溶性のクラスIおよびクラスIIのMHC分子からのこれらのペプチドリガンドの単離、精製および同定に関する。本発明の方法により、広義にはこれらのペプチドリガンドおよびそれらの付随する供給源タンパク質を感染対未感染細胞、および/または腫瘍形成対非腫瘍形成細胞のマーカーとして同定しおよび用いることができ、上記同定は、細胞を治療の目的でマーキングまたはターゲティングに有用であり、または感染細胞に対する免疫応答のプライミングに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個々のクラス I 分子についてのペプチドリガンドを単離する方法であって、
個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む細胞系であって、タンパク質を、
クラス I 分子の抗原結合溝に装填することが可能なペプチドリガンドに自然に処理すること
ができる細胞系を用意し、
構造体から個々の可溶性のクラス I 分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可
溶性のクラス I 分子を分泌する前にペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラス
I 分子の抗原結合溝に内生的に装填させ得る条件下で、細胞系を培養し、
分泌された、内生的に装填したペプチドリガンドを結合して保持する、個々の可溶性のク
ラス I 分子を単離し、
ペプチドリガンドを個々の可溶性のクラス I 分子から分離する
工程を含んでなる、方法。 10

【請求項 2】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む細胞系を用意する工程において、
構造体が更に個々の可溶性のクラス I 分子に付着し且つ個々の可溶性のクラス I 分子の単
離を促進するタグをコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

タグが H I S テイルおよび F L A G テイルからなる群から選択される、請求項 2 に記載の
方法。 20

【請求項 4】

細胞系を用意する工程において、細胞系がクラス I 陰性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

細胞系を用意する工程において、細胞系が内生性のクラス I 分子を発現する、請求項 1 に
記載の方法。

【請求項 6】

細胞系を用意する工程において、細胞系が微生物、微生物由来の遺伝子、または腫瘍遺伝
子の少なくとも 1 つに感染している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞系が H I V に感染している、請求項 6 に記載の方法。 30

【請求項 8】

細胞系を用意する工程において、細胞系が腫瘍細胞系となるように細胞系を形質転換する
、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む細胞系を用意する工程において、
個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む細胞系が、以下の工程：
少なくとも 1 種類のクラス I 分子をコードするゲノム D N A または c D N A を得て、
ゲノム D N A または c D N A 中の個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を同定し、
個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を遺伝子座特異的に P C R 増幅して、これに
よって生成した P C R 生成物が個々のクラス I 分子の切断した可溶性形態をコードするよ
うにし、
P C R 生成物を発現ベクターにクローニングすることによって、個々の可溶性のクラス I
分子をコードする構造体を形成し、
構造体を細胞系にトランスフェクションすること
を含んでなる方法によって得られるものである、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 10】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む細胞系を用意する工程において、
構造体が更に可溶性のクラス I 分子に付着し且つ個々の可溶性のクラス I 分子の単離を促
進するタグをコードする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

タグが H I S テイルおよび F L A G テイルからなる群から選択される、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

タグを個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を P C R 増幅する工程で用いる P C R プライマーによってコードする、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

タグを、P C R 生成物をクローニングする発現ベクターによってコードする、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ペプチドリガンドを同定する工程をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

ペプチドリガンドを与える供給タンパク質を同定する工程をさらに含んでなる、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む細胞系であって、タンパク質を、クラス I 分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる細胞系を用意し、

構造体から個々の可溶性のクラス I 分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラス I 分子が分泌される前に、ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラス I 分子の抗原結合溝に内性的に装填させる条件下で細胞系を培養し、

20

分泌された、内性的に装填したペプチドリガンドを結合して保持する個々の可溶性のクラス I 分子を単離し、

ペプチドリガンドを個々の可溶性のクラス I 分子から分離する

工程を含んでなる方法によって単離された、個々のクラス I 分子のペプチドリガンド。

【請求項 1 7】

配列番号：2 9 を含んでなる、個々のクラス I 分子のペプチドリガンド。

【請求項 1 8】

ペプチドリガンドが H I V - 1 M N , E N V から得られる、請求項 1 7 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 1 9】

30

配列番号：3 0 を含んでなる、個々のクラス I 分子のペプチドリガンド。

【請求項 2 0】

ペプチドリガンドがコリン作動性受容体， - 3 ポリペプチドから得られる、請求項 1 9 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 2 1】

配列番号：3 1 を含んでなる、個々のクラス I 分子のペプチドリガンド。

【請求項 2 2】

ペプチドリガンドがユビキチン特異的プロテアーゼから得られる、請求項 2 1 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 2 3】

40

配列番号：3 2 を含んでなる、個々のクラス I 分子のペプチドリガンド。

【請求項 2 4】

ペプチドリガンドが - 会合転写体タンパク質 3 (B A T 3) から得られる、請求項 2 3 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 2 5】

配列番号：3 3 を含んでなる、個々のクラス I 分子のペプチドリガンド。

【請求項 2 6】

ペプチドリガンドが H L A - B 重鎖リーダー配列から得られる、請求項 2 5 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 2 7】

50

配列番号：34を含んでなる、個々のクラスI分子のペプチドリガンド。

【請求項28】

配列番号：35を含んでなる、個々のクラスI分子のペプチドリガンド。

【請求項29】

ペプチドリガンドがRNAポリメラーゼIIポリペプチドAから得られる、請求項28に記載のペプチドリガンド。

【請求項30】

配列番号：36を含んでなる、個々のクラスI分子のペプチドリガンド。

【請求項31】

ペプチドリガンドがEUK, 翻訳開始因子4から得られる、請求項30に記載のペプチドリガンド。 10

【請求項32】

配列番号：37を含んでなる、個々のクラスI分子のペプチドリガンド。

【請求項33】

ペプチドリガンドSPARC-1様タンパク質から得られる、請求項32に記載のペプチドリガンド。

【請求項34】

配列番号：38を含んでなる、個々のクラスI分子のペプチドリガンド。

【請求項35】

ペプチドリガンドがテネイシン-Cから得られる、請求項34に記載のペプチドリガンド 20

【請求項36】

配列番号：39を含んでなる、個々のクラスI分子のペプチドリガンド。

【請求項37】

ペプチドリガンドがポリピリミジントラクト結合タンパク質1から得られる、請求項36に記載のペプチドリガンド。

【請求項38】

配列番号：40を含んでなる、個々のクラスI分子のペプチドリガンド。

【請求項39】

ペプチドリガンドがレティキュロカルピンから得られる、請求項38に記載のペプチドリガンド。 30

【請求項40】

配列番号：41を含んでなる、個々のクラスI分子のペプチドリガンド。

【請求項41】

ペプチドリガンドがELAV(HuR)から得られる、請求項40に記載のペプチドリガンド。

【請求項42】

感染細胞を未感染細胞から識別する、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定する方法であって、

個々の可溶性のクラスI分子をコードする構造体を含む未感染細胞系であって、タンパク質を、クラスI分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる未感染細胞系を用意し、 40

未感染細胞系の一部に微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも1つを感染させることによって、感染細胞系を用意し、

構造体から個々の可溶性のクラスI分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラスI分子が分泌される前に、ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラスI分子の抗原結合溝に内生的に装填させ得る条件下で、未感染細胞系および感染細胞系を培養し、

分泌された、内生的に装填したペプチドリガンドを結合して保持する個々の可溶性のクラスI分子を未感染細胞系および感染細胞系から単離し、 50

個々の可溶性のクラス I 分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から分離し、個々の可溶性のクラス I 分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から分離し、
内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から、および内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から単離し、
感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドと、未感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドとを比較し、
感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示されるが、未感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によっては提示されない、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定する
工程を含んでなる、方法。

10

【請求項 4 3】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系を用意する工程において、構造体が更に個々の可溶性のクラス I 分子に付着し且つ個々の可溶性のクラス I 分子の単離を促進するタグをコードする、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

未感染細胞系がクラス I 陰性である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

未感染細胞系が内生的に性のクラス I 分子を発現する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系を用意する工程において、個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系が、以下の工程：

20

少なくとも一種類のクラス I 分子をコードするゲノム DNA または cDNA を得て、
ゲノム DNA または cDNA 中の個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を同定し、
個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を遺伝子座特異的に PCR 増幅して、それによって生成した PCR 生成物が個々のクラス I 分子の切断した可溶性形態をコードするよう

にし、
PCR 生成物を発現ベクター中にクローニングすることによって、個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を形成し、

30

構造体を未感染細胞系中にトランスフェクションすること

を含んでなる方法によって得られるものである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系を用意する工程において、構造体が更に可溶性のクラス I 分子に付着し、かつ個々の可溶性のクラス I 分子の単離を促進するタグをコードする、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

タグが HIS テイルおよび FLAG テイルからなる群から選択される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

タグを、個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を PCR 増幅する工程で用いる PCR プライマーによってコードする、請求項 4 7 に記載の方法。

40

【請求項 5 0】

タグを、PCR 生成物をクローニングする発現ベクターによってコードする、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示され且つ未感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によっては提示されない少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを与える供給タンパク質を同定する工程をさらに含んでなる、請求項 4 2 に記載の方法。

50

【請求項 5 2】

感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示されるが、未感染細胞系上では提示されない少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定する工程において、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドが細胞系が感染して感染細胞系を形成する微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも一種類によってコードされるタンパク質から得られる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 3】

感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示されるが、未感染細胞系上では提示されない少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定する工程において、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドが未感染細胞系によってコードされるタンパク質から得られる、請求項 4 2 に記載の方法。

10

【請求項 5 4】

少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドが得られる未感染細胞系によってコードされるタンパク質の腫瘍細胞系での発現が増加する、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

未感染細胞系の一部に感染する工程において、未感染細胞系の一部に HIV を感染させる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

感染細胞を未感染細胞から識別する少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定する方法であって、

20

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系であって、タンパク質を、クラス I 分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる未感染細胞系を用意し、

未感染細胞系の一部に微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも 1 つを感染させることによって、感染細胞系を用意し、

構造体から個々の可溶性のクラス I 分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラス I 分子が分泌される前に、ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラス I 分子の抗原結合溝に内生的に装填させ得る条件下で、未感染細胞系および感染細胞系を培養し、

分泌された、内生的に装填したペプチドリガンドを結合して保持する個々の可溶性のクラス I 分子を未感染細胞系および感染細胞系から単離し、

30

個々の可溶性のクラス I 分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から分離し、個々の可溶性のクラス I 分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から分離し、

内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から、および内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から単離し、

未感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドと、感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドとを比較し、

未感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示されるが、感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によっては提示されない、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定する

40

工程を含んでなる、方法。

【請求項 5 7】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系を用意する工程において、構造体がさらに個々の可溶性のクラス I 分子に付着し、かつ個々の可溶性のクラス I 分子の単離を促進するタグをコードする、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

未感染細胞系がクラス I 陰性である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

未感染細胞系が内生的に性のクラス I 分子を発現する、請求項 5 6 に記載の方法。

50

【請求項 60】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系を用意する工程において、個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系が、以下の工程：

少なくとも一種のクラス I 分子をコードするゲノム DNA または cDNA を得て、ゲノム DNA または cDNA 中の個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を同定し、個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を遺伝子座特異的に PCR 増幅して、これによって生成した PCR 生成物が個々のクラス I 分子の切断した可溶性形態をコードするよう

にし、PCR 生成物を発現ベクターにクローニングすることによって、個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を形成し、構造体を細胞系にトランスフェクションすることを含んでなる方法によって得られるものである、請求項 56 に記載の方法。 10

【請求項 61】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系を用意する工程において、構造体がさらに個々の可溶性のクラス I 分子に付着し且つ個々の可溶性のクラス I 分子の単離を促進するタグをコードする、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

タグが HIS テイルおよび FLAG テイルからなる群から選択される、請求項 61 に記載の方法。 20

【請求項 63】

タグを個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を PCR 増幅する工程で用いる PCR プライマーによってコードする、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 64】

タグを、PCR 生成物をクローニングする発現ベクターによってコードする、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 65】

未感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示され、かつ感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によっては提示されない、少なくとも一種の内生的に装填したペプチドリガンドを与える供給タンパク質を同定する工程をさらに含んでなる、請求項 56 に記載の方法。 30

【請求項 66】

未感染細胞系の一部に感染する工程において、未感染細胞系の一部に HIV を感染させる、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 67】

感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示されるが未感染細胞上では提示されない内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項 68】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：29 を含んでなる、請求項 67 に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。 40

【請求項 69】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：30 を含んでなる、請求項 67 に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項 70】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：31 を含んでなる、請求項 67 に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項 71】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：32 を含んでなる、請求項 67 に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項 72】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：33を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項73】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：34を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項74】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：35を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項75】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：36を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。 10

【請求項76】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：37を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項77】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：38を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項78】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：39を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。 20

【請求項79】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：40を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項80】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：41を含んでなる、請求項67に記載の内生的に装填したペプチドリガンド。

【請求項81】

少なくとも一種類のペプチド断片に自然に処理することができる自己タンパク質であって、少なくとも一種類のペプチド断片が感染細胞上のクラスI分子に内生的に装填され、かつこれによって提示される、自己タンパク質。 30

【請求項82】

少なくとも一種類のペプチド断片が未感染細胞上のクラスI分子に内生的に装填され、かつこれによって提示される、請求項81に記載の自己タンパク質。

【請求項83】

感染細胞上の個々のクラスI分子によって提示されるが、未感染細胞上では提示されないペプチドリガンドであって、

個々の可溶性のクラスI分子をコードする構造体を含む未感染細胞系であって、タンパク質を、クラスI分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる未感染細胞系を用意し、

未感染細胞系の一部に微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも1つを感染させることによって、感染細胞系を用意し、 40

構造体から個々の可溶性のクラスI分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラスI分子が分泌される前に、ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラスI分子の抗原結合溝に内生的に装填させ得る条件下で、未感染細胞系および感染細胞系を培養し、

分泌された、内生的に装填したペプチドリガンドを結合して保持する個々の可溶性のクラスI分子を未感染細胞系および感染細胞系から単離し、

個々の可溶性のクラスI分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から、個々の可溶性のクラスI分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から分離し、

内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から、および内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から単離し、
未感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドと、感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドとを比較し、
感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示されるが、未感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によっては提示されない、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定する
工程を含んでなる方法によって同定されるペプチドリガンド。

【請求項 8 4】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系を用意する工程において、個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系が、以下の工程： 10

少なくとも一種類のクラス I 分子をコードするゲノム DNA または cDNA を得て、
ゲノム DNA または cDNA 中の個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を同定し、
個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を遺伝子座特異的に PCR 増幅して、それによって生成した PCR 生成物が個々のクラス I 分子の切断した可溶性形態をコードするようにし、

PCR 生成物を発現ベクター中にクローニングすることによって、個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を形成し、

構造体を未感染細胞系中にトランスフェクションすること 20
を含んでなる方法によって得られるものである、請求項 8 3 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 8 5】

構造体がさらに個々の可溶性のクラス I 分子に付着し、かつ個々の可溶性のクラス I 分子の単離を促進するタグをコードする、請求項 8 4 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 8 6】

タグが HIS テイルおよび FLAG テイルからなる群から選択される、請求項 8 5 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 8 7】

タグを個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を PCR 増幅する工程で用いる PCR プライマーによってコードする、請求項 8 5 に記載のペプチドリガンド。 30

【請求項 8 8】

タグを、PCR 生成物をクローニングする発現ベクターによってコードする、請求項 8 5 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 8 9】

少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドが、未感染細胞系の一部が感染して感染細胞系を形成する微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも 1 つによってコードされたタンパク質から得られる、請求項 8 3 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 9 0】

少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドが未感染細胞系によってコードされるタンパク質から得られる、請求項 8 3 に記載のペプチドリガンド。 40

【請求項 9 1】

未感染細胞系の一部が HIV に感染している、請求項 8 3 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 9 2】

請求項 8 3 に記載のペプチドリガンドを与える、供給タンパク質。

【請求項 9 3】

個々のクラス I 分子に内生的に装填され、かつ未感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示される、ペプチドリガンド。

【請求項 9 4】

ペプチドリガンドが個々のクラス I 分子に内生的に装填されておらず、かつ感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示される、請求項 9 3 に記載のペプチドリガンド。 50

【請求項 95】

少なくとも一種類のペプチド断片に処理することができる自己タンパク質であって、少なくとも一種類のペプチド断片が個々のクラス I 分子に内生的に装填され、かつ未感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示される、自己タンパク質。

【請求項 96】

少なくとも一種類のペプチド断片が個々のクラス I 分子に内生的に装填されておらず、感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示される、請求項 95 に記載の自己タンパク質。

【請求項 97】

個々のクラス I 分子に内生的に装填され、かつ未感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示されるが感染細胞上では提示されないペプチドリガンドであって、以下の工程：
 個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系であって、タンパク質を、クラス I 分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる未感染細胞系を用意し、
 未感染細胞系の一部に微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも 1 つを感染させることによって、感染細胞系を用意し、
 個々の可溶性のクラス I 分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラス I 分子が分泌される前に、ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラス I 分子の抗原結合溝に内生的に装填させ得る条件下で、未感染細胞系および感染細胞系を培養し、
 分泌された、内生的に装填したペプチドリガンドを結合して保持する個々の可溶性のクラス I 分子を未感染細胞系および感染細胞系から単離し、
 個々の可溶性のクラス I 分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系および感染細胞系から分離し、
 内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から、および内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から単離し、
 未感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドと感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドとを比較し、
 未感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示されるが、感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によっては提示されない、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定すること
 を含んでなる方法によって同定されるペプチドリガンド。

【請求項 98】

構造体がさらに個々の可溶性のクラス I 分子に付着し、かつ個々の可溶性のクラス I 分子の単離を促進するタグをコードする、請求項 97 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 99】

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系が、以下の工程：
 少なくとも一種類のクラス I 分子をコードするゲノム DNA または cDNA を得て、
 ゲノム DNA または cDNA 中の個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を同定し、
 個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を遺伝子座特異的に PCR 増幅して、それによって生成した PCR 生成物が個々のクラス I 分子の切断した可溶性形態をコードするようにし、
 PCR 生成物を発現ベクター中にクローニングすることによって、個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を形成し、
 構造体を未感染細胞系中にトランスフェクションすること
 を含んでなる方法によって得られるものである、請求項 97 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 100】

構造体がさらに個々の可溶性のクラス I 分子に付着し且つ個々の可溶性のクラス I 分子の単離を促進するタグをコードする、請求項 99 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 101】

タグが H I S テイルおよび F L A G テイルからなる群から選択される、請求項 99 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 102】

タグを個々のクラス I 分子をコードする対立遺伝子を P C R 増幅する工程で用いる P C R プライマーによってコードする、請求項 99 に記載のペプチドリガンド。

【請求項 103】

タグを、P C R 生成物をクローニングする発現ベクターによってコードする、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 104】

請求項 97 に記載のペプチドリガンドを与える、供給タンパク質。

10

【請求項 105】

処理を行って少なくとも一種類のペプチド断片とする自己タンパク質を同定する方法であって、ここで少なくとも一種類のペプチド断片が個々のクラス I 分子に内生的に装填され、かつ感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示されるが未感染細胞上では提示されないものであり、該方法が以下の工程：

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系であって、タンパク質を、クラス I 分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる未感染細胞系を用意し、

未感染細胞系の一部に微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも 1 つを感染させることによって、感染細胞系を用意し、

20

個々の可溶性のクラス I 分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラス I 分子が分泌される前に、ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラス I 分子の抗原結合溝に内生的に装填させ得る条件下で、未感染細胞系および感染細胞系を培養し、

内生的に装填したペプチドリガンドを結合した分泌した個々の可溶性のクラス I 分子を未感染細胞系および感染細胞系から単離し、

個々の可溶性のクラス I 分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系および感染細胞系から分離し、

内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から、および内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から単離し、

30

感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドと未感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドとを比較し、

感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示されるが未感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によっては提示されない少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定し、

少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを与える供給タンパク質を決定し、

供給タンパク質が、感染細胞系が感染する微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子によってコードされないが、未感染細胞系によってコードされるときには、供給タンパク質を自己タンパク質として同定すること

40

を含んでなる、方法。

【請求項 106】

処理を行って少なくとも一種類のペプチド断片とする自己タンパク質を同定する方法であって、ここで少なくとも一種類のペプチド断片が個々のクラス I 分子に内生的に装填され、且つ未感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示されるが感染細胞上では提示されないものであり、該方法が以下の工程：

個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系であって、タンパク質をクラス I 分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる未感染細胞系を用意し、

未感染細胞系の一部に微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも 1 つを

50

- 感染させることによって、感染細胞系を用意し、
 個々の可溶性のクラスⅠ分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラスⅠ分子が分泌される前に、ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラスⅠ分子の抗原結合溝に内生的に装填させ得る条件下で、未感染細胞系および感染細胞系を培養し、
 分泌された、内生的に装填したペプチドリガンドを結合して保持する個々の可溶性のクラスⅠ分子を未感染細胞系および感染細胞系から単離し、
 可溶性のクラスⅠ分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系および感染細胞系から分離し、
 内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から、および内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から単離し、
 未感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドと感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドとを比較し、
 未感染細胞系上の個々の可溶性のクラスⅠ分子によって提示されるが、感染細胞系上の個々の可溶性のクラスⅠ分子によっては提示されない、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定し、
 少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを与える供給タンパク質を決定すること
 を含んでなる、方法。 10
- 【請求項 107】 20
 個々のクラスⅠ分子についての内生的に装填されたペプチドリガンドを同定するキットであって、
 個々の可溶性のクラスⅠ分子をコードする構造体を含む細胞系であって、タンパク質を、クラスⅠ分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができ、この細胞系を個々の可溶性のクラスⅠ分子を発現させる条件下で培養するとき、細胞から個々の可溶性のクラスⅠ分子が分泌される前に、ペプチドリガンドがそれぞれの個々の可溶性のクラスⅠ分子の抗原結合溝に内部装填されるようにする細胞系を含んでなる、キット。
- 【請求項 108】 30
 細胞系が、以下の工程：
 少なくとも一種類のクラスⅠ分子をコードするゲノムDNAまたはcDNAを得て、ゲノムDNAまたはcDNA中の個々のクラスⅠ分子をコードする対立遺伝子を同定し、個々のクラスⅠ分子をコードする対立遺伝子を遺伝子座特異的にPCR増幅して、それによって生成したPCR生成物が個々のクラスⅠ分子の切断した可溶性形態をコードするようにし、
 PCR生成物を発現ベクターにクローニングすることによって、個々の可溶性のクラスⅠ分子をコードする構造体を形成し、
 構造体を未感染細胞系にトランスフェクションすること
 を含んでなる方法によって生成する、請求項107に記載のキット。
- 【請求項 109】 40
 疾病状態を検出する方法であって、
 個々のクラスⅠ分子中で内生的に装填したペプチドリガンドを検出する手段を用意し、内生的に装填したペプチドリガンドが未感染細胞上ではなく感染細胞上で個々のクラスⅠ分子によって提示される
 工程を含んでなる、方法。
- 【請求項 110】
 内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：29を含んでなる、請求項109に記載の方法。
- 【請求項 111】 50
 内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：30を含んでなる、請求項109に記載

の方法。

【請求項 1 1 2】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：31を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：32を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：33を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：34を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：35を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：36を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：37を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：38を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：39を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：40を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：41を含んでなる、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

疾病状態がHIV感染症である、請求項109に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

疾病状態を検出するための方法であって、個々のクラスI分子中で内生的に装填したペプチドリガンドを検出する手段を用意し、内生的に装填したペプチドリガンドが感染細胞上ではなく未感染細胞上で個々のクラスI分子によって提示される工程を含んでなる、方法

【請求項 1 2 5】

疾病状態を検出するためのキットであって、個々のクラスI分子中で内生的に装填したペプチドリガンドを検出するための方法であって、内生的に装填したペプチドリガンドが未感染細胞上ではなく感染細胞上で個々のクラスI分子によって提示されることを含んでなる、方法。

【請求項 1 2 6】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：29を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

10

20

30

40

50

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：30を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項128】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：31を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項129】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：32を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項130】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：33を含んでなる、請求項125に記載の方法。 10

【請求項131】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：34を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項132】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：35を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項133】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：36を含んでなる、請求項125に記載の方法。 20

【請求項135】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：37を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項136】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：38を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項137】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：39を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項138】 30

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：40を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項139】

内生的に装填したペプチドリガンドが配列番号：41を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項140】

疾病状態を検出するためのキットであって、個々のクラスI分子中で内生的に装填したペプチドリガンドを検出するための手段であって、ペプチドリガンドが感染細胞上ではなく未感染細胞上で個々のクラスI分子によって提示されることを含んでなる、キット。

【請求項141】 40

個々のクラスI分子によって提示される内生的に装填したペプチドリガンドのモチーフを同定する方法であって、

個々の可溶性のクラスI分子をコードする構造体を含む細胞系であって、タンパク質を、クラスI分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる細胞系を用意し、

構造体から個々の可溶性のクラスI分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラスI分子が分泌される前にペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラスI分子の抗原結合溝に内生的に装填させ得る条件下で、細胞系を培養し、

内生的に装填したペプチドリガンドを結合した分泌した個々の可溶性のクラスI分子を単離し、

内生的に装填したペプチドリガンドを個々の可溶性のクラス I 分子から分離することによって、内生的に装填したペプチドリガンドのプールを形成し、
 内生的に装填したペプチドリガンドのプールを配列決定し、内生的に装填したペプチドリガンドの特異的位置における特定アミノ酸のドミナント・オカレンス (dominant occurrence) に基づいて内生的に装填したペプチドリガンドのモチーフを誘導する

工程を含んでなる、方法。

【請求項 1 4 2】

化合物を感染細胞にターゲティングする方法であって、
 個々の可溶性のクラス I 分子をコードする構造体を含む未感染細胞系であって、タンパク質を、クラス I 分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然に処理することができる細胞系を用意し、

未感染細胞系の一部に微生物、微生物由来の遺伝子または腫瘍遺伝子の少なくとも 1 つを感染させることによって、感染細胞系を用意し、

個々の可溶性のクラス I 分子を発現させる条件であり、かつ細胞から個々の可溶性のクラス I 分子が分される前に、ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラス I 分子の抗原結合溝に内生的に装填させる条件下で、未感染細胞系および感染細胞系を培養し、分泌された、内生的に装填したペプチドリガンドを結合して保持する個々の可溶性のクラス I 分子を未感染細胞系および感染細胞系から単離し、

個々の可溶性のクラス I 分子由来の内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系および感染細胞系から分離し、

内生的に装填したペプチドリガンドを未感染細胞系から、および内生的に装填したペプチドリガンドを感染細胞系から単離し、

感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドと未感染細胞系から単離した内生的に装填したペプチドリガンドとを比較し、

感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によって提示されるが、未感染細胞系上の個々の可溶性のクラス I 分子によっては提示されない、少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを同定し、

化合物を、細胞の表面上の個々のクラス I 分子によって提示される少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドを有する細胞にターゲティングする

工程を含んでなる、方法。

【請求項 1 4 3】

化合物を細胞にターゲティングする工程において、化合物が薬剤である、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

化合物を細胞にターゲティングする工程において、化合物が抗体である、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

化合物を細胞にターゲティングする工程において、化合物が少なくとも一種類の内生的に装填したペプチドリガンドと個々のクラス I 分子から形成される複合体を認識する、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

リガンドを単離する方法であって、
 所望により、細胞系を用意し、
 所望により、細胞系を培養し、
 リガンドを結合した分子を単離し、
 所望により、リガンドを分子から分離する
 工程を含んでなる、方法。

【請求項 1 4 7】

所望により、細胞系を用意し、

10

20

30

40

50

所望により、細胞系を培養し、
 リガンドを結合した分子を単離し、
 所望により、リガンドを分子から分離する
 工程を含んでなる方法によって単離されるリガンド。

【請求項 148】

少なくとも一種類のリガンドを同定する方法であって、
 所望により、細胞系を用意し、
 所望により、細胞系の一部を感染させ、
 所望により、細胞系を培養し、
 所望により、リガンドを結合した分子を単離し、
 所望により、リガンドを分子から分離し、
 所望により、リガンドを単離し、
 少なくとも一種類のリガンドを同定する
 工程を含んでなる、方法。

10

【請求項 149】

少なくとも一種類のリガンドを同定する方法であって、
 所望により、未感染細胞系を用意し、
 所望により、未感染細胞系の一部を感染させ、
 所望により、未感染細胞系と感染細胞系を培養し、
 所望により、リガンドを結合した分子を未感染細胞系と感染細胞系から単離し、
 所望により、分子由来のリガンドを未感染細胞系から分離し、かつ分子由来のリガンドを
 感染細胞系から分離し、
 所望により、リガンドを未感染細胞系から、およびリガンドを感染細胞系から単離し、
 所望により、未感染細胞系から単離したリガンドと感染細胞系から単離したリガンドとを
 比較し、
 未感染細胞系上の分子によって提示されるが、感染細胞系上の分子によって提示されない
 少なくとも一種類のリガンドを同定する
 工程を含んでなる、方法。

20

【請求項 150】

感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示されるが、所望により未感染細胞上の個々の
 クラス I 分子によっては提示されない、リガンド。

30

【請求項 151】

処理を行って少なくとも一種類のペプチド断片とすることができるタンパク質であって、
 少なくとも一種類のペプチド断片がクラス I 分子に装填されおよび / またはこれによって
 提示されることを特徴とする、タンパク質。

【請求項 152】

所望により、細胞系の一部を感染させ、
 所望により、細胞系を培養し、
 所望により、リガンドを結合した分子を単離し、
 所望により、リガンドを分子から分離し、
 所望により、リガンドを単離し、
 少なくとも一種類のリガンドを同定する
 工程を含んでなる方法によって同定される、リガンド。

40

【請求項 153】

分子に装填され、且つ細胞上の分子によって提示される、リガンド。

【請求項 154】

処理を行って少なくとも一種類のペプチド断片とすることができるタンパク質であって、
 少なくとも一種類のペプチド断片がクラス I 分子に装填されており、かつ所望により未感
 染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示される、タンパク質。

【請求項 155】

50

所望により、未感染細胞系を用意し、
 所望により、未感染細胞系の一部を感染させ、
 所望により、未感染細胞系と感染細胞系を培養し、
 所望により、リガンドを結合した分子を未感染細胞系と感染細胞系から単離し、
 所望により、分子由来のリガンドを未感染細胞系および感染細胞系から分離し、
 所望により、リガンドを未感染細胞系から、およびリガンドを感染細胞系から単離し、
 所望により、未感染細胞系から単離したリガンドと感染細胞系から単離したリガンドとを
 比較し、
 未感染細胞系上の分子によって提示されるが、感染細胞系上の分子によって提示されない
 、少なくとも一種類のリガンドを同定する
 工程を含んでなる方法によって同定される、リガンド。

10

【請求項156】

自己タンパク質を同定する方法であって、
 所望により、細胞系を用意し、
 所望により、細胞系の一部を感染させ、
 所望により、細胞系を培養し、
 所望により、リガンドを結合した分子を単離し、
 所望により、リガンドを分子から分離し、
 所望により、リガンドを単離し、
 所望により、少なくとも一種類のリガンドを同定し、
 少なくとも一種類のリガンドが得られる供給タンパク質を決定し、
 所望により、供給タンパク質を自己タンパク質として同定する
 工程を含んでなる、方法。

20

【請求項157】

自己タンパク質を同定する方法であって、
 所望により、未感染細胞系を用意し、
 所望により、未感染細胞系の一部を感染させ、
 所望により、未感染細胞系および感染細胞系を培養し、
 所望により、リガンドを結合した分子を未感染細胞系および感染細胞系から単離し、
 所望により、分子由来のリガンドを未感染細胞系および感染細胞系から分離し、
 所望により、リガンドを未感染細胞系から、およびリガンドを感染細胞系から単離し、
 所望により、未感染細胞系から単離したリガンドを感染細胞系から単離したリガンドと比
 較し、
 所望により、未感染細胞系上の分子によって提示されるが感染細胞系上の分子によって提
 示されない少なくとも一種類のリガンドを同定し、
 少なくとも一種類のリガンドが得られる供給タンパク質を決定する
 工程を含んでなる、方法。

30

【請求項158】

リガンドを同定するためのキットであって、
 クラスI分子をコードする構造体を含む細胞系
 を含んでなる、キット。

40

【請求項159】

疾病状態を検出する方法であって、
 分子中でリガンドを検出する手段を用意する
 工程を含んでなる、方法。

【請求項160】

疾病状態を検出する方法であって、
 分子中でリガンドを検出する手段を用意し、リガンドが所望により未感染細胞上の分子に
 よって提示される、
 工程を含んでなる、方法。

50

【請求項 161】

疾病状態を検出するためのキットであって、
分子中でリガンドを検出する手段
を含んでなる、キット。

【請求項 162】

疾病状態を検出するためのキットであって、
分子中でリガンドを検出する手段を含んでなり、リガンドは所望により未感染細胞上の個々のクラス I 分子によって提示されるが、感染細胞上の個々のクラス I 分子によっては提示されない、キット。

【請求項 163】

リガンドについてのモチーフを同定する方法であって、
所望により、細胞系を用意し、
所望により、細胞系を培養し、
所望により、リガンドを結合した分子を単離し、
所望により、リガンドを分子から分離することによって、リガンドのプールを形成し、
リガンドのプールを配列決定し、リガンドのモチーフを誘導する
工程を含んでなる、方法。

10

【請求項 164】

化合物を細胞にターゲティングする方法であって、
所望により、細胞系を用意し、
所望により、このような細胞系の一部を感染させ、
所望により、細胞系を培養し、
所望により、内生的に装填したペプチドリガンドを結合した分子を単離し、
所望により、リガンドを分子から分離し、
所望により、少なくとも一種類のリガンドを同定し、
化合物を、少なくとも一種類のリガンドを有する細胞にターゲティングする工程を含んでなる、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願に対するクロス・リファレンス

本出願は、2000年10月10日出願の「C-末端エピトープタギングがMHCクラス I 陽性細胞からの比較リガンドマッピングを促進する」という名称の仮特許出願米国連続番号60/240,143号明細書、2001年6月20日出願の「MHCクラス I 陽性細胞からの比較リガンドマッピングのためのC-末端タギングの方法によって同定される HIV エピトープ」という名称の仮特許出願米国連続番号60/299,452号明細書、2000年12月18日出願の「ゲノムDNAからHLAの生成」という名称の仮特許出願米国連続番号60/256,410号明細書、2000年12月18日出願の「cDNAからのHLAの生成」という名称の仮特許出願米国連続番号60/256,409号明細書、および2001年10月9日出願の「ゲノムDNAから可溶性のヒトHLAクラス I タンパク質の生成」という名称の仮特許出願米国の明細書であって、連続番号は未だ指定されていないものの利益を主張するものであり、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

30

40

【0002】

連邦政府の援助による研究または開発に関するステートメント

この研究は、国立衛生研究所からの契約：「ウイルスエピトープのマッピングおよび特性決定」という名称の契約番号NO1-AI-95360によって部分的に資金援助を受けた。厳密な意味で、政府は本出願に対して一定の権利を有することができる。

【0003】

【発明の背景】

1. 発明の分野

50

本発明は、一般にMHC陽性細胞によって提示されるペプチドリガンドの単離、精製および同定の方法に関する。特に、本発明の方法は、未感染、感染または腫瘍形成性であることがある可溶性のクラスIおよびクラスIIのMHC分子からのこれらのペプチドリガンドの単離、精製および同定に関する。本発明の方法により、広義にはこれらのペプチドリガンドおよびそれらの付随する供給タンパク質を感染対未感染細胞、および/または腫瘍形成対非腫瘍形成細胞のマーカーとして同定し、および用いることができ、上記同定は、細胞を治療の目的でマーキングまたはターゲティングに、または感染細胞に対する免疫応答のプライミングに有用である。

【0004】

2. 背景技術

ヒトではHLAクラスIと呼ばれるクラスI主要組織適合性複合体(MHC)分子は、細胞表面でペプチド抗原リガンドと結合し、表示する。クラスIMHC分子によって提示されるペプチド抗原リガンドは、通常の内生的にタンパク質(「自己」)または細胞に導入される異種タンパク質(「非自己」)から誘導される。非自己タンパク質は、悪性形質転換またはウイルスのような細胞内病原体であることがある。このように、クラスIMHC分子は、「非自己」ペプチドとの相互作用によって活性化されるCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球(CTL)などこれに限定されない免疫エフェクター細胞に細胞の内部適合性に関する情報を伝達し、これによって「非自己」ペプチドを提示する細胞をリーシスし、または殺す。

【0005】

ヒトではHLAクラスIIと呼ばれるクラスII MHC分子も、細胞表面でペプチド抗原リガンドと結合し、表示する。実質的に総ての核形成した細胞上で発現するクラスIMHC分子とは異なり、クラスII MHC分子は通常はBリンパ球、マクロファージ、樹状細胞、およびエンドサイトーシス経路によって細胞外流体から異種抗原を吸収する他の抗原提示細胞のような分化細胞に閉じ込められている。これらが結合して提示するペプチドは、細胞の外側で増殖する細菌の産物のような細胞外異種抗原から誘導され、このような産物としては、宿主(例えば、ヒト)に有害であり且つ致命的でさえある効果を有することが多い細菌によって分泌されるタンパク質毒素が挙げられる。このように、クラスII分子は、クラスII分子を展示する細胞の近傍の細胞外空間の適合性に関する情報をCD4ヘルパーT細胞などこれに限定されない免疫エフェクター細胞に伝達することによって、これらの病原体を除去させ、これらの病原体の検討はB細胞に、微生物並びにこのような微生物によって産生される毒素に対する抗体を作らせることによって、またマクロファージを活性化して摂取された微生物を破壊することによって達成される。

【0006】

クラスIおよびクラスIIHLA分子は、体系的再結合および点突然変異によって生じる広汎な多型を示し、それ自体、数百の異なる種類のHLAが世界の個々群中に存在し、大きな免疫学的多様性を生じている。個々群中のこのような広汎なHLA多様性により、個々間での組織または臓器移植拒絶反応、並びに感染性疾患に対する感染性および/または耐性の差が生じる。HLA分子は、自己免疫および癌にもかなり寄与する。HLA分子は、総てではないにしてもほとんどの適応免疫応答を伝達するので、移植、自己免疫疾患を効果的に研究し、ワクチンを開発するには多量の純粋な単離HLAタンパク質が必要である。

【0007】

精製した個々のクラスIおよびクラスII MHCタンパク質が極めて有用である幾つかの応用がある。このような応用としては、疾患耐性/自己免疫の免疫診断試薬としてのMHC-ペプチドマルチマーの使用、潜在的治療ペプチドの結合の評価、ワクチン候補を同定するためのMHC分子からペプチドの溶出、予備形成したMHC特異抗体に対する移植患者のスクリーニング、および患者から抗HLA抗体の除去が挙げられる。各個々は異なるMHC分子を有するので、多数の個々MHC分子の試験が個々間の疾病感染性の差を理解する上での必要条件である。従って、世界の個々群中に存在する数百種類の異なるHL

10

20

30

40

50

Aを代表する精製したMHC分子は、疾病感染性および耐性を解明し、並びにワクチンのような治療薬をデザインする上で極めて望ましい。

【0008】

クラスIHLA分子は、宿主細胞内で疾患に対する免疫応答を警告する。細胞内のウイルスおよび腫瘍特異タンパク質から誘導されるペプチドを細胞の小胞体中のクラスI分子の抗原結合溝に装填した後、細胞表面に運搬する。クラスIHLA分子とその装填したペプチドリガンドが細胞表面にあるときには、クラスI分子およびそのペプチドリガンドは細胞傷害性Tリンパ球(CTL)に接近することができる。CTLはクラスI分子によって提示されたペプチドを精査し、その細胞内の感染性または腫瘍性因子から誘導されるリガンドを収容している細胞を破壊する。

10

【0009】

特異的CTLターゲットは同定されているが、疾病細胞の表面に提示されたリガンドの広さおよび性質についてはほとんど知られていない。基本的な科学的見地から、多くの未解決の疑問がペプチド提示に関する技術に広がっている。例えば、ウイルスは所定の遺伝子座由来のHLAクラスI分子の発現を優先的にブロックし、他の遺伝子座の発現はそのままにすることができることが示されている。同様に、特定の遺伝子座のクラスIHLAを発現することができない癌細胞が多数報告されている。しかしながら、3種類の古典的なHLAクラスI遺伝子座は、それらが結合する免疫調節リガンドについてどのように異なっているか(または異なっているかどうか)について説明しているデータはない。従って、異なる遺伝子座由来のクラスI分子がウイルスおよび腫瘍由来のリガンドとの相互作用およびそれぞれが提示するペプチドの数でどのように変化するかは明らかでない。

20

【0010】

CTL認識についての識別用のウイルスおよび腫瘍特異リガンドは、ワクチンデザインの重要な成分である。腫瘍形成または感染細胞に特有のリガンドを試験して、防御的CTL応答を引き起こすようにデザインされたワクチンに組み込むことができる。幾つかの方法が、現在潜在的に防御的ペプチドリガンドを同定する目的で用いられている。一つの方法では、T細胞系またはクローンを用いて、溶出したペプチドのクロマトグラフィー画分中の生物活性リガンドをスクリーニングする(Cox et al., Science, vol 264, 1994, pages 716-719, この文献の内容は、特にその開示の一部として本明細書に引用されている)。この方法は、癌細胞に特異的なペプチドリガンドの同定に用いられている。第二の手法では、以前に決定されたモチーフおよび/または個々のリガンド配列に基づいて特定のクラスI分子に結合することができるペプチドを同定するためのアルゴリズムによる予測を用いている(De Groot et al., Emerging Infectious Diseases, (7) 4, 2001, この文献の内容は、特にその開示の一部として本明細書に引用されている)。次に、目的とする病原体からの結合の確率が高いことが予想されるペプチドを合成して、前駆体、テトラマーまたはELISpot分析におけるT細胞反応性について試験することができる。

30

【0011】

しかしながら、個々HLA分子の容易に入手可能な供給源はなかった。入手可能なHLAタンパク質の量は少量であり、典型的には異なるHLA分子の混合物からなっていた。HLA分子の製造は、伝統的には複数のHLA分子を発現する細胞の増殖およびリーシスを伴っている。個々数の90%はHLA遺伝子座のそれぞれでヘテロ接合性であり、共優性発現により、それぞれのHLA遺伝子座で発現した複数のHLAタンパク質が生じる。哺乳類細胞から本来のクラスIまたはクラスII分子を精製するには、時間がかかり且つ煩雑な精製方法が必要であり、それぞれの細胞は典型的には多数の表面に結合したHLAクラスIまたはクラスII分子を発現するので、HLA精製は多くの異なるHLAクラスIまたはクラスII分子の混合物を生じる。このようなHLA分子の混合物を用いて実験を行い、または複数の表面に結合したHLA分子を有する細胞を用いて実験を行うと、結果の解釈において異なるHLA分子を直接には識別することができず、任意の特定のHLA

40

50

分子が所定の結果に關与していることを確信することができない。従って、当該技術分野では、實質的な量の個々HLAクラスIまたはクラスII分子を生成し、他のHLAクラスIまたはクラスII分子から独立して容易に精製し、単離することができる方法が求められた。このような個々HLA分子は、十分な量および純度で用意されると、免疫応答の研究および測定の強力な手段となる。

【0012】

従って、当該技術分野では、未感染/非腫瘍細胞から感染/腫瘍細胞を識別する方法を含んでなるクラスIおよびクラスII MHC分子についてのエピトープ検出および比較リガンドマッピングの改良法が求められている。本発明は、可溶性のHLA分子の生成をエピトープ単離、検出および直接比較法と組み合わせることによってこの要望を解決する。

10

【0013】

【発明の具体的説明】

具体例の図面、実験、結果、および実験室の手順によって本発明の少なくとも1つの態様を詳細に説明する前に、本発明はその応用において下記の説明に記載されまたは図面、実験および/または結果に例示されている構成の詳細および成分の配置に限定されないことを理解すべきである。本発明によれば、他の態様が可能であり、あるいは本発明は様々な方法で実施または実行することが可能である。従って、本明細書で用いられる術語は最も広い可能な範囲および意味を与えようとするものであり、態様は例示的であり、限定的なものではないことを意味する。また、本明細書で用いられる表現および用語は説明のためのものであり、限定的なものと考えべきではないことを理解すべきである。

20

【0014】

本発明は、一般的にはエピトープ検出および比較リガンドマッピングの方法、並びに未感染/非腫瘍細胞から感染/腫瘍細胞を識別する方法に関する。本発明の方法は、広義には下記の(1)個々可溶性のクラスIまたはクラスII MHC分子をコードする構造体を含む細胞系(この細胞系は自己または非自己タンパク質をクラスIまたはクラスII MHC分子の抗原結合溝に装填可能なペプチドリガンドに自然処理することができる)を用意し、(2)構造体から個々の可溶性のクラスIまたはクラスII MHC分子を発現させる条件であり、かつ結合するペプチドリガンドを有する可溶性のクラスIまたはクラスII MHC分子が分泌される前に(自己または非自己の処理したタンパク質由来の)ペプチドリガンドをそれぞれの個々の可溶性のクラスIまたはクラスII MHC分子の抗

30

【0015】

本発明の方法は、一態様では、バイオリクターユニットで哺乳類細胞から分泌される(ゲノムDNAまたはcDNA由来の)MHC分子の産生方法を用いることができる。クラスIまたはクラスII MHC分子を改質して、それらを分泌させ、単離し、精製することができるようにすることによって、相当な量の個々のMHC分子が得られる。可溶性のMHC分子の分泌により、産生したMHC分子の量および純度に関する従来技術の不利な点および欠陥が解消される。量の問題は克服され、MHCを産生する細胞を界面活性剤で

40

【0016】

中空繊維バイオリクターユニットでのMHC分子の生産では、従来の液相組織培養によ

50

って許容されるより実質的に高密度で細胞を培養する。MHC分子を分泌する細胞の密集培養により、トランスフェクションしたMHC分子を連続的に収穫する能力がさらに増幅される。MHC分泌細胞系の密集バイオリアクター培養により、高濃度の個々MHCタンパク質を得ることができる。高濃縮の個々のMHCタンパク質には、精製タンパク質の濃度が増加するのでほとんどの下流タンパク質精製法は一層良好に行われるという利点がある。このように、バイオリアクターでのMHC分泌細胞の培養により、個々MHCタンパク質を濃縮形態で連続的に産生することができる。

【0017】

本発明で用いられるMHC分子の産生方法は、所望なMHCクラスIまたはクラスII分子をコードするゲノムまたは相補的DNAを得ることによって開始する。所望なMHC分子をコードする遺伝子座の対立遺伝子は、遺伝子座特異的にPCR増幅される。これらの遺伝子座特異的なPCR生成物は、MHC分子の全コード領域またはその一部を含むことがある。一態様では、ネステドまたはヘミネステドPCRを応用して切断形態のクラスIまたはクラスII遺伝子を産生し、細胞表面に固定されるよりはむしろ分泌されるようにする。もう一つの態様では、PCRにより、直接MHC分子を切断する。

10

【0018】

遺伝子座特異的PCR生成物を哺乳類発現ベクターにクローニングし、様々な方法でスクリーニングして所望なMHC分子をコードするクローンを同定する。クローニングしたMHC分子のDNA配列決定し、PCRの適合性を確保する。次に、所望なMHC分子の忠実な切断クローンを、哺乳類細胞系にトランスフェクションした。このような細胞系を組換えクラスI分子をコードするベクターでトランスフェクションすると、このような細胞系は内生性のクラスIMHC分子の発現を欠くかまたは内生性クラスIMHC分子を発現することがある。当業者であれば、本発明を考慮すれば、内生性のクラスIMHC分子を発現する細胞は、自然な細胞死に際してMHCを自発的に溶液中に放出することの重要性に注目するであろう。この少量の自発的に放出されたMHCが重要である場合には、トランスフェクションしたクラスIMHC分子に「タグを付けて」、これがクラスI分子を発現する細胞における自発的に放出された内生性のクラスI分子から特に精製されるようにすることができる。例えば、HISTEILをコードするDNA断片をPCR反応によってタンパク質に結合させることができ、またはPCR断片がクローニングされるベクターによってコードすることができるので、このようなHISTEILは内生性のクラスI分子からクラスIMHC分子の精製をさらに促進する。ヒスチジンテイルのそばのタグも役立つことが示されており、下流精製のためのタンパク質にタグを付ける当業者であれば、MHC分子を一層容易に精製することができるようなやり方でMHC分子にタグを付ける方法を理解し、知っているであろう。

20

30

【0019】

クローニングしたゲノムDNA断片は、エキソンおよびイントロン、並びに遺伝子の5'および3'末端における他の非翻訳領域を含む。ゲノムDNA(gDNA)をRNAに転写する細胞系にトランスフェクションした後、クローニングしたゲノムDNAはタンパク質生成物を生じ、これによりイントロンを除去しRNAをスプライシングしてメッセンジャーRNA(mRNA)を形成し、これが次にMHCタンパク質に翻訳される。従って、gDNAによってコードされたMHC分子のトランスフェクションは、gDNA、mRNA/cDNA、およびタンパク質の再単離を促進する。昆虫および細菌細胞のような非哺乳類細胞系でのMHC分子の産生には、これらの種類の下等細胞はgDNAクローンから転写されたRNAからイントロンをスプライシングする能力を持たないので、cDNAクローンが必要である。これらの場合に、本発明の哺乳類gDNAトランスフェクタントは、逆転写してMHC cDNAを形成することができるRNAの重要な供給源を用意する。次に、cDNAをクローニングし、細胞に導入した後、タンパク質に翻訳することができる。従って、分泌MHCの産生の他に、このようなgDNAトランスフェクタントはmRNAの容易な供給源、および従ってcDNAクローンを用意し、次にこれを非哺乳類細胞にトランスフェクションしてMHCを産生させることができる。従って、MHCゲノム

40

50

D N A クローンから出発する本発明は、様々な種由来の細胞で M H C を産生することができる。

【 0 0 2 0 】

g D N A から出発することの重要な利点は、目的とする M H C 分子を含む増殖可能な細胞を必要としないことである。個々群中の総ての個々は異なる M H C レパートリーを有するので、所望な個々と同一の M H C 補体を有するものを見出すには 5 0 0 0 0 0 種類を上回る個々を検索する必要がある、この原理の実際的な例は骨髄移植のための被移植者に適合するドナーを見出そうとするときに見られる。従って、実験または診断で用いるための特定の M H C 分子を産生させることが所望なときには、目的とする M H C 対立遺伝子を発現するヒトまたは細胞を最初に同定する必要がある。あるいは、本発明の方法では、g D N A を単離するには、唾液試料、毛根、古いフリーザー試料、または 1 m L 未満 (0 . 2 m L) の血液が必要だけである。次に、g D N A から出発して、目的とする M H C 分子を本明細書に記載の g D N A クローンを介して得ることができ、このようなクローンを哺乳類細胞にトランスフェクションした後、所望なタンパク質を直接哺乳類細胞に、または本明細書に記載の本発明の方法を用いて幾つかの種の細胞の c D N A から産生させることができる。

10

【 0 0 2 1 】

タンパク質発現の M H C 対立遺伝子を得るための現在の実験は、典型的には m R N A から出発し、これは目的とする M H C 分子を発現する哺乳類細胞の新鮮な試料を必要とする。g D N A からの作業は、遺伝子発現または新鮮な生物学的試料を必要としない。R N A は本質的に不安定であり、g D N A のように容易には得られないことに留意することが重要である。従って、c D N A クローンから出発する特定の M H C 分子の産生が所望なときには、R N A を得る目的で目的とする対立遺伝子が発現するヒトまたは細胞系を伝統的には最初に同定しなければならない。次に、血液または細胞の新鮮な試料を得なければならないが、本発明の方法を用いる実験は、3 日経過未満の血液 5 m L が M H C の c D N A 合成に十分な R N A を得るのに必要であることを示している。従って、g D N A から出発することによって、容易に産生することができる M H C 分子の幅は広がる。これは M H C 系程度の多型の系において重要な因子であり、数百の M H C 分子が存在するが、総ての M H C 分子が容易に利用可能であるというものではない。このことは、特に孤立した個々群に特有の M H C 分子または少数民族に特有の M H C 分子については真実である。ゲノム D N A の点からクラス I またはクラス I I M H C 分子発現を開始すると、目的とする遺伝子の単離が簡単になり、研究用の M H C 分子を産生する一層公正な手段が確保されるが、そうでなければ、どの M H C 分子を研究用に選択し、および選択しないかの決定、並びに新鮮な試料を得ることができず従って診断分析にそれらの M H C 分子を含めるべきではない民族個々群の決定を行うことが残される。

20

30

【 0 0 2 2 】

c D N A を出発材料としてのゲノム D N A の代わりに用いることができるが、所望な H L A クラス I のそれぞれについての c D N A の産生には、数百種類の異なる H L A 型の増殖可能な細胞系であって、それぞれが異なる種類の H L A クラス I を発現するものが必要である。あるいは、様々な所望な M H C 型を有する個々からの新鮮な試料が必要である。ゲノム D N A を出発材料として用いると、増幅工程を再結合および遺伝子転換を模倣するように操作することができるので、単一のゲノム D N A 配列から多くの H L A 分子のクローンを産生できる。幾つかの突然変異誘発法があり、これによって、所定のクラス I g D N A クローンを g D N A のレベルでまたはこの g D N A クローンから生成する c D N A のレベルで改質することができる。本発明で用いられる M H C 分子を産生する方法は増殖可能な細胞を必要とせず、従って R N A を悩ませる減成は問題とはならない。

40

【 0 0 2 3 】

本明細書に記載の方法によって産生した可溶性のクラス I M H C タンパク質を、本発明のエピトープ検出および比較リガンドマッピングの方法に利用する。分泌個々 M H C 分子を用いる本明細書に記載のエピトープ検出および比較リガンドマッピングの方法は、多数の

50

膜結合 M H C を発現する細胞由来の M H C を用いる従来の技術と比較して幾つかの利点を有する。従来技術による方法は細胞の表面上にエピトープが存在するかどうかを識別することができるが、この従来技術による方法はペプチドエピトープが結合している特異的な M H C 分子を直接識別することはできない。長たらしい精製工程を用いて、単一の M H C 分子を試験し、得ることができるが、このようなことを行うと得られるタンパク質の量および有用性が限定される。本発明の新規性および柔軟性は、組換え体の可溶性 M H C タンパク質を用いることによって個々の M H C 特異性を十分な量で用いることができることである。

【 0 0 2 4 】

クラス I およびクラス II M H C 分子は、実際には 鎖、 鎖および / 鎖のペプチドカーゴ（すなわち、ペプチドリガンド）からなる三分子複合体であって、細胞表面上で免疫エフェクター細胞に提示されるものである。これはペプチドカーゴであり、M H C および 鎖ではなく、細胞に感染、腫瘍形成性、または罹患のマークを付けるので、特定の M H C 分子に結合したペプチドリガンドを同定し、特性決定する大きな必要がある。例えば、このようなペプチドリガンドの特性決定により、M H C 随伴糖尿病の患者によって提示されるペプチドが糖尿病耐性と関連した M H C 分子によって提示されるペプチドとどのように異なるかの決定が著しく促進される。上記のように、個々 M H C 分子を十分に供給し、従って M H C 分子が結合したペプチドは、このような疾患の研究手段を提供する。本発明の方法により以前は得られなかった多量の M H C タンパク質が提供されるので、M H C 分子およびそれらの重要なペプチドカーゴの前例のない研究を促進することができる。

【 0 0 2 5 】

従って、本発明は、疾病または非疾病状態の M H C 分子によって提示される特有のエピトープによって感染 / 腫瘍細胞を未感染 / 非腫瘍細胞から識別するのに用いることができるエピトープ検出および比較リガンドマッピングの方法にも関する。

【 0 0 2 6 】

ゲノム DNA (g D N A) から s H L A 分子の作製

1 . ゲノム DNA 抽出

2 0 0 μ L の血液、血漿、血清、パフコート、体液試料、または 5×10^6 個までのリンパ球 / 2 0 0 μ L リン酸緩衝食塩水を用い、Q I A a m p ^(商品名) D N A B l o o d M i n i K i t 血液および体液スピンプトコールを用いてゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA の品質および量は、2 6 0 n m および 2 8 0 n m での光学濃度の読みを用いて評価した。

【 0 0 2 7 】

2 . 1 P C R 法

二段階 P C R 法を用いてヒトクラス I M H C の切断体を増幅するため、プライマーを H L A - A 、 - B および - C 遺伝子座についてデザインした。第一段階の P C R では、5 ' 未翻訳領域からイントロン 4 までを増幅するプライマーセットを用いる。このアンプリコンは、エキソン 4 に陣取る 3 ' プライマーを用いることによって M H C クラス I 遺伝子の切断体を生じる第二の P C R の鋳型として用いられ、5 ' プライマーは最初の P C R と同一である。概観を、図 1 に見ることができる。それぞれの遺伝子座についてのプライマーを表 I に示す。異なる H L A - B 遺伝子座の対立遺伝子は、対立遺伝子のヌクレオチド配列によって異なる制限切断部位を有するプライマーを必要とする。従って、- B 遺伝子座には、2 個の 5 ' および 2 個の 3 ' 切断プライマーがある。

【 0 0 2 8 】

【 表 1 】

表 I

| プライマーの名称 | 配列 5'→3' | 遺伝子座 | 切断部位 | アニーリング部位 | 配列番号 |
|----------|--|---------|---------|----------|------|
| PP5UTA | GCGCTCTAGACCCAGACCGCCGAGGATGGCC | A | XbaI | 5UT | 1 |
| 3PPI4A | GCCCTGACCCCTGCTAAAGGT | A | | イントロン4 | 2 |
| PP5UTB | GCGCTCTAGACCCAGACCGCCGAGGATGGCC | B | XbaI | 5UT | 3 |
| 3PPI4B | TGCTTTCCCTGAGAGAGAT | B | | イントロン4 | 4 |
| 5UTB39 | AGGGAAATCCAGAGTCTCCTCAGACGGC | B*39 | EcoRI | 5UT B39 | 5 |
| 5PKCE | GGGGAAATCCCGCCGCCACCATGCGGGTCAATGGCGCC | C | EcoRI | 5UT | 6 |
| 3PPI4 | TTCTGCTTTCTGAGAGAGAC | C | | イントロン4 | 7 |
| PP5UT | GGGGAAATCCCGCCGCCACCATGCGGGTCAATGGCGCC | B | EcoRI | 5UT | 8 |
| PP3PEI | CCGGAAATCTCATCTCAGGGTGAGGGGCT | A, B, C | EcoRI | エキソン4 | 9 |
| PP3PEII | CCGCAAGCTTTTCATCTCAGGGTGAGGGGCT | A, B, C | HindIII | エキソン4 | 10 |
| 3PEIHC7 | CCGCAAGCTTTTCAGCTCAGGGTGAGGGGCT | Cw*07 | HindIII | エキソン4 | 11 |

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

2 . 2 一 次 P C R

材料 :

総てのPCRに、Eppendorf Gradient Mastercyclerを用いる。(1) H₂O: 脱イオン限外濾過水(DIUF) Fisher Scientific, W2-4, 41。(2) PCRヌクレオチドミックス(10mMのそれぞれデオキシリボヌクレオシド三リン酸[dNTP]), Boehringer Mannheim

, #1814, 362。(3) 10× Pfx 増幅緩衝液, pH9.0, Gibco BRL (登録商標), 部品番号52806, 処方の特許登録情報である。(4) 50mM MgSO₄, Gibco BRL (登録商標), 部品番号52044。(5) Platinum (登録商標) Pfx DNAポリメラーゼ (B遺伝子座のみ), Gibco BRL (登録商標), 11708-013。(6) Pfu DNAポリメラーゼ (AおよびC遺伝子座), Promega, M7741。(7) MgSO₄を含むPfu DNAポリメラーゼ 10×反応緩衝液、200mM Tris-HCl, pH8.8, 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgSO₄, 1mg/mLヌクレアーゼ不含BSA, 1% Triton (登録商標) X-100。(8) 増幅プライマー (ng/μL) (表I参照): A遺伝子座: 5'センスPP5UTA (300) ; 3'アンチセンスPPI4A (300); B遺伝子座 (B*39ではない): センスPP5UTB (300); アンチセンスPPI4B (300); B遺伝子座 (B*39): センス5UTB39 (300); アンチセンスPPI4B (300); C遺伝子座: センス5PKCE (300); アンチセンスPPI4C (300)。(9) gDNA 鋳型。

【0030】

2.3 二次PCR (コロニーPCRにも使用)。(1) H₂O: 脱イオン限外濾過水 (DIUF) Fisher Scientific, W2-4, 41。(2) PCRヌクレオチドミックス (10mMのそれぞれデオキシリボヌクレオシド三リン酸 [dNTP]), Boehringer Mannheim, #1814, 362。(3) Pfu DNAポリメラーゼ (AおよびC遺伝子座), Promega, M7741。(4) MgSO₄を含むPfu DNAポリメラーゼ 10×反応緩衝液、200mM Tris-HCl, pH8.8, 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgSO₄, 1mg/mLヌクレアーゼ不含BSA, 1% Triton (登録商標) X-100。(5) 増幅プライマー (ng/μL) 表I参照: A-遺伝子座: 5'センスPP5UTA (300), 3'アンチセンスPP3PEI (300); B-遺伝子座: センスPP5UTB (300), アンチセンスPP3PEI (300); B-遺伝子座: センスPP5UT (300), アンチセンスPP3PEIH (300); B-遺伝子座 B39: センス5UTB39 (300), アンチセンスPP3PEIH (300); C-遺伝子座: センス5PKCE (300), アンチセンスPP3PEI (300); C-遺伝子座 Cw*7': センス5PKCE (300), アンチセンス3PEIHC7 (300)。(6) 鋳型一次PCR生成物の1:100希釈。

【0031】

2.4 PCR生成物およびベクターのゲル精製

(1) Dark Reader Transilluminator Model DR-45M, Clare Chemical Research。(2) SYBR Green, Molecular Probes Inc。(3) Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns, Bio-Rad Laboratories, 732-6165。

【0032】

2.5 制限消化、連結反応および形質転換。

(1) New England Biolabs製の制限酵素: (a) EcoRI #R0101S; (b) HindIII #R0104S; (c) XbaI #R0145S。(2) T4DNAリガーゼ, New England Biolabs, #M0202S。(3) pcDNA3.1(-), Invitrogen Corporation, V795-20。(4) 10×New England Biolabs製緩衝液: (a) EcoRI緩衝液, 500mM NaCl, 1000mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 0.25% Triton-X 100, pH7.5; (b) T4 DNAリガーゼ緩衝液, 500mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP, 250μg/mL BSA, pH7.5; (c) NEB緩衝

液 2, 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DDT, pH 7.9。(5) 100×BSA, New England Biolabs。(6) Z-Competent E. coli Transformation Buffer Set, Zymo Research, T3002。(7) E. coli 菌株 JM109。(8) 100 μg/mL アンピシリンを含む LB プレート。(9) 100 μg/mL アンピシリンを含む LB プレート。

【0033】

2.6 プラスミド抽出。

Wizard Plus SV minipreps, Promega, #A1460。

【0034】

2.7 クローンの配列決定。

(1) Thermo Sequenase プライマー Cycle Sequencing Kit, Amersham Pharmacia Biotech, 25-2538-01。(2) CY5 標識 プライマー (表 II 参照)。(3) AlfExpress 自動 DNA シークエンサー, Amersham Pharmacia Biotech。

【0035】

【表 2】

表 II

| プライマーの名称 | 配列 5'→3' | 配列番号 |
|----------|----------------------|------|
| T7Prom | TAATACGACTCACTATAGGG | 12 |
| BGHrev | TAGAAGGCACAGTCGAGG | 13 |
| PPI2E2R | GTCGTGACCTGGCCCC | 14 |
| PPI2E2F | TTTCATTTTCAGTTAGGCCA | 15 |
| ABC13E4F | GGTGTCCCTGTCCATTCTCA | 16 |

10

20

30

【0036】

2.8 ゲルキャスティング。

(1) PagePlus 40%濃縮物, Amresco, E562, 500mL。 (40
 2) 尿素, Amersham Pharmacia Biotech, 17-0889-01, 500g。(3) 3-N-N-N-N-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED), APB。(4) 過硫酸アンモニウム(10%溶液), APB。(5) ホウ酸, APB。(6) EDTA-二ナトリウム塩, APB。(7) Tris, APB。(8) Bind-Saline, APB。(9) イソプロパノール, Sigma。(10) 氷酢酸, Fisher Biotech。(11) DIUF水, Fisher Scientific。(12) EtOH 200-検定品。

【0037】

2.9 電気穿孔用のプラスミド調製。Qiagen Plasmid Midiキット, Qiagen Inc., 12143。

50

【0038】

3.0 電気穿孔。(1) キャパシタンスエキステンダーを含むBiorad Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories。(2) Gene Pulser Cuvette, Bio-Rad Laboratories。(3) Cytomix: 120mM KCl, 0.15mM CaCl₂, 10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH7.6, 25mM Hepes, pH7.6, 2mM EGTA, pH7.6, 5mM MgCl₂, pH7.6 (KOHを含む)。(4) RPMI 1640 + 20% 子牛胎児血清 + Pen/strep。(5) 血球計。(6) 光学顕微鏡。(7) CO₂ 37°インキュベーター。(8) 対数期の細胞。

【0039】

【表3】

一次PCR

c. A-遺伝子座およびC-遺伝子座

| | | |
|-----------------------|---------|----|
| 10 × Pfu緩衝液 | 5 μL | |
| 5'プライマー (300 ng/μL) | 1 μL | |
| 3'プライマー (300 ng/μL) | 1 μL | |
| dNTP (それぞれ10 mM) | 1 μL | |
| gDNA (50 ng/μL) | 10 μL | 10 |
| DIUF H ₂ O | 31.4 μL | |
| PfuDNAポリメラーゼ | 0.6 μL | |

96℃ 2分。

| | |
|--------|--------|
| 95℃ 1分 | } × 35 |
| 58℃ 1分 | |
| 73℃ 5分 | |

d. B-遺伝子座

| | | |
|---------------------------|--------|----|
| 10 × Pfx緩衝液 | 5 μL | |
| 5'プライマー (300 ng/μL) | 1 μL | |
| 3'プライマー (300 ng/μL) | 1 μL | |
| dNTP (それぞれ10 mM) | 1.5 μL | |
| MgSO ₄ (50 mM) | 1 μL | |
| gDNA (100 ng/μL) | 1 μL | 30 |
| DIUF H ₂ O | 40 μL | |
| PfxDNAポリメラーゼ | 0.5 μL | |

94℃ 2分。

| | |
|----------|--------|
| 94℃ 1分 | } × 35 |
| 60℃ 1分 | |
| 68℃ 3.5分 | |

68℃ 5分

10

20

30

40

【0040】

PCRのゲル精製 (総てのPCRおよびプラスミドゲル精製する)

一次PCRを1 × SYBRグリーン5 μLと混合し、室温にて15分間インキュベーションした後、1%アガロースゲル上に装填する。Dark Reader上で可視化し、Quantum Prep FreezeおよびSqueeze抽出キットを用いて製造業者の指示に従って精製する。

【0041】

【表4】

二次PCR

A、BおよびC遺伝子座

| | | |
|-----------------------|---------|----|
| 10× Pfu緩衝液 | 5 μL | |
| 5'プライマー (300 ng/μL) | 0.5 μL | |
| 3'プライマー (300 ng/μL) | 0.5 μL | |
| dNTP (それぞれ10 mM) | 1 μL | |
| 1 : 100 1° PCR | 10 μL | 10 |
| DIUF H ₂ O | 37.5 μL | |
| PfuDNAポリメラーゼ | 0.5 μL | |

96℃ 2分.

95℃ 1分

58℃ 1分

73℃ 4分

73℃ 7分

} × 35

20

制限消化

| | | |
|-----------------------|---------|--|
| 2° PCR (ゲル精製) | 30 μL | |
| 制限酵素2 | X μL | |
| 10×緩衝液 | 5 μL | |
| 100×BSA | 0.5 μL | |
| DIUF H ₂ O | 10.5 μL | |

30

用いた酵素は、それぞれ個々のPCRについてPCRプライマーに組込まれた切断部位によって決定される。発現ベクターpcDNA3.1(-)を、同様の方法で切断する。

【0042】

連結反応

| | | |
|-------------------------|---------|----|
| PcDNA3.1(-) PCRと同じ酵素で切断 | 50 ng | |
| PCR切断 | 100 ng | |
| 10×T4DNAリガーゼ緩衝液 | 2 μL | |
| T4DNAリガーゼ | 1 μL | |
| DIUF H ₂ O | 20 μLまで | 40 |

【0043】

形質転換

Z-コンピテントE. coli Transformation KitおよびBuffer Setを用いて作製したコンピテント細胞を用いてJM109を形質転換し、製造業者の指示に従う。

【0044】

コロニーPCR

これは任意の形質転換細胞におけるインサートについてチェックする。二次PCRについてと同じプロトコールに従う。

【0045】

50

インサートを有するコロニーのミニ調製

Wizard Plus SVミニ調製を用い、製造業者の指示に従う。抽出プロトコールを開始する前に、グリセロールストックを作製する。

【0046】

【表5】

陽性クローンの配列決定

Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kitを用いる。

A, C, GまたはTミックス 3 μ L

CY5プライマー 1 pm/ μ L 1 μ L

DNA鋳型 100 ng/ μ L 5 μ L

96°C 2分

96°C 30秒 } $\times 25$

61°C 30秒 }

10

6 μ Lのホルムアミド装填緩衝液を加え、10 μ Lをシーケンシングゲルに装填する。ミスインコーポレーション (misincorporation) のない良好なクローンについて配列分析する。

20

【0047】

ミディ調製

Qiagen Plasmid Midi Kitを用い、製造業者の指示に従って電気穿孔用プラスミドを調製する。

【0048】

電気穿孔

電気穿孔は、「HLA-B分子のBw4という有名なエピトープは、推定的HLA受容体であるNKb1を発現する天然のキラー細胞クローンとの反応性を付与する。Gumpertz, J. E., V. Litwin, J. H. Phillips, L. L. Lanier and P. Parham. J. Exp. Med. 181: 1133-1144, 1995, 上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている」に記載されている通りを行う。

30

【0049】

可溶性HLAの産生のためのスクリーニング

ELISAを用いて、可溶性のHLAの産生についてスクリーニングする。生化学分析には、同型のモノクローナル抗体がHLA遺伝子座産物およびそれらのサブタイプの同定に特に有用である。

【0050】

W6/32は、ヒトクラスI主要組織適合性複合体(MHC)分子を特性決定するのに用いられる最もありふれたモノクローナル抗体(mAb)の一つである。これは、HLA-A、-Bおよび-C HC上の同型決定基に対して指定され、成熟したクラスI分子複合体のみを認識し且つ 2-マイクログロブリン(2m)と重鎖(HC)を含む完全なMHC分子上でコンホメーションエピトープを認識する。W6/32は、2mの残基3と重鎖の残基121を両方とも含むクラスI分子上のコンパクトエピトープに結合する(Ladasky J J, Shum B P, Canavez F, Seuanez H N, Parham P. 2-マイクログロブリンの残基3はW6/32抗体によるクラスI MHC分子の結合に影響を与える。Immunogenetics April 1999; 49(4): 312-20.)。分子W6/32の定常部分は、CTLによって認識されるので、細胞傷害性を抑制することができる。W6/32の反応性はヒト 2-マ

40

50

イクログロブリンのアミノ末端に感受性である (Shields M J , Ribaud o R K . モノクローナル抗体 W 6 / 3 2 のマッピング : 2 - マイクログロブリンのアミノ末端に対する感受性。 Tissue Antigens May 1998 ; 51 (5) : 567 - 70) 。 H L A - C は W 6 / 3 2 による免疫沈澱では明確に同定することはできず、 H L A - C 遺伝子座産物が b 2 m とごく弱く会合している可能性があることを示唆しており、 H L A - C 抗原の生化学的研究で見られる問題点の幾つかを説明している [Stam , 1986 # 1] 。 C - 遺伝子座産物と相関するポリペプチドは W 6 / 3 2 よりは H C - 1 0 によって遙かに良好に認識され、 C 産物の少なくとも幾つかは H L A - A および - B よりも弱く b 2 m と会合していることがあることが確かめられる。 W 6 / 3 2 は利用可能なビオチン化 (Serotec MCA81B) であり、 E L I S A 法でさらに変法を提供する。 10

【 0 0 5 1 】

H C - 1 0 は、ほとんど総ての H L A - B 遺伝子座不含重鎖と反応性である。 A 2 重鎖は、 H C - 1 0 によって極めて弱くしか認識されない。さらに、 H C - 1 0 は、数種類の H L A - A 遺伝子座重鎖としか反応しない。さらに、 H C - 1 0 は、 H L A - C 型の遊離の重鎖と良好に反応すると思われる。 H C - 1 0 と重鎖 / b 2 m 複合体との反応性についての証拠は得られていない。 H C - 1 0 を用いて得た免疫沈澱生成物のいずれにも、 b 2 m は含まれていなかった [Stam , 1986 # 1] 。これは、 H C - 1 0 が、 2 m との相互作用に関与する部分を含む H L A クラス I 重鎖の部位に対して指定されていることを示している。 H C - 1 0 で沈澱した材料のパターンは、定性的には W 6 / 3 2 を用いて単離したものと異なっている。 20

【 0 0 5 2 】

T P 2 5 . 9 9 は、 H L A - A B C の 3 ドメインにおいて決定基を検出する。これは、変性 H L A - B (Western) 並びに部分的にまたは完全に折り畳まれた H L A - A , B , および C に見られている。これはペプチドまたは 2 m を必要とせず、すなわちペプチドなしで折り畳める 3 ドメインを処理する。これにより、 H C 決定に有用となる。

【 0 0 5 3 】

抗ヒト 2 m (H R P) (D A K O P 0 1 7 4) は、変性および複合 2 m を認識する。原則的には抗 - 2 m 試薬は H L A 分子の同定に用いることができるが、それらは重鎖と 2 m の会合が弱いときには余り適当でない。 W 6 / 3 2 および抗 - 2 m を用いて沈澱したクラス I 分子のパターンは、通常は識別不能である [Vasilov , 1983 # 10] 。 30

【 0 0 5 4 】

ウサギ抗 - 2 - マイクログロブリンは、結合の結果として重鎖から 2 - マイクログロブリンを解離する (Rogers , M . J . , Appella , E . , Pierotti , M . A . , Invernizzi , G . , and Parmiani , G . (1979) Proc Natl . Acad . Sci . U . S . A . 76 , 1415 - 1419) 。ウサギ抗ヒト 2 - マイクログロブリンは、結合時に H L A 重鎖から 2 - マイクログロブリンを解離する (Nakamuro , K . , Tanigaki , N . , and Pressman , D . (1977) Immunology 32 , 139 - 146 .) 。この抗 - ヒト 2 m 抗体も、非接合体で入手可能である (D A K O A 0 0 7 2) 。 40

【 0 0 5 5 】

W 6 / 3 2 - H L A サンドイッチ E L I S A 。サンドイッチ分析法を用いて、多数の態様のタンパク質複合体を研究することができる。抗体をヘテロポリマーの様々な成分に利用可能であるときには、二抗体分析法をデザインして、複合体の存在について試験することができる。これらの分析法の変法を用いて、所定の抗原がマルチマー性であるかどうかをモノクローナル抗体を用いて試験することができる。同じモノクローナル抗体を固相およびラベルの両方に用いるときには、モノマー性抗原を検出することができない。しかしながら、このような組合せでは、抗原のマルチマー形態を検出することができる。これらの 50

分析法では、好ましくない立体的位置に固定されたマルチマー性抗原およびモノマー性抗原のいずれによっても、陰性な結果が得られることがある。

【 0 0 5 6 】

W 6 / 3 2 - 抗 - 2 m 抗体サンドイッチ分析法は、s H L A の存在および量を決定するための最善の手法の一つである。二抗体サンドイッチ分析法は迅速且つ正確であり、純粋な抗原の供給源が入手可能であるときには、この分析法を用いて未知試料中の抗原の絶対量を測定することができる。この分析法には、抗原上の非重複エピトープに結合する2種類の抗体が必要である。この分析法は、タンパク質複合体の多数の態様の研究に特に有用である。

【 0 0 5 7 】

抗原 (s H L A) を検出するため、マイクロタイターのウェルに特異 (捕獲) 抗体 W 6 / 3 2 をコーティングした後、抗原を含む試験溶液と共にインキュベーションする。未結合抗原を洗浄し、H R P に接合した異なる抗原に特異的な抗体 (抗 - 2 m) を加え、さらにインキュベーションを行う。未結合接合体を洗浄し、基質を加える。さらにインキュベーションした後、基質の加水分解度を測定する。加水分解した基質の量は、試験溶液中の抗原の量に比例する。

【 0 0 5 8 】

この手法の主な利点は、抗原を使用する前に精製する必要がなく、この分析法が極めて特異的であることである。分析法の感度は、4個の因子 (1) 捕獲抗体の数、(2) 捕獲抗体の抗原に対する親和性、(3) 第二の抗体の抗原に対する親和性、(4) 標識した第二の抗体の特異活性によって変化する。

【 0 0 5 9 】

E L I S A プロトコール鑄型用いて、透明な96穴のポリスチレン分析プレートを標識する。ポリスチレンは、通常はマイクロタイタープレートとして用いられる。(これは半透明でないので、プレートリーダーによって定量を行う酵素分析法を、P V C プレートではなくポリスチレンで行うべきである)。

【 0 0 6 0 】

W 6 / 3 2 のコーティングを、T r i s 緩衝食塩水 (T B S) , p H 8 . 5 で行う。特異的 W 6 / 3 2 抗体を T B S (p H 8 . 5) に溶解した $8.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ のコーティング溶液を調製する。(- 20 で保管し、濃度 $0.2 \text{mg} / \text{mL}$ および容積 1mL の青色試験管製剤であり、試験管当たり 0.2mg を生じる)。

【 0 0 6 1 】

表 I I I

| プレートの数 | 全容積 | W 6 / 3 2 抗体 | T B S , p H 8 . 5 |
|--------|---------|-----------------------|-------------------|
| 1 | 1 0 m L | 4 0 0 μL | 9 . 6 m L |
| 2 | 2 0 m L | 8 0 0 μL | 1 9 . 2 m L |
| 3 | 3 0 m L | 1 2 0 0 μL | 2 8 . 8 m L |
| 4 | 4 0 m L | 1 6 0 0 μL | 3 8 . 4 m L |
| 5 | 5 0 m L | 2 0 0 0 μL | 4 8 . 0 m L |

【 0 0 6 2 】

これはマイクロタイタープレートの容量を十分に上回っているが、結合は一層速やかに起こる。濃度が高くなれば、抗原のポリスチレンへの結合スピードが上がるが、プラスチックの容量は約 $100 \text{ng} / \text{ウェル}$ ($300 \text{ng} / \text{cm}^2$) に過ぎず、余剰タンパク質は結合しない。(未知組成または濃度の W 6 / 3 2 を用いるときには、固定した高濃度の標識抗原に対してプレートをコーティングするのに必要な標準抗体溶液の量を滴定する。値をプロットし、強いシグナルを生じる最低レベルを選択する。西洋ワサビペルオキシダーゼを検出に用いるときには、いずれの溶液にもアジ化ナトリウムを加えない)。

【 0 0 6 3 】

マイクロタイタープレートにウェル当たり $100 \mu\text{L}$ の抗原溶液をマルチチャンネルピペットを用いて直ちにコーティングする。タンパク質をプラスチックと単にインキュベシ

10

20

30

40

50

オンするときには、標準ポリスチレンが抗体または抗原に結合する。タンパク質を固定する結合は非共有的であるが、相互作用の正確な型は知られていない。プレートを振盪して、抗原溶液がそれぞれのウェルの底に均一に分布するようにする。プレートをプレートシーラー（シールプレート（seal plate）接着シールフィルム，非滅菌，ユニット当たり100；Phoenix；LMT-Seal-EX）またはシーリングテープNunc-Immuno（登録商標）Modules（#236366）でシールする。4

で一晩インキュベーションする。界面活性剤および異種タンパク質は用いない。翌日、液体を流し、または適当な廃棄物容器に払い落としてウェルの内容を除く。プレートを逆さまにして清浄な紙タオルにプロットすることによって、溶液を最後の痕跡まで除く。それぞれの段階で液体を完全に除去することは、実験を良好に行う上で本質的なことである。

10

【0064】

マルチチャンネルELISA洗浄装置を用いて、プレートをWash Buffer（0.05% Tween-20を含むPBS）で10回洗浄する。最後の洗浄の後、プレートを逆さまにして清浄な紙タオルにプロットすることによって、残っているWash Bufferを除去する。W6/32を結合した後、プレートの残っている部位は3%BSA/PBSから作製したブロッキング緩衝液とインキュベーションすることによって飽和しなければならない。ウェルに200 μ Lのブロッキング緩衝液を満たす。プレート接着ストリップで覆い、4で一晩インキュベーションする。あるいは、室温で少なくとも2時間インキュベーションを行うが、これは標準的手続きではない。ブロックしたプレートは、4で少なくとも5日間保管することができる。良好なピペット採取の実施は、信頼性のある定量的結果を得るために極めて重要である。チップは、ピペット自身と同様に系の一部として重要である。それらが不良品質のものであったり、または正確にフィットしないものであれば、最良のピペット採取を行っても満足な結果は得られない。ピペットの操作位置は、常に垂直である。そうでなければ、吸引される液体が多くなりすぎる。浸漬深度は、数ミリメートルに止めるべきである。ピペット採取ボタンを徐々に引っ込めて、充填操作を観察する。チップに動揺が発生してはならず、さもなければ、エアゾールが形成されガスが溶液から発生する危険がある。

20

【0065】

最高水準の精度が求められるときには、プレウエットングを総ての場合に用いるべきである。これを行うため、要求された設定容積を最初に同一チップを用いて1または2回吸引した後に、戻す。3%BSAのようなさらに困難な液体では、プレウエットングが絶対に必要である。採取した試料を既にある溶液と十分に混合しようとするときには、プレウエットングを行わない。しかしながら、10 μ Lを上回る容積についてのみプレウエットングを行う。容積が10 μ L未満のピペットの場合には、器具をデザインし調節するときに、残留液体フィルムを原則として考慮する。チップは、個々の試料毎に取り換えなければならない。容積が<10 μ Lのときには、液体をゆっくり吸引するように留意しなければならない。さもなければ、試料は発生した摩擦熱によってかなり暖められることになる。次に、外側にくっついている滴を拭き取る必要があるときには、チップを液体から徐々に引き上げる。

30

40

【0066】

設定容積を分配するには、チップを僅かな確度に固定し、最初に停止するまで均一に押し下げる。界面張力の影響を少なくするため、液体を分配するときには、チップを容器の側に接触させるべきである。液体を計量ストロークで排出した後、短時間を置いて、チップの内側を流下する液体が下端に集まるようにする。次に、第二の停止位置まで速やかに押し下げ、残留液体を噴出させることができる延長ストロークでチップが噴出させる。問題がない（例えば、水溶液）場合には、これによって設定容積が迅速且つ実質的に完全に排出される。さらに困難な場合には、延長ストロークを指導させる前の排出を一層ゆっくりして且つ間を一層長くすることによって容易になる。抗原（sHLA）の絶対量を決定するため、試料の値を標準曲線における純粋な未標識抗原の既知量を用いて得たものと比較

50

する。

【0067】

正確な定量のために、総ての試料を3回測定しなければならず、標準抗原 - 希釈シリーズをそれぞれのプレートに入れるべきである。ピペット採取は、遅延なく行い、試料間のインキュベーション時間の差をできるだけ少なくすべきである。総ての希釈は、ブロッキング緩衝液中で行うべきである。例えば、均質な抗原ストックを3% BSAに溶解したものをPBSブロッキング緩衝液で連続希釈することによって標準抗原 - 希釈シリーズを調製する。試験試料中の抗原の量を測定するために、標準抗原 - 希釈シリーズは結合の動的範囲のほとんどに及ぶ必要がある。この範囲は、5 ~ 100 ng sHLA / mLである。ストック溶液 E 1 µg / mLを調製し、300 µLずつの容積に分け、4 で保管する。このときに、50 mLバッチの標準を調製する。(新たなバッチは、定量に使用する前に、古いバッチと比較する必要がある。)

10

【0068】

標準ストック溶液 E の試験管を用いて、連続希釈を調製する。試験試料中の抗原の量を正確に測定するには標準曲線が必要であるが、それらは定性的な「有無」の判定には必要ない。正確な定量には、sHLAを含む試験溶液を少なくとも4回の希釈にわたって分析し、標準曲線の範囲内にあるようにすべきである。それぞれの抗原試験溶液をブロッキング緩衝液で連続希釈したものを調製する(3% BSA / PBS)。混合した後、使い捨てのU型底の96穴マイクロタイタープレートで総ての希釈物を調製した後、それらをW6 / 32をコーティングしたプレートにマルチピペットで加える。150 µLを、それぞれのウェルに加える。さらに処理を行うため、残っているブロッキング緩衝液を完全に除去し、プレートを上記の通りに洗浄する。これで、プレートは試料を添加する準備が整っている。sHLAを含む試験溶液および標準抗原希釈物100 µLを、抗体をコーティングしたウェルに加える。

20

【0069】

プレートを接着ストリップで覆い、室温で正確に1時間インキュベーションする。インキュベーションの後、未結合抗原を、プレートを上記の通りにWash Buffer (0.05% Tween - 20を含むPBS)で10回洗浄することによって除去する。適当な展開試薬を調製して、sHLAを検出する。第二の特異抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)に接合した抗 - ヒト 2 m - HRP (DAKO P0174 / 0.4 m g / mL)を用いる。抗 - ヒト 2 m - HRPを、3% BSA / PBSで1 : 1000の比に希釈する。(西洋ワサビペルオキシダーゼを検出に用いるときには、いずれの溶液にもアジ化ナトリウムを加えない。)

30

【0070】

表IV

| プレートの数 | 全容積 | 抗 - 2 m - HRP 抗体 | 3% BSA / PBS |
|--------|-------|------------------|--------------|
| 1 | 10 mL | 10 µL | 10 mL |
| 2 | 20 mL | 20 µL | 2 mL |
| 3 | 30 mL | 30 µL | 30 mL |
| 4 | 40 mL | 40 µL | 40 mL |
| 5 | 50 mL | 50 µL | 50 mL |

40

【0071】

第二の抗体希釈物100 µLをそれぞれのウェルに加える。総ての希釈は、ブロッキング緩衝液中で行うべきである。新たな接着ストリップで覆い、室温で20分間インキュベーションする。洗浄段階の前に適量の基質を調製する。基質を室温にする。

【0072】

OPD (o - フェニレンジアミン) は、ELISA法で用いるのに適したペルオキシダーゼ基質である。この基質は、黄色の可溶性最終生成物を生成する。OPD反応を3N H₂SO₄で停止し、橙褐色生成物を生成し、492 nmで読み取る。OPDを新たに錠剤から調製する(Sigma, P6787; 2 mg / 錠剤)。固形錠剤は、少量の基質が

50

表 V

| 配列 | 配列番号 |
|--|------|
| HLA5UT GGCGTTCGACGGACTCAGAAT CTCCCCAGACGCCGAG | 17 |
| 5UTA GGCGTTCGACGGACTCAGAAT AGGATGGCC | 18 |
| 5PXI GGGCTCTAGAGGACTCAGAAT CTCCCCAGACGCCGAG | 19 |
| CLSP23 CCGGCTCGACTCAGATTCTCC CCAGACGCCGAGATG | 20 |
| LDC3UTA CCGCAAGCTTAGAAACAAAGT CAGGGTT | 21 |
| CLSP1085 CCGCAAGCTTTGGCAGCTGTCT CAGGCTTTACAAG(CT)G | 22 |
| 3UTA CCGCAAGCTTTGGGAGGGA GCACAGGTCAGCGTGGGAAG | 23 |
| 3UTB CCGCAAGCTTCTGGGAGGAA ACATAGGTCAGCATGGGAAC | 24 |
| 3PEI CCGGGAATTCATCTCAGGG TGAG | 25 |
| 3PEIHIS CCGGGAATTCATCTCAGGGTGGT GGTGGTGGTCCCATCTCAGGG TGAG | 26 |
| 3PEIFLAG CCGGGAATTCATCTCAGGGTGGT GGTGGTGGTCCCATCTCAGGG TGAG | 27 |
| 5PKOZXB GGGCTCTAGACGGCCGCCAACC ATGCGGGTTCATGGGGCC | 28 |

| 備考 | 配列番号 |
|-----------------------|------|
| 5'プライマー, Sal I 切断部位 | 17 |
| 5'プライマー, Sal I 切断部位 | 18 |
| 5'プライマー, Xba I 切断部位 | 19 |
| 5'プライマー, Sal I 切断部位 | 20 |
| 3'プライマー, HindIII 切断部位 | 21 |
| 3'プライマー, HindIII 切断部位 | 22 |
| 3'プライマー, HindIII 切断部位 | 23 |
| 3'プライマー, HindIII 切断部位 | 24 |
| 3'プライマー, EcoRI 切断部位 | 25 |
| 3'プライマー, EcoRI 切断部位 | 26 |
| 3'プライマー, EcoRI 切断部位 | 27 |
| 5'プライマー, Xba I 切断部位 | 28 |

| 全長または切断部 | 配列番号 |
|----------|------|
| いずれか | 17 |
| いずれか | 18 |
| いずれか | 19 |
| 全長 | 20 |
| 全長 | 21 |
| 全長 | 22 |
| 全長 | 23 |
| 全長 | 24 |
| 切断 | 25 |
| 切断 | 26 |
| 切断 | 27 |
| いずれか | 28 |

10

20

30

40

可溶性 B * 1 5 0 1、B * 1 5 0 1 - H I S、および B * 1 5 0 1 - F L A G を、P r i l l i m a n e t a l, 1 9 9 7 によって以前に記載された通りに C P 3 0 0 0 中空繊維バイオリクターで設定したトランスフェクタントを培養することによって産生し、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用した。可溶性のクラス I 分子を含む上清をバイオリクター収穫物に集め、W 6 / 3 2 アフィニティーカラムで精製した

50

。分子当たり少なくとも2回のカラム精製を行った。

【0076】

ペプチドのリガンド精製、Edmanシーケンシング、および逆相HPLC分離

ペプチドリガンドを酸溶出によってクラスI分子から精製し(Prilliman, K Ret al., Immunogenetics 48:89, 1998;この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている)、さらに3Kdカットオフ膜(Millipore)を備えた攪拌細胞中を通過させることによって重および軽鎖から分離した(Millipore, ベッドフォード, マサチューセッツ, 米国)。B*1501、B*1501-HISまたはB*1501-FLAGから溶出したペプチドを含む約1/100容の攪拌細胞流に、492Aパルス状液相タンパク質シーケンサー(Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, ノルウォーク, コネチカット, 米国)上でシステインの誘導体形成なしに14サイクルのEdman減成を行った。Edmanモチーフは多重カラム溶出からそれぞれのアミノ酸のピコモル収量を合わせた後、文献(Prilliman, K Ret al, 1998, 上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている)に記載され且つ図2に示されているように前回に対する倍数増加を計算することによって誘導した。

10

【0077】

プールしたペプチド溶出物を、以前に記載した通りにRP-HPLCによって画分に分離した(Prilliman, K Ret al, 1998, 上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている)。簡単に説明すれば、ペプチドの400mg分量を10%酢酸100mLに溶解し、2.13150mmC18カラム(Michrom Bioresources, オーバーン, カリフォルニア, 米国)に装填し、0.06%TFAを含む2%~10%アセトニトリルのグラディエント0.02分の後に同じものの10%~60%のグラディエント60分を用いた。画分を、1分間隔で180mL/分の流速で自動的に集めた。

20

【0078】

マススペクトル分析法によるリガンド分析

RP-HPLC画分を急速真空乾固し、40mLの50%メタノール, 0.5%酢酸で再構成した。選択した画分からの約6mLを、NanoESIオン化源入口(Protana, オーデンス, デンマーク国)を用いてAPI-IIIトリプル四重極型マススペクトル分析計(triple quadrupole mass spectrometer)(PE Sciex, フォスターシティ, カリフォルニア, 米国)に噴霧した。下記の装置設定条件を用いてスキャンを集めた:極性-正;ニードル電圧-1375V;オリフィス電圧-65V;N2カーテンガス-0.6mL/分;ステップサイズ-0.2amu;滞在時間-1.5ms;および質量範囲-325~1400。それぞれの分子から生じた総イオントレースを視覚によって比較し、分子間で重複するイオンを同定した。イオンマッチの同定の後に、個々のイオンを選択して、MS/MSシーケンシングを行った。

30

【0079】

配列は、BioMultiViewプログラム(PE Sciex)アルゴリズム予想配列を用いて予想し、フラグメンテーションパターンを手動で評価した。現在編集されている配列に対するイオン配列相同性は、非重複のヒトで発現した配列タグに対する最新のBLAST検索およびNational Center for Biotechnology Information(国立衛生研究所, ベセズダ, メリーランド, 米国)から現在入手可能な未完の高処理量ゲノム配列ヌクレオチドデータベースを用いて決定した。

40

【0080】

本発明の方法は、クラスIHLLA分子から溶出したペプチドリガンドの直接的比較分析を提供する。このような比較分析を行うために、クラスIリガンド産生用の中空繊維バイオ

50

リアクターを、溶出リガンド分画化の逆相 H P L C、およびペプチドリガンドのマッピングおよびシーケンシングのためのマスペクトル分析法と共に用いた。比較リガンドマッピングの応用は、内生性クラス I を発現する細胞系にも応用可能である。クラス I 陽性細胞系でのペプチド配列決定の前に、C 末端エピトープタグをトランスフェクションしたクラス I 分子に加える効果は、有害な効果を持たないことを見出した。6 個のヒスチジン (6 - H I S) からなるタグまたはエピトープ A s p - T y r - L y s - A s p - A s p - A s p - A s p - L y s (F L A G) を含むタグを、P C R 中の可溶性の B * 1 5 0 1 の C 末端に加えた。これらの構造体を、次にクラス I 陰性 7 2 1 . 2 2 1 細胞にトランスフェクションし、以前に設定した通りにペプチド精製した (P r i l l i m a n , K R e t a l , 1 9 9 8 , 本明細書で上記に参考として引用) 。 2 個のテイルのあるトランスフェクタントをテイルのない可溶性の B * 1 5 0 1 と比較することによって、タグ付加はクラス I 分子のペプチド結合特異性に影響せず、従って直接ペプチドリガンドマッピングおよびシーケンシングに有害な効果を持たないと決定することができた。

10

【 0 0 8 1 】

E d m a n モチーフ

特定のクラス I 分子によって提示されるリガンドを識別するための最も一般的な手段は、その分子から溶出したペプチドのプールの E d m a n シーケンシングである。C 末端タグを有するテイルのあるクラス I 分子が内生性ペプチド装填を中断しないことを示すため、B * 1 5 0 1、B * 1 5 0 1 - H I S、および B * 1 5 0 1 - F L A G からペプチドプールの E d m a n 配列を、以前に公表された B * 1 5 0 1 データ (図 2) と比較した。モチーフを、図 2 に示される様々な B * 1 5 0 1 分子のそれぞれに割り当てた。アンカー位置 2 (P 2) では、ドミナント Q およびサブドミナント M が、F a l k e t a l . (I m m u n o g e n e t i c s 4 1 : 1 6 5 , 1 9 9 5) および B a r b e r e t a l . (J E x p M e d 1 8 4 : 7 3 5 , 1 9 9 6) によって以前に公表されているようにモチーフ中に見られた。さらに異なる P 3 は総ての分子で見られ、F、K、N、P、R および Y が現れており、これらの結果も、F a l k および B a r b e r によって以前に報告されている。また、三種類総ての分子では、ドミナント Y および F が C 末端アンカーとして P 9 に見られる。従って、三種類総ての分子についてのモチーフデータは、公表された標準モチーフとほとんど一致している。

20

【 0 0 8 2 】

マスペクトル分析法によるプロフィール

表面に結合した、テイルのない、およびテイルのある B * 1 5 0 1 分子のモチーフの比較では、試験した様々な形態の B * 1 5 0 1 によって結合したプールペプチドには実質的な差がなかった。しかしながら、本発明の目的は、罹患および健康な細胞からクラス I 分子によって結合された個々のペプチドを消去法により比較することである。消去式分析は、マスペクトル分析法によるイオンマップの比較によって行い、従って、テイルのあるおよびテイルのないクラス I 分子のイオンマップを比較して、比較ペプチドマッピング時のテーリングの効果を決定した。

30

【 0 0 8 3 】

テイルのあるおよびテイルのない B * 1 5 0 1 由来のペプチドを、逆相 H P L C (R P - H P L C) によって分画に分離した。次に、それぞれの画分を A P I - I I I マスペクトル分析計を用いてスキャンニングし、それぞれの漢文に存在するイオンを同定した。R P - H P L C 画分 9、10、11、18、19 および 20 から全般的イオンスキャンを得て、視覚で比較し、3 種類の分子間で重複しているペプチドを表すイオンを評価した。図 3 は、分子のそれぞれから生じたイオンマップの典型的な部分を示す。この比較は、同じイオンのパターンがここで分析した異なる B * 1 5 0 1 分子によって生成することを示している。3 種類の画分のそれぞれからのイオンマップを手で比較したところ、3 分子のそれぞれが結合したペプチドにはほとんどないしは全く差が見られなかった。

40

【 0 0 8 4 】

リガンド配列

50

3分子のそれぞれのMSクロマトグラムにおけるイオンマッチの同定の後、このイオンをタンデムマススペクトル分析法によるシーケンシング用に選択し、イオンが本当にペプチド-配列レベルでマッチしているかどうかを決定した。それぞれの画分からの10個のイオンを、最初にMS/MS配列生成に選択した。それぞれの分子からのイオンのそれぞれについてのフラグメンテーションパターンを手動で比較し、図4に示されるように、同一のフラグメンテーションパターンをペプチド-配列レベルマッチと見なした。検討を行ったペプチドフラグメンテーションパターンの中、52/57(91%)は、テイルのない分子と6-HISのテイルのあるタンパク質の間で正確なマッチであった(表VI)。フラグメンテーションのさらに異なるパターンは、MS/MSシーケンシングの目的で選択されたFLAG-テイルのあるイオンで同定され、MS/MSフラグメンテーション比較の目的で選択した57個のイオンの中、39(70%)のフラグメンテーションパターンがFLAG-テイルのあるおよびテイルのない分子の間でマッチした。全般的には、検討を行った113のスペクトルの中91(81%)がテイルのある分子と可溶性のB*1501との間で一致した。

10

【0085】

【表7】

表VI

| 分子 | 検討したイオン | イオンマッチ | マッチ率 |
|-------------|---------|--------|------|
| B*1501-HIS | 57 | 52 | 91% |
| B*1501-FLAG | 56 | 39 | 70% |
| B*1501-タグ付き | 113 | 91 | 81% |

20

【0086】

幾つかのリガンド配列を、生成したフラグメンテーションパターンから明確に決定した。ヒトペリプラキン(periplakin)由来のリガンドQGILISRGYSYを、画分18で溶出したペプチドから配列決定した。40Sリボソームタンパク質S26の範囲がマッチする11マーである第二のリガンドAVRDISEASVFを、画分20で同定した。特に、これら2種類のペプチドは、B*1501溶出リガンドのシーケンシングの際に本発明者らの実験室によって以前に報告された現象であるモチーフデータによって予想されたストロングコンセンサスグルタミンを欠いていた(Prilliman, K Retal, 1997, 本明細書で参考として上記に引用)。しかしながら、これらのリガンドは芳香族性のチロシンまたはフェニルアラニンで終わっており、これらのアミノ酸はいずれもEdmanシーケンシングデータおよび以前に公表された観察結果によってストロングアンカーであることが予想された(Prilliman, K Retal, 1998, 本明細書で参考として上記に引用)。

30

40

【0087】

本発明の一態様は、所定のクラスI分子をクラスI陰性細胞系にトランスフェクションすることによってその分子が結合したペプチドリガンドを特性決定し、クラスI分子と結合ペプチドのアフィニティー精製しようとするものである。しかしながら、クラスI分子を既に有している細胞系を選択して検討するときには、問題が複雑になる。この場合には、一つのクラスI分子に特異的な抗体を用いて細胞によって発現された他のものからそのクラスI分子を選択的に精製しなければならない。対立遺伝子特異抗体はペプチド結合溝中および附近でエピトープを認識するので、溝に見出されるペプチドの変化によってクラスI分子に対する抗体親和性が変化する可能性がある(Solheim, J Cetal

50

. , J Immunol 151 : 5387 , 1993 ; および Bluestone , J A et al . , J Exp Med 176 : 1757 , 1992) 。次に、変化した抗体認識が、溶出およびその後の配列分析で利用可能なペプチドを偏向させる可能性がある。

【0088】

クラス I 陽性細胞からトランスフェクションしたクラス I 分子およびそのペプチドリガンドを偏向しない方法で選択的に精製するには、非クラス I 陽性細胞でのクラス I 精製の態様を偏向する必要があった。既に広汎に特性決定されているクラス I 陽性分子 B * 1501 への FLAG および 6 - HIS タグの C 末端付加は、ペプチド結合にほとんどまたは全く影響しないことが示された。この方法は、内生的に発現したクラス I 分子の複雑な混合物から単一のクラス I 特異性を精製できるようにデザインされた。テイルのあるおよびテイルのない B * 1501 分子から溶出したリガンドを比較して、ペプチドレパートリーに対するテイルの付加の影響を評価した。

10

【0089】

ブールド Edman シークエンシングは、所定の分子の結合指紋を決定する目的で一般に用いられる方法であり、この方法を用いてテイルの付加のペプチド結合に対する大規模な効果を確認した。本発明者らは、それぞれのクラス I MHC 分子から溶出したペプチドの 1 / 100 に Edman 減成を行い、分子のそれぞれについてモチーフを誘導した。HIS - および FLAG のテイルのあるモチーフは、可溶性で膜に結合した B * 1501 について公表されたモチーフとマッチした。分子のそれぞれは Q のドミナント P2 アンカー、多数の残基を見出すことができる一層異質の P3、および P9 における Y または F のもう一つのドミナントアンカーを有するモチーフを示した。Edman シークエンシング中に検出されたアミノ酸のそれぞれのピコモル量の小さな差は、同じ分子を用いる連続実験で以前に言及されており、結合ペプチドの不均衡よりは細胞処理および / またはペプチド単離の差を反映しているものと思われる。極めて類似したペプチドモチーフは、クラス I MHC 分子のペプチド結合能がタグの付加によって急激に変化しないことを示していた。

20

【0090】

リガンドがタグ付加の後に歪まないことを確かめるため、MS および MS / MS をそれぞれ個々ペプチドのマッピングおよびシークエンシングに用いた。MS を行ったペプチド混合物はイオンクロマトグラム (図 3) を提供し、これを用いて 3 種類の検討を行った分子間のイオンオーバーラップの程度を比較した。広汎なイオンオーバーラップは、これらのテイルのあるおよびテイルのない B * 1501 分子が結合したペプチドはほとんど同一であることを示している。

30

【0091】

次に、選択したイオン MS / MS シークエンシングし、3 種類の分子間のフラグメンテーションパターンを比較することによってマッピングしたイオンオーバーラップが実際に正確なリガンドマッチを表していることを確かめた (図 4) 。約 60 種類のペプチドを最初に MS / MS 用に選択した - それぞれの画分から 10 。全般的には、フラグメンテーションパターン検討を行ったペプチドの大部分では正確にマッチした (表 VI) 。非マッチとして分類されたフラグメンテーションパターンは同じ質量 / 電荷比で存在するペプチドの混合物から生じ、それらの 1 個以上はタグ付き分子に存在し、B * 1501 からの同一イオンのスペクトルでは明らかではなかった。配列 - レベルマッチの中、HIS のテイルのある分子由来のリガンドは、FLAG のテイルのある分子から溶出したものより B * 1501 由来のものに一層緊密にマッチした。全体では、52 / 57 の HIS ペプチドが正確なマッチであり、39 / 56 の FLAG ペプチドは同等であった。従って、このデータは、6 - HIS タグが FLAG タグよりも内生性ペプチド結合を妨害しないが、いずれのタグも B * 1501 が結合したペプチドを劇的に変化させないことを示している。

40

【0092】

3 種類総ての分子から溶出したペプチドの画分に存在する小数の個々リガンド配列は、M

50

S / M S によって決定した。2 個の最も明確な配列 A V R D I S E A S V F および Q G L I S R G Y S Y は、テイルのあるクラス I 分子が実際に内生性ペプチドリガンドを装填したことを示している。これは、C 末端タグの付加が可溶性の H L A - B * 1 5 0 1 分子が自然に内生性ペプチドに結合することができることを排除しないという仮説を支持している。さらに、いずれのペプチド配列も、フェニルアラニンまたはチロシンからなる一層保存された C - 末端と対になった異質な N - 末端を有する B * 1 5 0 1 から溶出したペプチドについて以前に報告されているものと厳密にマッチした。均質な E d m a n 配列、ほぼ同一のフラグメンテーションパターン、および 3 分子間で共有されているペプチドリガンドを考慮して、本発明者らは C 末端タグの付加が B * 1 5 0 1 を結合したペプチドを著しく変化させないと結論した。溶出したペプチドのマッピングおよび消去式比較は、クラス I H L A 分子が結合した個々のリガンドの差および類似性を確認するための直接的な手段である。実際に、消去式比較は、オーバーラップしているリガンドが密接に関連した H L A - B 1 5 サブタイプを横切ってどのように結合しているかを示し、並びにどのリガンドがウイルス感染細胞に特有であるかを指摘している。溶出したペプチドリガンドの直接的比較分析は多くの目的に極めて適しており、それらの目的の少なからぬものがウイルスおよび癌 C T L エピトープ検出である。C 末端エピトープタグの付加により、クラス I 分子、従って、図 5 に示されるように、ウイルス感染を持続しまたは腫瘍形成性薬剤を収容することができる細胞系におけるペプチドリガンドの産生および精製の可能な方法が提供される。このような系からの直接的ペプチド分析は病原性要素の宿主コントロールについて重要な情報を生じるものであり、同時に合理的なワクチン開発のための重要な基礎単位を提供するものである。

10

20

【 0 0 9 3 】

本発明は、具体的には、未感染 / 非腫瘍細胞から感染 / 腫瘍細胞を識別するペプチドエピトープを検出するための新規な方法にも関する。本発明の方法によって得られる結果は予測したりまたは間接的に確かめることができず、直接エピトープ検出法によってのみ、本明細書に記載の独特なエピトープを同定することができる。さらに、この直接法によってのみ、供給タンパク質が潜在的に免疫原性のペプチドエピトープに分解されることを確かめることができる。最後に、この独特な方法は、タンパク質が感染 / 腫瘍細胞でユニークにアップおよびダウンレギュレーションされることについて若干の知見を提供する。

【 0 0 9 4 】

感染 / 腫瘍細胞をマークするこのような H L A によって提示されるペプチドエピトープの有用性は三倍である。第一に、疾病状態（すなわち、感染症または癌）を検出する目的でデザインされた診断薬は感染 / 腫瘍細胞に特有のエピトープを用いて腫瘍 / ウイルスの存在 / 非存在を確かめることができる。第二に、感染 / 腫瘍細胞に特有のエピトープはワクチンの候補である。ここで、本発明者らは、H I V に感染した細胞の表面に生じるエピトープを記載している。このようなエピトープは、自然のウイルス感染および直接エピトープ検出なしには予測できなかった。検出したエピトープは、ウイルス感染および腫瘍細胞に特有のタンパク質に由来する。これらのエピトープは、ウイルス / 腫瘍ワクチン開発およびウイルス / 腫瘍診断薬に用いることができる。第三に、この方法は、ウイルス感染細胞に特有な特定のタンパク質が宿主細胞のコンパートメントに見出され、そうでなければ、そこには見出されないものである。従って、本発明者らは、薬剤ターゲティングの目的でユニークにアップレギュレーションまたは転送された宿主タンパク質を同定して、感染細胞を殺す。

30

40

【 0 0 9 5 】

本発明は、特に H I V 感染細胞に特有なペプチドエピトープを記載する。H I V 感染細胞の H L A 分子に特有なペプチドエピトープを、未感染細胞由来の H L A ペプチドエピトープと直接比較した。

【 0 0 9 6 】

従って、例えば、本発明の方法は、(1) 細胞内宿主タンパク質から誘導され、感染細胞には特有であるが未感染細胞では見られない H L A によって提示されたペプチドエピト-

50

ブを同定することができ、および(2) ペプチドの細胞内供給源 - タンパク質はHIV感染細胞でユニークに発現/処理されて、タンパク質のペプチド断片が感染細胞上のHLAによって提示されるが、未感染細胞上では提示されないことが示されている。

【0097】

従って、本発明の方法は、感染細胞でのタンパク質のユニーク発現、または正常に発現した宿主タンパク質のユニークな転送および処理によってそのペプチド断片が感染細胞上のHLA分子によって提示されることを記載する。細胞内タンパク質のこれらのHLAによって提示されたペプチド断片は、ウイルス感染細胞の診断および感染細胞をターゲットィングして破壊する(すなわち、ワクチン開発)ための強力な代替物である。

【0098】

HIV感染細胞に特有なHLAによって提示されるペプチドエピトープの宿主供給源 - タンパク質の溝(groove)は、癌細胞でユニークに発現する供給源 - タンパク質である。例えば、本発明の方法を用いることによって、レティキュロカルビンのペプチド断片がHIV感染細胞上のみ見出される。文献検索は、レティキュロカルビン遺伝子は癌細胞(乳癌、肝臓癌、結直腸癌)でユニークにアップレギュレーションされることを示している。従って、HIV感染細胞を未感染細胞から識別するHLAによって提示されたレティキュロカルビンのペプチド断片は、さらに腫瘍細胞を健康な非腫瘍細胞から識別すると推測することができる。従って、宿主遺伝子のHLAによって提示されたペプチド断片、および腫瘍細胞およびウイルス感染細胞を健康な細胞と識別する遺伝子産物が直接同定された。本発明のエピトープ検出法は、ウイルスに感染したまたは腫瘍細胞上でユニークに発現しまたはユニークに処理される宿主タンパク質を同定することもできる。このようなユニーク発現しまたはユニークに処理されたタンパク質のHLAによって提示されるペプチド断片を、ワクチンエピトープとしておよび診断手段として用いることができる。

【0099】

ウイルス感染細胞をターゲットィングし検出する方法は、ウイルス由来のペプチドをターゲットィングするものでないことがある。むしろ、本発明の方法は、感染細胞を健康な細胞から識別する方法は、宿主によってコードされるタンパク質発現および処理における変更によることを示している。これは、癌並びにウイルス感染細胞について真実である。本発明による方法により、タンパク質/ペプチドがウイルス/腫瘍細胞を健康な細胞から識別することを無条件で示しているデータが得られる。

【0100】

感染および未感染細胞での比較リガンドマッピングの例

可溶性クラスI構造体の作製

目的とする対立遺伝子(特に、A*0201、B*0702、およびCw*0702)を発現するEBVによって形質転換された細胞系を増殖させ、Turner et al., 1998, J. Immunol., 161(3) 1406-13およびHildebrand et al.の米国特許第6,287,764号明細書に記載のシークエンシングに基づく分類法(sequence-based-typing methodology)によってクラスIHLAを分類した(上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている)。全RNAは5pXIおよび3pEIであり、細胞質および膜貫通ドメインを欠いている産物を生成した。あるいは、ヘキサ-ヒスチジンまたはFLAGエピトープタグをコードする3'プライマーを、プライマー3pEIHISまたは3pEIFLAG(表V)を用いてC末端に置いた。C-遺伝子座については、Kozakコンセンサス配列をコードする5'プライマーを用いた(Davis, et al., 1999, J. Exp. Med., 189: 1265-1274)。それぞれの構造体を適当な制限エンドヌクレアーゼで切断し(表V参照)、G418硫酸塩またはZeocin(Invitrogen)についての耐性遺伝子をコードする哺乳類の発現ベクター-pCDNA3.1-(Invitrogen, カールスバード, カリフォルニア)にクローニングした。

【0101】

10

20

30

40

50

Sup-T1細胞でのトランスフェクション。 Sup-T1細胞を、RPMI 1640 + 20%子牛胎児血清中で37°Cおよび5%CO₂で培養した。細胞を毎日分離して、対数相増殖を保持した。プラスミドDNAをQiagen Midi-prepキット(Qiagen, サンタクラリタ)またはBiorad Quantum Prep Midi prep Kit (Biorad, ハーキュリーズ, カリフォルニア)を用いて、製造業者のプロトコールに従って精製し、滅菌したDNAse不含有水に再懸濁した。細胞を、プラスミドDNA 30 µgを用いて400mVの電圧および960 µFのキャパシタンスで電気穿孔した。崩壊定数を電気選考中を通じて観察し、25mSを下回る崩壊時間のトランスフェクションのみを選択した。選択は、トランスフェクションの4日後に、30%子牛胎児血清を含みpHを中性より若干高く視覚的に調整した0.45 mg/mL Zeocin (Invitrogen) 選択培地を用いて行った。細胞を選択培地に2 × 10⁶個の細胞/mLで再懸濁し、それらが(pHを指示したPhenol Red (Mediatech)を用いて)ウェルを黄変しなくなるまで供給し、細胞分裂が開始するまでそのままにした。分裂が活発になった後、細胞が中位の(T-75)組織培養フラスコに達するまで選択培地を徐々に供給した。次に、細胞を0.5、1および1.5個の細胞/ウェルの限定希釈で、96穴組織培養プレートでサブクロニングした。細胞が十分に黄変するまで放置した後、それらを徐々に24穴プレートおよび小さな(T-25)組織培養フラスコに移した。試料を可溶性クラスI ELISA用に採取し、クラスIの最良のプロデューサーを5 × 10⁶個の細胞/mLで後で使用するために凍結し、-135°Cで保管した。

【0102】

可溶性MHCクラスI ELISA。 ELISAを用いて、細胞培養上清中のMHCクラスI/ペプチド複合体の濃度を試験した。モノクローナル抗体W6/32(ATCC, マナッサス, バージニア)を用いて、96穴Nunc Starwell Maxi-sorpプレート(VWR, ウェストチェスター, ペンシルバニア)をコーティングした。クラスIを含む試験試料100 µLを、プレートのそれぞれのウェルに装填した。検出は、西洋ワサビペルオキシダーゼに接合した抗-B2マイクログロブリン(軽鎖)抗体を用い、次いでOPD(Sigma, セントルイス, ミズーリー)と共にインキュベーションした。ELISA値は、Molecular Devices製のプログラムSoftmax Pro Version 2.2.1を用いてSpectraMax 3400A, Rom Version 2.04, February 1996によって読み取った。親和性精製(下記参照)の前に、かご入り大型ガラス瓶のMHCクラスI複合体を測定するため、それぞれの試料を少なくとも2枚の異なるプレートで3回試験した。未感染および感染採取物濃度を同一プレート上で読み取り、未感染試料を1% Triton X 100に溶解した後、ELISAプレートに装填した。これは、親和性カラムに装填したペプチドの量の差が大きいことによって生じるマスペクトルの変動性を最小限にする試みにおいてであった。

【0103】

完全長の構造体の作製。 完全長の構造体(pCDNA3.1-/G418硫酸塩耐性ベクター中)を作製し、クラスI陰性B-LCL 721.221およびT2にトランスフェクションした。これらの細胞系を、対数相で増殖するまで、RPMI-1640 + 10%子牛胎児血清中で培養した。細胞を、0.25Vおよび960 µFキャパシタンスで電気穿孔した。2日後、細胞をペレット化し、RPMI-1640 + 20% FCS + 1.5 mg/mL G418硫酸塩(Mediatech, ハーンドン, バージニア)からなる選択培地に再懸濁した。細胞を、この時点以後、上記と同じ方法で処理した(Sup-T1トランスフェクション)。

【0104】

セルファーム産生。 Sup-T1可溶性のMHCクラスIトランスフェクタント8リットルをRPMI-1640 + 15% FCS + 100 Uペニシリン/ストレプトマイシン中でローラーボトルで培養したものを、1100 × gで10分間遠心分離した。上清を廃棄し

、全部で 3×10^9 個の細胞総数を、コンディショニングを行った培地200 mLに再懸濁した。次に、感染細胞を供給ボトルに加え、Unisyn CP2500セルファーム (cell pharm) のECS供給ポンプを通して20%子牛胎児血清を含むRPMI-1640を予め加えた30 kD分子量カットオフ中空繊維バイオリアクター (Unisyn, ホブキントン, マサチューセッツ) に接種した。細胞を、37 °Cの温度および系の培地溜にCO₂を注入することによって自動的に保持されている7.20のpHで、バイオリアクター中で一晚インキュベーションした。この時期には、新たな培地を系に導入せず、ICS再循環を400 mL/分の低い値に保持した。ECS供給を接種から12時間後に15% FCSを補足したRPMI-1640を用いて100 mL/日の速度で開始し、ICS供給も同様に1リットル/日の速度で開始した。ECS再循環を、接種から2日後に4リットル/日の速度で開始した。ECSおよびICS試料を24時間間隔で採取し、sHLA ELISA (上記参照) およびグルコース試験を行った。ECSおよびICS供給速度並びにECSおよびICS再循環速度を、採取物中のsHLAの増加濃度およびICS培地中のグルコースの減少濃度に基づいて調整した。

10

【0105】

ウイルス産生および感染HIV MN-1産生。HIV MN-1クローニングウイルス (Genbank Accession Number M17449) を凍結ストックから融解し、標準的方法を用いて 25×10^6 個の非トランスフェクションSup-T1 (Denny CT, et. al. 1986. Nature. 320:549.51, 上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている) T細胞の感染に用いた。細胞をRPMI-1640+20%ウシ胎児血清 (Media Tech) 中で5日間培養し、合胞体形成を観察した。合胞体が形成したならば、新たな細胞を新鮮なRPMI-1640/20%FCSに加えた。培養をさらに5日間継続し、感染細胞100 mLを取り出した。上清を0.45 μmフィルターを通過させ、無細胞ウイルスを分割して、-80 °Cで保管した。この工程を、適量のウイルスが得られるまで継続した。

20

【0106】

HIV-1NL4-3産生。感染性分子クローンpNL4-3 (Genbank Accession Number AF324493) をEscherichia coli菌株Top10F' (Invitrogen, カールスバード, カリフォルニア) に形質転換した。プラスミドDNAを、Qiagen Midi Prep Kit (Qiagen, サンタクラリタ, カリフォルニア) またはBiorad Quantum Prep Midiprep Kit (Biorad, ハーキュリーズ, カリフォルニア) を用いて製造業者の指示に従って形質転換細胞からミディプレレーションした (midiprep ped)。プラスミドDNAを用い、Roche's Eugene 6 試薬 (Roche, パーゼル, スイス国) を用い製造業者の指示に従って293T細胞 (GenHunter Corporation, ナッシュビル, テネシー) をトランスフェクションした。ウイルスを含む上清を24、48および72時間後に回収し、500 × gで10分間遠心分離を行って透明にし、分割して、-80 °Cで保管した。可溶性のA*0201、B*0702またはCw*0702を含むSup-T1トランスフェクタントを、高力価ウイルスを生成するウイルスと共に同時培養した。72時間後、感染細胞を1100 × gで10分間遠心分離した。無細胞ウイルスを含む上清を取り出し、0.45 μmフィルターを通過させ、分割し、-80 °Cで保管した。ウイルスに感染した細胞を、フリーズ培地 (RPMI-1640+20%FCS+10%DMSO) に約 6×10^6 個の細胞/mLに再懸濁し、-80 °Cで保管した。

30

40

【0107】

ウイルス力価測定。HIVのいずれかの菌株由来の凍結したウイルスストック1バイアルを融解し、1) 少なくとも3個の合胞体を含むウェルを陽性と考え、または2) ELISAによって測定したとき50 ng/mLを上回るp24抗原を含むウェルを陽性とする2つのやり方で得点を付けたTCID₅₀分析法に用いた。次に、TCID₅₀を、Spearman-Kärber法 (DAIDS HIV実験室用のウイルス学便覧 (Vir

50

ology Manual for HIV Laboratories), January 1997) を用いて計算した。両得点法の平均値を、ウイルスの最終力価として用いた。ウイルス力価観察の第二の手段としては、ウイルスストック p24 ELISA (Beckman Coulter, マイアミ, フロリダ) 中で希釈せずに使用し、無細胞ウイルス中に存在する p24 の ng 数を測定した。

【0108】

P24 ELISA。 HIV p24 メジャーコアタンパク質は、試料を 10% Triton-X 100 で処理した後に BSL-3 設備から除くので、キットに含まれる不活性化培地は用いないという変更を除き製造業者の指示に従って市販の Beckman Coulter p24 ELISA によって測定した。次に、試料を水で連続希釈した後に使用した。

【0109】

感染細胞の中空繊維バイオリクター培養。 HIV の大規模培養を含む総ての操作は、国立衛生研究所によって設定された指針に準じて、Biosafety Level 3 Laboratory で行った。HIV MN-1 の凍結ウイルスストックの分量を融解し、約 5.5×10^6 の TCID₅₀ を含む総容積 100 mL にプールした。ローラーボトルにおいて RPMI-1640 + 15% FCS + 100 U ペニシリン / ストレプトマイシン中で培養した Sup-T1 可溶性の MHC クラス I トランスフェクタント 8 リットルを、 $1100 \times g$ で 10 分間遠心分離した。上清を廃棄し、総数が 3×10^9 個の細胞を、コンディショニングした培地 200 mL に再懸濁した。次に、無細胞 HIV MN-1 100 mL を再懸濁した細胞に加え、5% CO₂ 中 37 °C で 20 分毎に緩やかに振盪しながら 2 時間インキュベーションした。次に、感染細胞を供給ボトルに加え、Unisyn CP2500 セルファーム (cell pharm) (Unisyn, ホプキントン, マサチューセッツ) の ECS 供給ポンプを通して 20% 子牛胎児血清を含む RPMI-1640 を予め加えた 30 kD 分子量カットオフ中空繊維バイオリクターに接種した。細胞を、37 °C の温度および系の培地溜に CO₂ を注入することによって自動的に保持されている 7.20 の pH で、バイオリクター中で一晩インキュベーションした。この時期には、新たな培地を系に導入せず、再循環を 400 mL / 分の低い値で保持した。ECS 供給を接種から 12 時間後に 15% FCS を補足した RPMI-1640 を用いて 100 mL / 日の速度で開始し、ICS 供給も同様に 1 リットル / 日の速度で開始した。ECS および ICS 試料を 24 時間間隔で採取し、Triton-X 100 を 1% まで加えて不活性化し、sHLA ELISA、p24 ELISA およびグルコース試験は上記の通りに行った。ECS および ICS 供給速度並びに ECS および ICS 再循環速度を、採取物中の sHLA の増加濃度および ICS 培地中のグルコースの減少濃度に基づいて調整した。

【0110】

可溶性 HLA 精製。 可溶性 - HLA を含む上清を、感染した中空繊維バイオリクターから 1.9 リットルの容積で採取した。20% Triton-X 100 を滅菌し、50 mL の分量を 60 mL シリンジに入れ、2 シリンジを、セルファーム (cell pharm) から取り出したときにそれぞれ 1.9 リットルの採取物ボトルに注入し、最終的な TX 100 の割合を 1% とした。ボトルを緩やかに数回反転して TX 100 を混合し、4 °C で最低 1 週間保管した。1 週間後、採取物を $2000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、細胞破片を除き、10 リットルのかご入り大型ガラス瓶にプールした。次に、プールした HIV 不活性化上清から少量を採取し、定量的 TCID₅₀ 分析法 (上記) に用い、Sup-T1 との同時培養に用いた。同時培養が完全に陰性でありおよび TCID₅₀ の後にのみ、採取物を BSL-3 から取り出した。

【0111】

クラス I / ペプチド産生および感染細胞からの MHC クラス I / ペプチド複合体のペプチド特性決定処理。 セルファーム採取物を、セルファーム実験中に経時的に厳密に分離した。(これは、一層包括的に起こる可能性があるものとは異なり、観戦時に一時的に起こる

可能性があるエピトープ変化を評価しようとするものであった。)採取物を、ウイルスの感染性を測定するためにTCID₅₀分析および細胞同時培養分析法のいずれにおいても試験用に2 mL分量を採取したことを除き、採取物は正確に上記の通りに処理した。

【0112】

感染および未感染MHCクラスI複合体のアフィニティー精製。CP2500装置から採取した未感染および感染した採取物を、セルファームから採取後同様に処理した。W6/32ELISA(上記参照)によって測定した総量が50 mgのクラスIを、W6/32抗体に結合したSephacrose Fast Flow 4Bマトリックス50 mLを充填したPharmacia XK-50(Amersham-Pharmacia Biotech,ピスカタウェイ,ニュージャージー)カラム上を通過させた。結合したクラスI複合体を、最初に1リットルの20 mMリン酸ナトリウム洗浄緩衝液で洗浄した後、10 mMの濃度の双性イオン性界面活性剤Zwittergent 3-08(Calbiochem,Merck KGaA,ダルムシュタット,ドイツ国)、およびNaClを50 mMおよび20 mMリン酸ナトリウムを含む緩衝液で洗浄した。双性イオン性界面活性剤洗浄液を216 nmの波長でUV吸収を観察し、ペプチド複合体に疎水的に結合したTriton-X 100を除去した。洗浄液1リットルがカラムを通過した後(UVをベースラインに戻すのに十分な量を上回る)、双性イオン性界面活性剤緩衝液を20 mMリン酸ナトリウム洗浄緩衝液2リットルで除去した。ペプチドは、洗浄後に新たに作製した0.2 N酢酸,pH 2.7で溶出した。

10

【0113】

ペプチド単離および分離。溶出後、ペプチドを含む溶出物画分に、100%氷酢酸を加えて、10%氷酢酸濃度とした。次に、画分を、3 kD分子量カットオフ再生セルロース膜(Millipore)を含む8050型攪拌セル(Millipore,ベッドフォード,マサチューセッツ)限外濾過装置にプールした。装置に蓋をし管材料をパラフィルムで覆って漏れを防止し、78 水槽に10分間入れた。取り出した後、ペプチドを含む溶出緩衝液を室温まで放冷した。攪拌セルを窒素気流下55 psiの圧力で操作した。ペプチドを50 mL円錐形の遠心分離管(VWR,ウエストチェスター,ペンシルバニア)に集め、過冷却エタノールでフラッシュ凍結し、凍結乾燥した。ペプチドを、10%酢酸または10%アセトニトリルに再懸濁した。ペプチドを、Haisilc-18カラム(Higgins Analytical,マウンテンビュー,カリフォルニア)上

で100%B(100%アセトニトリル,0.01%TFA)のイソクラティックフローを用いて40分間HPLCを1回行うことによって精製した。溶出の後に、ペプチドを含む画分をプールし、急速真空乾燥して、10%150 μLに再懸濁した。塩基メチルバイオレット2 μgをペプチド混合物に10%酢酸中で加え、これをHaisilc-18カラムに装填して分画化を行った。ペプチドは2つの方法の一方で分画化したが、後者の方がペプチド分離が増加した。最初の分画化プログラムは2~10%Bで2分、10~60%Bで60分、および画分回収1分であった。第二のRP-HPLCグラディエントは、2~14%Bで2分、14~40%Bで60分、40~70%Bで20分、および画分回収1分からなっていた。所定の画分に溶出するペプチドを、216 nmのUV吸光度によって観察した。離れているが同一の(同じ緩衝液調製物に対して下降)ペプチド精製を

20

30

40

【0114】

分画化ペプチドのマスマスペクトル分析法によるマッピング。分画化ペプチドをマスマスペクトル分析法によってマッピングして、画分に基づくイオンマップを得た。画分を急速真空乾燥して、12 μLの50:50メタノール:水+0.05%酢酸に再懸濁した。2 μLを採取し、ナノエレクトロスプレー(Protana,オーゼンセ,デンマーク国)によって飛行時間型検出器を備えたQ-Star四重極型マスマスペクトル分析計(Perspective SCIEX,フォスターシティー,カリフォルニア)に噴霧した。スペクトルは、それぞれのスプレーした画分について同一のマスマスペクトル分析計の設定条件を用いて50~1200 amuの範囲の質量について生成した。次に、スペクトルからベ

50

ーラインを差し引き、プログラムBioMultiview 1.5 beta 9版 (Perspective SCIE X) またはBioAnalyst 1.0版 (Perspective SCIE X) を用いて分析した。未感染/感染細胞における同じ画分からのスペクトルを手動で同じ質量範囲に整列し、固定し、スペクトルによって表されるイオンの差の存在について15 amv増加を視覚的に評価した(例えば、Hickman et al., 2000. Human Immunology. 61:1339-1346を参照;この文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている)。イオンを選択して、未感染細胞における同じイオンに対して1.5倍のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション、または感染細胞中のイオンの存在または非存在に基づいてMS/MSシーケンシングを行った。このようにして、イオンを多数の種類に分類した後、MS/MSシーケンシングを行った。

10

【0115】

選択されたペプチドのタンデムマススペクトル分析。下記の種類のそれぞれに相当するイオン質量のリストを得た: 1) 感染細胞中でアップレギュレーション、2) 感染細胞ダウンレギュレーション、3) 感染細胞のみに存在、4) 感染細胞には存在しない、および5) 感染細胞では変化なし。最後の部類は一般にMS/MS分析には無視され、最初の4種類のものをQ-Starマススペクトル分析計でMS/MSシーケンシングを行った。ペプチドを含む画分を、3 μ Lの分量でマススペクトル分析計にスプレーした。総てのMS設定条件は、Q0およびCadガス設定条件を最良のフラグメンテーションが達成されるように変化させたことを除き、一定にした。生成したフラグメンテーションパターンを手動およびBioMultiview 1.5 beta 9版を用いて解釈した。シーケンシングアルゴリズムをデータの解釈に用いなかったが、MASCOT (Perkins, D Net al., 1999. Electrophoresis. 20(18):3551-3567), Protein Prospector (Clauser K. R. et al., 1999. Analytical Chemistry. 71:2871)、PeptideSearch (<http://www.narrador.emblheidelberg.de/GroupPages/PageLink/PeptideSearchpage.html>)、およびBLAST検索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)などのマルチウェブアプリケーションを用いて、ペプチド同定を促進した。

20

30

【0116】

エピトープ変化の品質コントロール。上記の方法で同定したペプチドが「アップレギュレーション」、「ダウンレギュレーション」しているなどと判断する前に、複数のパラメーターを設定した。最初に、ペプチドを同定した画分の前および後のペプチド画分に、目的とするペプチドのフラグメンテーションに用いた同一衝突条件下で同じamuでMS/MSを行い、生成したスペクトルを重ねて、比較した。これは、(メチルバイオレット塩基B標準化によっても)ペプチドが異なる分画化をした場合には、未感染または感染ペプチドの初期または後期画分にはペプチドがないこと(およびペプチドが同一の仕方で正確に分画化したこと)を確かめるために行った。第二に、最初のペプチドを同定するのに用いた同じamuを、次に(ペプチドを同定した画分の逆の感染または未感染の)別の画分でMS/MSを行った。スペクトルを再度重ね合わせて、フラグメンテーションパターンがマッチせず、従ってペプチドが未感染細胞には存在しないこと、またはフラグメンテーションパターンがマッチした場合には、ペプチドが感染細胞でアップレギュレーションしていることを最終的に検証した。最後に、同定したそれぞれのペプチドについて、合成ペプチドを生成した。これらのペプチドを10%酢酸に再懸濁し、最初の分画化に用いたのと同条件下でRP-HPLC分画を行い、同定したと推定されているペプチドが断片化したイオンMS/MSと同じ疎水性を有することを確かめた。この合成ペプチドを、重ねたスペクトルと同じ衝突条件下でMS/MS断片化し、元のペプチド断片と正確にマッチすることをチェックした。

40

【0117】

50

機能分析 / 文献検索。 エピトープを同定した後、供給タンパク質について文献検索を行い、感染細胞内でのそれらの機能を決定した。タンパク質の機能から、広汎な推理を行うことができる。供給タンパク質を、細胞内部での機能によって溝 (g r o o v e) に分類した。また、感染細胞についてのみ特異的提示に利用可能なタンパク質の溝についても、広汎な推理を行うことができる。第二に、供給タンパク質を、他のMHCクラスI対立遺伝子によって結合することができる他の可能なエピトープについてスキャンニングした。ペプチド結合予想 (P a r k e r , K . C . , e t . a l . 1994 . J . I m m u n o l . 152 : 163) を用いて、供給タンパク質から得られる他のペプチドが結合予想されたかどうかを決定した。プロテアソーム予想アルゴリズム (p r o t e a s o m a l p r e d i c t i o n a l g o r i t h m s) (A . K . N u s s b a u m , e t . a l . 2001 . I m m u n o g e n e t i c s 53 : 87 - 94) も同様に用いて、ペプチドがプロテアソームによって生成されている可能性を検討した。

10

【0118】

配列同定。 一例としてペプチドG P R T A A L G L Lを用いてこの処理手続きの適用によって見られる結果が、包含される。この方法によって得られた他の例およびデータを、表V I Iに示す。

【0119】

【表8】

表 VII

| イオン | 画分 | 配列 | MW | 実測 MW | 供給源タンパク質 | 出発アミノ酸 | 取得番号 | 領域 | 配列番号 |
|-------------------------------|----------|--------------|----------|----------|---|--------|----------|--------------|------|
| 感染細胞では確認されるが、未感染細胞では見られないペプチド | | | | | | | | | |
| 612.720 | 321NF | EQMFEDIISL | 1223.582 | 1223.418 | HIV MN-1, ENV | 101 | | HIV 由来 | 29 |
| 509.680 | 311NF | IPCLLISFL | 1017.601 | 1017.334 | コリン作動性受容体, α -3 ポリペプチド | 250 | | | 30 |
| 469.180 | 311NF | STTAICATGL | 936.466 | 936.360 | ユビキチン特異プロテアーゼ | 152 | 10720340 | | 31 |
| 420.130 | 161NF | APAQNPEL | 838.426 | 838.259 | β -会合転写タンパク質 3 (BAT3) | | | MHC 遺伝子産物 | 32 |
| 500.190 | 281NF | LVMAPRTVL | 998.602 | 998.396 | HLA-B 重鎖リダー配列 | 2 | 4566550 | MHC 遺伝子産物 | 33 |
| 529.680 | 311NF | APFI[NS]PADX | 1057.388 | | 未知、幾つかの cDNA に近い | | | 未知 | 34 |
| 523.166 | 121NF | TPQSNRPVpm | 1044.500 | 1044.333 | RNA ポリメラーゼ II ポリペプチド A | 527 | 4505939 | RNA 機構/結合 PR | 35 |
| 444.140 | 161NF | AARPATSTL | 887.495 | 887.280 | EUK, 翻訳開始因子 4 | 1073 | Q04637 | RNA 機構/結合 PR | 36 |
| 470650 | 161NF | MAMMAALMA | 940.413 | 939.410 | SPARC 様タンパク質 | 19 | 478522 | 腫瘍抑制遺伝子? | 37 |
| 490.620 | 161NF | IATVDSYVI | | 979.240 | TENASCIN-C (ヘキサブランチン) | 1823 | 13639246 | 腫瘍抑制遺伝子? | 38 |
| 563.640 | 161NF | SPNQARAQAAL | 1126.597 | 1126.364 | ポリピリミジントトラクト結合タンパク質 1 | 141 | 131528 | RNA 機構/結合 PR | 39 |
| | 301NF | GPRTAALGLL | 968.589 | 968.426 | レディキユロカルビン | 4 | 4506457 | 腫瘍抑制遺伝子? | 40 |
| 556.150 | 161NF | NPNQKNVAL | 1111.586 | 1111.300 | ELAV (HuR) | 188 | 4503551 | RNA 機構/結合 PR | 41 |
| 未感染細胞では確認されるが、感染細胞では見られないペプチド | | | | | | | | | |
| | 16UN1 NF | GSHSMRY | | | MHC クラス I 重鎖(複対立遺伝子、すなわち HLA-B*0702 または HLA-G などから誘導可能) | 可変 | 複数 | MHC クラス I 産物 | 42 |

10

20

30

40

50

【0120】

未感染細胞上にのみ存在するエピトープの同定の第一段階は、MS イオンマッピングを行うことである。この場合には、上記で開示したように HIV から得た逆相 HPLC 画分 30 (全クラス I ペプチドの画分を含む) をマススペクトル分析計に噴霧し、イオンスペクトルを作製した。図 6 に、イオンがアップレギュレーションしているものとして最初に同

定されたイオンマップの一部を示す。484.74のイオンが上部のマップで目立っていることが分かり、このマップは感染細胞からのペプチドから生成したスペクトルである。未感染細胞同士の間一方のスペクトルからもう一方のものと強度が異なっている他のペプチドがあることも分かる。ペプチドを最初に同定した後、ペプチドが見出されているスペクトルの面積を拡大して、隣接領域の総てのイオンをさらに完全に見た(図7)。482-488 amuの部分に関して拡大すると、484.72のイオンは感染細胞にしか存在しないことが分かる(上部のスペクトルで見られる)。このような大きな差は常に見られるものではなく、時には、配列決定のためさらに小さな差が選択されることがある。しかしながら、このイオンは、さらに分析を行うための極めて良好な候補と考えた。

【0121】

イオンを同定した後、この工程の次の段階は、タンデムマススペクトル分析法を用いることによってペプチドを配列決定することである。図8は、ペプチドを断片化するとき生成したスペクトルを示す。これらの断片を用いて、ペプチドのアミノ酸配列を識別する。このペプチドの配列は、GPRTAALGLLであると決定した。このペプチドを、感染したHLA-B*0702分子から単離した。初期の品質管理段階は、ペプチドの配列を検討して、この分子によって提示されることが以前に示された配列に適合するかどうかを見た。B*0702は、その第二の位置(P2)にG、およびそのC末端アンカーとしてLを有するペプチドを結合する。この情報に基づけば、この配列はB*0702によって提示されたペプチドであると思われる。

【0122】

ペプチドの特性決定の説明。ペプチド配列を得たならば、供給タンパク質についての情報が得られ、これからペプチドが感染細胞の細胞質ゾルに誘導される。最初に、BLAST検索(National Center for Biotechnologyのウェブサイトで利用可能)を行って、ペプチドについてのタンパク質情報を提供する。配列GPRTAALGLLを用いるBLAST検索によって、タンパク質であるレティキュロカルピン2が引き寄せられた。供給タンパク質を知った後、タンパク質についての情報を最初にPubMed(これもNational Center for Biotechnologyのウェブサイトで利用可能)から確かめ、図9に見られるように容易に参照することができるフォーマットにする。タンパク質についての総ての取得番号、およびタンパク質のオリジナルの記載が包含される。これによって、将来の使用についての情報に戻りやすくなる。また、タンパク質配列をコピーして、貼り付け、後での検索用に組込むためのテキスト文書として保存する。ペプチドはタンパク質全体で強調され、何に由来するかおよび全タンパク質がどの程度の大きさかについて幾らかの情報が提供される。これが、配列決定後の最初のデータ収集段階である。

【0123】

リガンドの特性決定の次の段階は、ペプチドが誘導される供給タンパク質についての文献検索を行うことである。タンパク質をPubMedデータベースに入れ、「レティキュロカルピン」という単語を有する総ての収録語を検索する。図10は、このタンパク質について以前に記載されてきたものをまとめているリストを示している。レティキュロカルピンについて、このタンパク質を含む複数の論文が公表されていることが分かる。文献はPubMedリストに続く段落にまとめられており、レポートに挿入されている。レティキュロカルピンについて、非常に興味深い点の幾つかは、これがER常在性タンパク質であり、感染細胞に提示される理由について推測することができることである。第二に、これは、乳癌および結直腸癌のような幾つかの他の種類の癌においてアップレギュレーションされることが見出されている。このタンパク質は、HIVによって引き起こされるもの以外の疾患の治療にも広汎に応用することができると思われる。このタンパク質が、HIVと相互作用しまたは干渉するものとして以前に引用されているかどうかも決定される。これは(幾つかの場合には見られるが)、レティキュロカルピンについては見られておらず、従ってレポートには示されていなかった。タンパク質の一般的理解が、文献検索によって得られる。

10

20

30

40

50

【0124】

ペプチドの特性決定の予想。文献検索の後、幾つかの二次的検索を行う。図11は、(上記で説明した) Parker's Predictionを用いて行ったペプチド結合アルゴリズムの結果を示している。入力には、全供給タンパク質を用い、コンピュータによって、選択されたHLA対立遺伝子によって結合されるペプチドのリストが得られる。この場合には、B*0702が選択されたが、これは、このペプチドが誘導される対立遺伝子であったからである。図の黒矢印から、マススペクトル分析法によって配列決定されたペプチド配列HLA-B*0702に高親和性で結合することが予想されることが分かる。同様に結合することが予想される幾つかの他のペプチドが、示されている。図12には、もう一つの周知の検索エンジンSYPEITHIを用いて供給源ペプチドで行った同じ処理手続きが示されている。(このエンジンは、URL: <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/Scripts/MHCServer.dll/EpPredict.htm>を用いるワールドワイドウェブに見出すことができる。)また、B*0702についてのこの検索エンジンからの結果は、このペプチドがHLA-B*0702に高親和性で結合することが予想されることを示している。また、多数の他のペプチドがこの供給タンパク質から誘導され、結合されることも予想される。この予想により、幾つかのことを決定することができる。第一に、ペプチドが以前のアルゴリズムによって結合されることが予想されるかどうかを告げることができる。これにより、プログラムがどの程度良好に作業するか、および/または第三者が(供給タンパク質を持っているときには)ペプチド結合アルゴリズムからこのペプチドを同定することができるかどうかを知ることができる。この情報の総てを、ペプチドだけでなく供給タンパク質自身についての本発明の方法にとって一層重要なものに変換することができる。

【0125】

ペプチド結合アルゴリズムを行った後、タンパク質からペプチドへの通常の処理中に、ペプチドをプロテアソームによって生成させることができるかどうかを決定する目的で、検索を行う。クラスIペプチド装填のための多数の経路が現在示されており、ヒトプロテアソームについての開裂アルゴリズムはいかなる手段によっても良好には設定されていない点に十分留意すべきである。正の結果は、プロテアソームが開裂に大きく関わっていることを示すことがあるが、負の結果は、ペプチドがクラスI分子で提示されないことを決して示していない。図13に、開裂プレディクターPaProC(URLで入手可能)を用いて供給タンパク質のレティキュロカルビンについて行った第一のプロテアソーム開裂の結果を示す。エピソードの概略を示す。この予測ソフトウェアによっては、ペプチドが正常なプロテアソームによって開裂されることは予想されない。このことは、感染細胞では、特にレティキュロカルビンペプチドに関して代替経路のMHCクラスI提示が用いられていることを意味する。これは、また、ウイルス感染の際の新規な治療方法を提示することもできる。第二のプロテアソーム開裂検索も、図14に示されるように、予測ソフトウェアNetChop(ワールドワイドウェブで入手可能)で用いられる。この予測法および当該技術分野における現在用いられている文献からの他のデータによって、ペプチドをプロテアソームによって作製し、開裂して、同定されるGPRTAALGLLを形成する。

【0126】

第三段階の分析は、供給タンパク質のみを含んでいる。総ての他の対立遺伝子をペプチド結合について試験し、最高の結合剤のリストを生成する。次に、プロテアソーム開裂予想を参照して、これらのペプチドがどのようにして生成するかを解明する。この情報は、ペプチドの下流試験、およびこのタンパク質が広汎なHLA対立遺伝子をカバーするワクチン試験に応用可能であるかどうかの決定に有用である。レティキュロカルビンについては、異なるHLA対立遺伝子に対して多数の高親和性ペプチドが示された(幾つかの例を、図15に示す)。この図では、レティキュロカルビン由来の幾つかの高親和性ペプチドが、HLA-A*0201およびA*0101について同定された。

【0127】

10

20

30

40

50

配列決定の品質管理。現在のところ、MS/MS配列データの品質を評価する直接的手段はない。総ての記述され且つ予測された段階が終了したならば、再度品質管理のために元のペプチド配列に戻り、このペプチドが本当にアミノ酸配列として同定したものであり且つペプチドが実際に感染細胞のみに存在することを確かめる。本発明者らは、これらの多数の段階を用いており、従ってこの配列が実際に、ペプチドを包含する下流応用へ進む前に主張しているものであることには疑問の予知がない。

【0128】

最初に、本発明者らは、ペプチドが本当にアップレギュレーションされており、または感染細胞のみに存在することを決定する。レティキュロカルビンペプチドについては、このペプチドが恐らくは感染細胞のみに存在することを決定した。ペプチドが実際に未感染細胞にはなく、且つ(分画化にも同様に内部コントロールを用いることを考えれば)RP-HPLCによる分画化が異なる可能性が全くないことを確かめるために、同定を行った前後の画分からMSを用いてイオンスペクトルを生成した。レティキュロカルビンペプチドの場合には、画分30のペプチドを同定し、従って画分29および31についてMSを行った(図16)。図16では、 m/z 484.72には実質的なピークがないことが分かる。これは、差別的な分画化がなく且つペプチドが本当に未感染細胞からはなかったことを示していた。前後の画分の一方にペプチドピークがある場合には、MS/MSにより、このピークが特性決定しているイオンまたは同一の質量/電荷比を有する別のイオンを表すかを決定した。

10

【0129】

ペプチドが別の画分には存在しないことを確定した後、MS/MSを未感染スペクトル(同一画分)の同一 m/z について行い、未感染細胞には同一配列を有するペプチドはないことを最終的に証明した。図17では、同一MS衝突条件下で生成したフラグメンテーションパターンは全く異なることが分かる。このことは、未感染細胞にはレティキュロカルビンペプチドがないことを示している。

20

【0130】

最後に、ペプチド配列が最初に同定したものと同一であることを最終的に立証するため、MS/MSフラグメンテーションパターンから同定したペプチド配列と同じアミノ酸からなる合成ペプチドを合成した。レティキュロカルビンペプチド(すなわち、484.72における画分30のイオン)については、ペプチド「GPRTAALGLL」を合成した。次に、このペプチドを採用して、以前に用いたのと同じ条件下でMS/MSを行った。図18は、内生的に装填したレティキュロカルビンペプチドのMS/MSから生成したスペクトルを示す。これに見られるように、ほとんど総てのアミノ酸の組合せは断片の生成および存在する断片の強度のいずれについても全く異なる断片の組を生じるので、スペクトルのマッチングは、このペプチド配列がGPRTAALGLLであることを示している。図18は、同一衝突条件下での内生性および合成「GPRTAALGLL」ペプチドのMS/MSを示す。MS/MSグラフは実質的に同一であることが分かる。

30

【0131】

本発明によれば、ペプチドリガンド(すなわち、「GPRTAALGLL」)が、HIV MN-1ウイルスに感染した細胞のB*0702クラスI MHC分子によって提示されるが未感染細胞では提示されないものとして同定された。当業者であれば、このようなペプチドリガンドの直接同定における本発明の方法の新規性および有用性、およびこのような同定が多数の治療(ワクチン開発、薬剤ターゲティング)および診断手段に対して有する重要性を理解することができる。多数の他のペプチドリガンド自体が、(未感染細胞とは反対に)HIV MN-1に感染した細胞でのみ同定されており、これらの結果を表VIIにまとめている。当業者であれば、本明細書を考慮すれば、「GPRTAALGLL」ペプチドリガンド、並びに目的とする微生物に感染した細胞および/または腫瘍形成性細胞に見られる他の唯一提示されるペプチドリガンドを完全に同定することができる。

40

【0132】

上記のように、表VIIは、HIV感染細胞に特有なものとしてこれまでに同定されたペ

50

プチドリガンドの配列を同定する。クラス I sHLA B*0702 を、HIV に感染したおよび感染していない T 細胞について採取した。ペプチドリガンドを B*0702 から溶出させ、感染細胞に特有のイオンが明らかとなるようにマスペクトル分析計で比較マッピングした。感染細胞に特有のイオン（および未感染細胞に特有の 1 個のリガンド）にマスペクトル分析法によるフラグメンテーションを施し、ペプチドシーケンシングを行った。第 1 欄はシーケンシング用に選択したイオンを示しており、第 2 欄は HPLC 画分であり、第 3 欄はペプチド配列であり、第 4 欄は予想分子量であり、第 5 欄は実測分子量であり、第 6 欄は配列決定したエピトープの供給タンパク質であり、第 7 欄は、供給タンパク質の配列におけるエピトープが出現する場所であり、第 8 欄は取得番号であり、第 9 欄はそのエピトープおよび/またはその供給タンパク質について知られていることを簡潔に示しているデスクリプターである。 10

【0133】

本発明で用いる方法は、健康な細胞と比較して不健康な細胞に特有なものを決定する目的で sHLA を用いることである。細胞の内容を精査する目的で sHLA を用いることにより、処理されてペプチドとなるタンパク質に関して不健康な細胞に特有なものが考察される。表 V I I は、エピトープおよび HIV 感染細胞に特有なそれらの供給タンパク質を見出すための本明細書に記載された方法の有用性を示している。レティキュロカルビン由来のペプチドの詳細な説明は、上記に提供されている。表 V I I に記載されている他のエピトープおよび相当する供給タンパク質を、レティキュロカルビンエピトープおよび供給タンパク質と同じ方法で、すなわち、本明細書で上記した通りに処理した。表 V I I にまとめたデータは、本明細書に記載のエピトープ検出法は、sHLA 結合エピトープ、および感染した/不健康な細胞に特有なそれらの相当する供給タンパク質を同定することができることを示している。 20

【0134】

同様に、表 V I I に示されているように、未感染細胞の個々のクラス I MHC 分子ペプチドによっては提示されない未感染細胞の個々のクラス I MHC 分子で提示されるペプチドリガンドを同定することもできる。例えば、ペプチド「GSHSMRY」は、本発明の方法によって、未感染細胞では提示されるが感染細胞では提示されない個々のクラス I MHC 分子として同定された。

【0135】

このデータの有用性は、少なくとも 3 つある。第一に、このデータは、HLA を有する細胞から出てくるものを示している。このようなデータを用いて、CTL を不健康な細胞にターゲティングすることができる。第二に、記載したリガンドを有する HLA 分子を特異的に認識するようにターゲティングすることができる。第三に、供給タンパク質の実現により、この供給タンパク質をターゲットとする治療法および診断法を得ることができる。従って、不健康な細胞に特有なエピトープは、供給タンパク質が不健康な細胞で特有であることも示している。

【0136】

本明細書に記載したエピトープ検出および比較リガンドマッピングの方法は、HIV のような微生物に感染した細胞に限定されない。本明細書に記載したエピトープ検出法によって解析される不健康な細胞は、ウイルス感染や癌性の悪性転換から生じる可能性がある。さらに、不健康な細胞の状態を、ウイルス感染や腫瘍形成の際に発現することが知られている特定の遺伝子をトランスフェクションすることによって模倣することもできる。例えば、HIV の特定の遺伝子を文献記載の方法で細胞系で発現させ (Achour, A., et al., AIDS Res Hum Retroviruses, 1994, 10(1): p. 19-25; および Chiba, M., et al., CTL Arch Virol, 1999, 144(8): p. 1469-85, これらの文献の総ての内容は、その開示の一部として本明細書に引用される)、次に、エピトープ検出法を行って、導入遺伝子の発現によって sHLA によるエピトープ提示がどのように修正されるかを確認することができる。同様にして、癌の際にアップレギュレーションすること 40 50

が知られている遺伝子 (Smith, E. S., et al., Nat Med, 2001, 7(8): p. 967-72, 上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される) sHLAと共に細胞に導入した後、エピトープ検出を完了することができる。従って、本明細書に記載されているsHLAを用いるエピトープ検出は、完全な病原体、癌細胞または細胞系、または特定の癌、ウイルス、または細菌遺伝子を導入した細胞で完成することができる。これら総ての場合に、本明細書に記載されているsHLAは、エピトープ提示およびエピトープの供給タンパク質に関して何か変化するかを検出する手段を提供する。

【0137】

従って、本発明によって、エピトープ検出および比較リガンドマッピングの方法であって、本明細書で上記した目的および利点を完全に満足するgDNA由来のクラスIおよびクラスII MHC分子を産生し且つ操作する方法を含むものが提供された。本発明を、本明細書で上記した特定の図面、実験、結果および術語に関連して説明してきたが、多くの変更、修正および変化は当業者には明白となることは明らかである。従って、本発明は、本発明の精神および広汎な範囲内にある総ての変更、修正および変化を包含するものと解釈される。

【0138】

本願明細書(例および特許請求の範囲を含む)に記載の総ての数値および定量測定値は、近似値である。

【0139】

本明細書で例示的に開示しまたは特許請求してきた発明は、本明細書では具体的に開示または特許請求されていない任意の要素の非存在下で適当に実施することができる。従って、本発明は、本明細書で開示または特許請求した要素を含んでなり、そのような要素からなり、またはそのような要素から本質的になることができる。

【0140】

下記の特許請求の範囲は、本願明細書と矛盾しない最も広い可能な範囲に対して権利が付与される。特許請求の範囲は、好ましい態様または例に示される態様に必ずしも限定されない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

ヒトのクラスI MHCの切断体を増幅するための二段階PCR法の概観。

【図2】

可溶性B*1501、B*1501-HISおよびB*1501-FLAGのエドマン配列分析。残基強度をドミナント(前回に対して3.5倍以上のピコモル増加)またはストロング(前回に対して2.5~3.5倍の増加)として分類した。

【図3】

分子間のイオンオーバーラップを説明する可溶性B*1501、B*1501-HISおよびB*1501-FLAGからの典型的なMSイオンマップ。プールした酸溶出ペプチドをRP-HPLCによって分画化し、個々の画分をMSスキニングした。

【図4】

B*1501、B*1501-HISおよびB*1501-FLAG間の配列-レベルオーバーラップを説明する3種類の分子の画分11から選択したイオンについてMS/MSによって生成したフラグメンテーションパターン。

【図5】

C末端にタグを付けたsHLA分子のエピトープ検出のフローチャート。クラスI陽性トランスフェクタントを、選択した病原体およびタグを用いて優先的に精製したsHLAに感染させる。MSイオンマップの差し引き比較により、感染細胞でのみ見られるイオンを生じ、これを次にMS/MS配列決定し、クラスIエピトープを誘導する。

【図6】

HIV MN-1に未感染のおよび感染した可溶性B*0702 Sup T1細胞からのM

S イオンマップ。プールした酸溶出ペプチドを RP - HPLC によって分画し、画分番号 30 を MS スキャンニングした。

【図 7】

482 ~ 488 amu の領域を拡大して総てのイオンを現下の面積で一層明確に同定するようにしたことを除き、図 6 と同様の MS イオンマップ。

【図 8】

感染した可溶性 B * 0702 Sup T1 細胞から単離したペプチドイオン 484 . 72 のタンデムマススペクトル分析法によって生成したフラグメンテーションパターン。

【図 9】

図 8 で同定した配列 G P R T A A L G L L による Pub Med B L A S T 検索の結果。 10

【図 10】

「レティキュロカルピン」という用語についての Entrez - Pub Med 検索の結果の概要。

【図 11】

B * 0702 HLA 対立遺伝子によって結合されているペプチドのリストを生成する全供給タンパク質レティキュロカルピンを用いるパーカー予測を用いて行ったペプチド結合アルゴリズムの結果。

【図 12】

B * 0702 HLA 対立遺伝子によって結合されているペプチドのリストを生成する全供給タンパク質レティキュロカルピンを用いるラメンゼーの SYPEITHI 予測を用いて行ったペプチド結合アルゴリズムの結果。 20

【図 13】

開裂プレディクター PaProC を用いる完全なレティキュロカルピンタンパク質の予想プロテアソーム開裂の結果。

【図 14】

開裂プレディクター NetChop 2 . 0 を用いる完全レティキュロカルピンタンパク質の予想プロテアソーム開裂の結果。

【図 15】

レティキュロカルピン由来の幾つかの高親和ペプチドを、HLA - A * 0201 および A * 0101 によって提示されることが予測されるペプチドとして同定した。 30

【図 16】

イオン 484 . 72 が存在しないことを決定するための、画分 29 および 31 の可溶性の B * 0702 未感染 Sup T1 細胞からの MS イオンマップ。

【図 17】

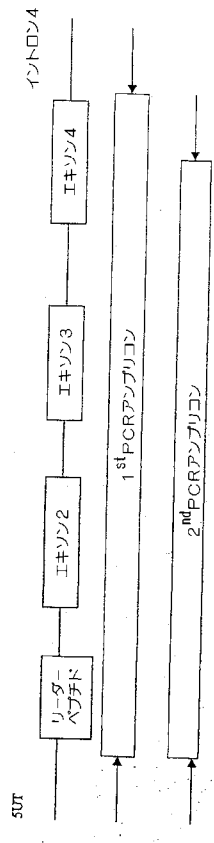
未感染細胞にレティキュロカルピンペプチドが存在しないことを説明するための可溶性の同一の MS 衝突条件下で B * 0702 未感染の Sup T1 細胞画分 30 のイオン 484 . 72 のフラグメンテーションパターン。

【図 18】

合成ペプチド G P R T A A L G L L と感染した可溶性の B * 0702 Sup T1 細胞から単離したペプチドイオン 484 . 72 の MS / MS フラグメンテーションパターンの比較 40

。

【 図 1 】



【 図 2 】

B*1501

| Domain | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Q | K | F | | | | | | Y |
| | | N | R | | | | | | |
| | | R | Y | | | | | | |
| String | | M | P | P | G | | | | F |
| | | L | H | D | I | | | | |
| | | V | A | G | E | | | | |

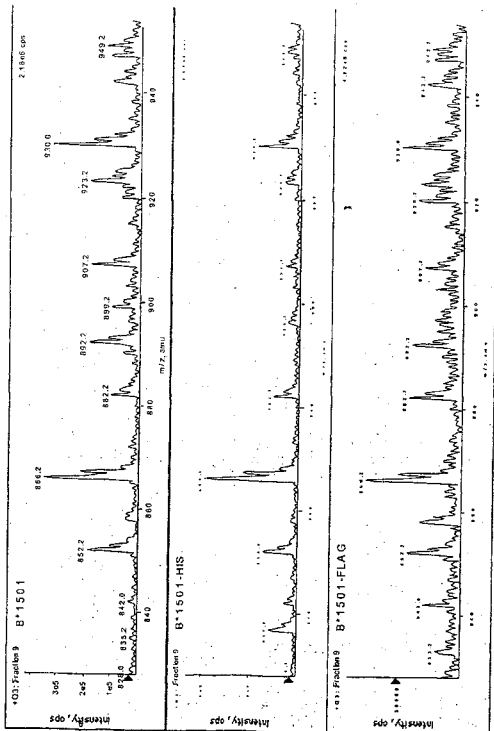
B*1501-HIS

| Domain | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Q | F | D | | | | | | F |
| | | N | P | | | | | | |
| | | R | Y | | | | | | |
| String | | L | M | H | E | | | | |
| | | V | A | P | G | | | | |

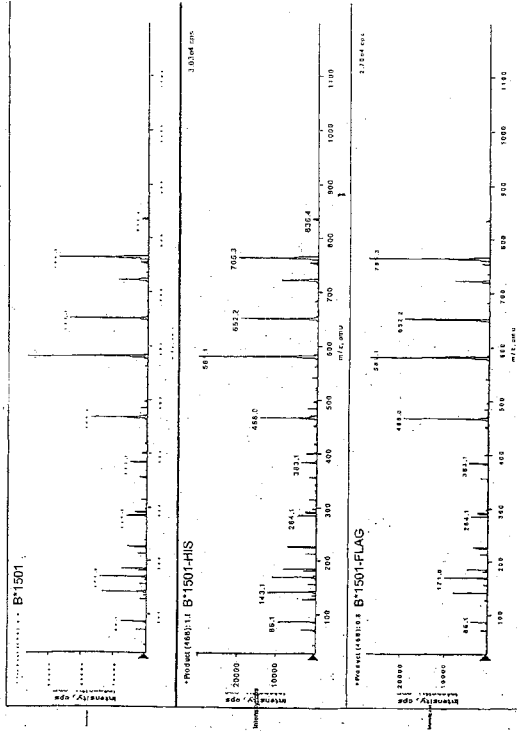
B*1501-FLAG

| Domain | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | O | K | D | | | | | | F |
| | M | N | P | | | | | | |
| | | R | Y | | | | | | |
| String | | L | M | H | E | | | | |
| | | V | A | P | G | | | | |

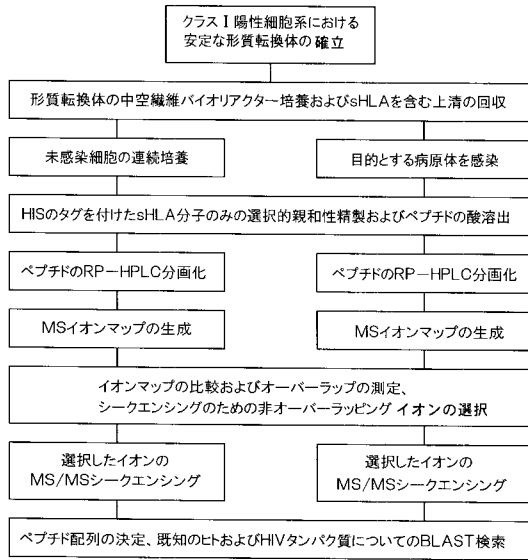
【 図 3 】



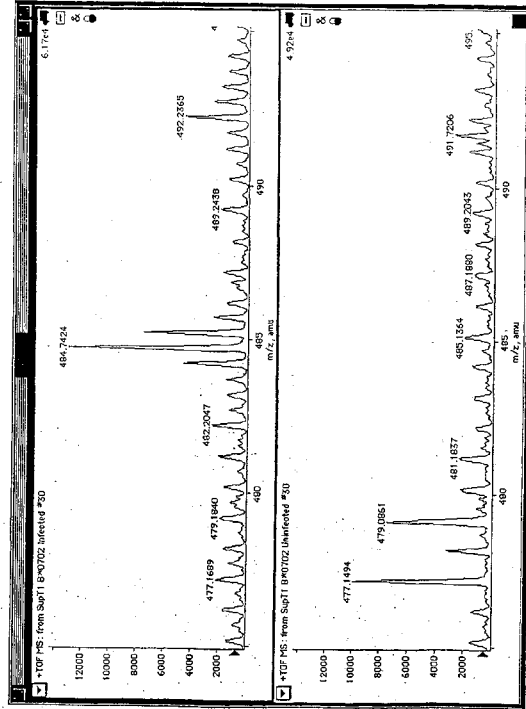
【 図 4 】



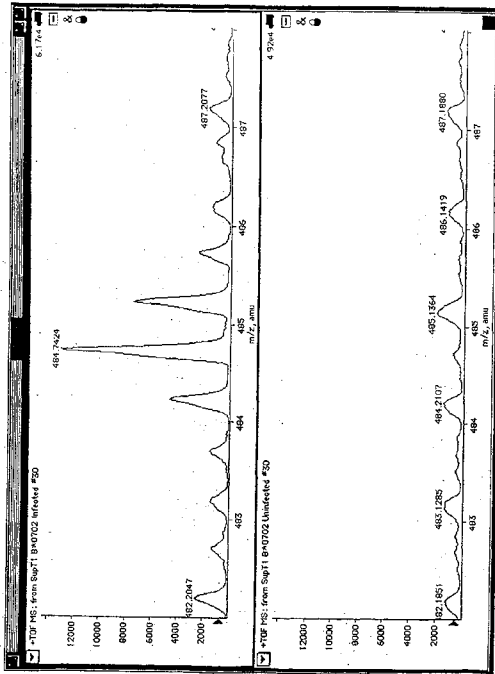
【 図 5 】



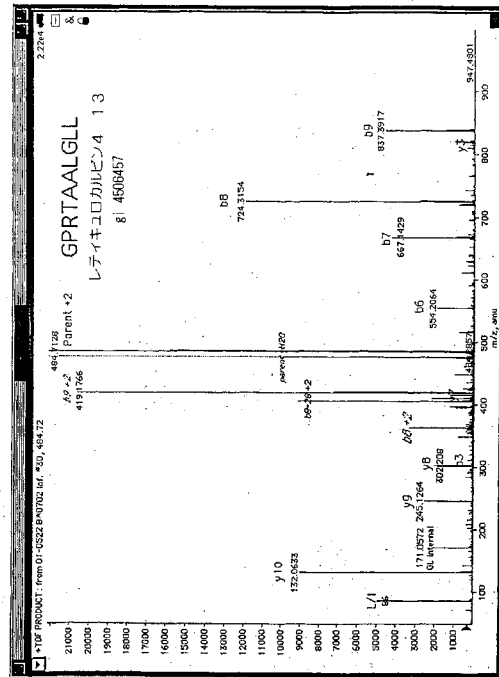
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 1 3 】

PA PRO Cによる完全なしテキニコロカルピタンパンク質のプロテアソーム開裂の予測
PA PRO Cは名無(アミノ酸) における下記の(108) プロテアソーム開裂
(ヒトプロテアソーム型)によって作製)を予測する

Table with 3 columns: Index (1-301), Amino Acid Sequence, and Score. The table lists various amino acid sequences and their corresponding scores for proteasome cleavage prediction.

プロテアソームは、このタンパク質を開裂してこのペプチドを生成することは予測されていない。

【 図 1 4 】

NETCHOP2.0による完全なしテキニコロカルピタンパンク質のプロテアソーム開裂の予測
Net Chop 2.0 による予測結果

1配列のプロテアソーム開裂部位について予測

用いた閾値: 0.5

*****NetChop 予測 *****

317配列

Table with 3 columns: Index (1-317), Amino Acid Sequence, and Score. The table lists various amino acid sequences and their corresponding scores for proteasome cleavage prediction using NETCHOP2.0.

プロテアソームは、C-末端Lの後に開裂することが予測され、[nr]110N-末端伸延を有する前駆体を生成することがある。(この形態の開裂については、Casclio P, Hillton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL, 2001. 「26Sプロテアソームおよび免疫プロテアソームは、主として抗腫瘍性ペプチドのN-伸延誘導体を生産する」 EMBO J. May 15;20(10):2657-66を参照されたい)。

【 図 1 5 a 】

このタンパク質から提示されることガ予測される他のペプチド

Table with 3 columns: Index (1-27), Amino Acid Sequence, and Score. The table lists various amino acid sequences and their corresponding scores for peptide prediction.

A*0201

【 図 1 5 b 】

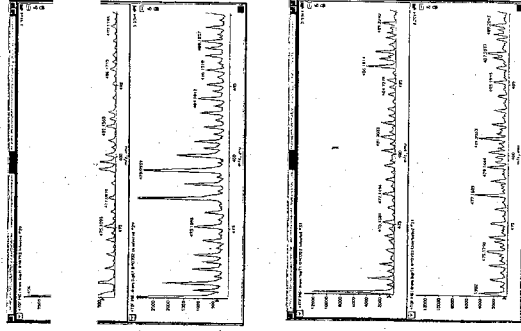
Table with 3 columns: Index (1-27), Amino Acid Sequence, and Score. The table lists various amino acid sequences and their corresponding scores for peptide prediction.

A1

ノナマ-

A1

【 図 1 6 】



4.84.7.2を示す前画分の図：画分2.9

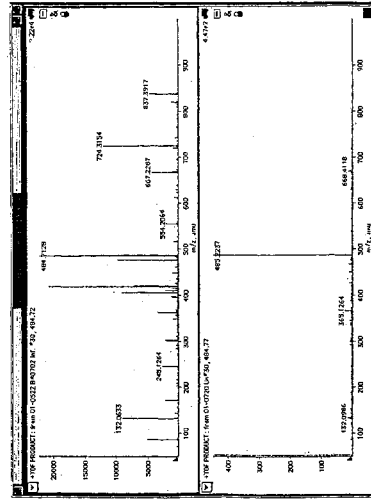
この画分にはヘプタドの形状はない

4.84.7.2を示す前画分の図：画分3.1

この画分にはヘプタドの形状はない

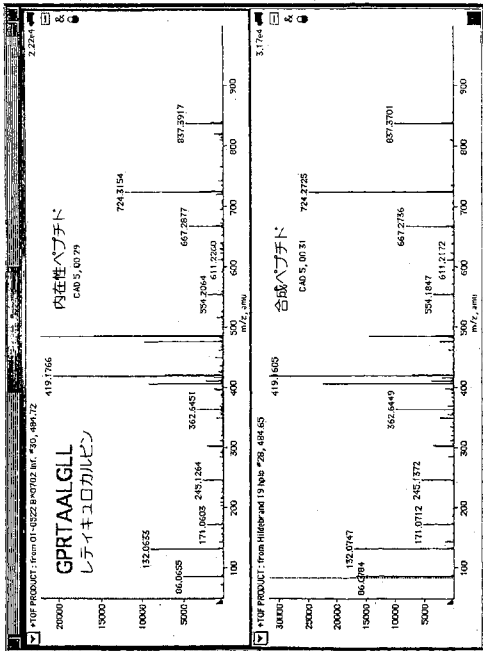
【 図 1 7 】

イオンが存在しないことを立証するための同一条件下での
未反応画分30イオン484.72のMS/MS



【 図 1 8 】

実験的な同一条件下での合成MS/MS



【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
18 April 2002 (18.04.2002)

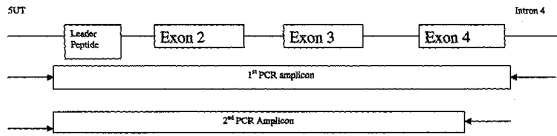
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/30964 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00
 - (21) International Application Number: PCT/US01/31931
 - (22) International Filing Date: 10 October 2001 (10.10.2001)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (30) Priority Data:
 - 60/240,143 10 October 2000 (10.10.2000) US
 - 60/256,409 18 December 2000 (18.12.2000) US
 - 60/256,410 18 December 2000 (18.12.2000) US
 - 60/299,452 20 June 2001 (20.06.2001) US
 - 09/974,366 10 October 2001 (10.10.2001) US
 - (71) Applicants and
 - (72) Inventors: HICKMAN, Heather [US/US]; 700 NW 49th Street, Oklahoma City, OK 73118 (US). HILDEBRAND, William [US/US]; 900 Northcreek Drive, Edmond, OK 73034 (US).
 - (74) Agents: PALMER, John et al.; Ladas & Parry, 5670 Wilshire Boulevard, Suite 2100, Los Angeles, CA 90036-5679 (US).
 - (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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, 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): 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
- 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.*



(54) Title: COMPARATIVE LIGAND MAPPING FROM MHC POSITIVE CELLS



(57) Abstract: The present invention relates generally to a methodology for the isolation, purification and identification of peptide ligands presented by MHC positive cells. In particular, the methodology of the present invention relates to the isolation, purification and identification of these peptide ligands from soluble class I and class II MHC molecules which may be uninfected, infected, or tumorigenic. The methodology of the present invention broadly allows for these peptide ligands and their concomitant source proteins thereof to be identified and used as markers for infected versus uninfected cells and/or tumorigenic versus nontumorigenic cells with said identification being useful for marking or targeting a cell for therapeutic treatment or priming the immune response against infected cells.

WO 02/30964 A2

WO 02/30964

PCT/US01/31931

COMPARATIVE LIGAND MAPPING FROM MHC POSITIVE CELLS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of: provisional patent application U.S. Serial No. 60/240,143, filed October 10, 2000, entitled "C-TERMINAL EPITOPE TAGGING FACILITATES COMPARATIVE LIGAND MAPPING FROM MHC CLASS I POSITIVE CELLS"; provisional patent application U.S. Serial No. 60/299,452, filed June 20, 2001, entitled "HIV EPITOPES IDENTIFIED BY THE METHOD OF C-TERMINAL EPITOPE TAGGING FOR COMPARATIVE LIGAND MAPPING FROM MHC CLASS I POSITIVE CELLS"; provisional patent application U.S. Serial No. 60/256,410, filed December 18, 2000, entitled "HLA PRODUCTION FROM GENOMIC DNA"; provisional patent application U.S. Serial No. 60/256,409, entitled "HLA PRODUCTION FROM cDNA" filed December 18, 2000; and provisional patent application U.S. Serial No. not yet assigned, entitled "PRODUCTION OF SOLUBLE HUMAN HLA CLASS I PROTEINS FROM GENOMIC DNA" filed October 9, 2001 all of which are expressly incorporated herein by reference.

STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED RESEARCH OR DEVELOPMENT

This work was funded in part by a contract from the National Institutes of Health: Contract number: NO1-AI-95360 entitled "Mapping and Characterization of Viral Epitopes". As such, the Government may own certain rights in and to this application.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. Field of the Invention

The present invention relates generally to a methodology for the isolation, purification and identification of peptide ligands presented by MHC positive cells. In particular, the methodology of the present invention relates to the isolation, purification and identification of these peptide ligands from soluble class I and class II MHC molecules which may be uninfected, infected, or tumorigenic. The methodology of the present invention broadly allows for these peptide ligands and their concomitant source proteins thereof to be identified and used as markers for infected versus uninfected cells and/or tumorigenic versus nontumorigenic cells with said identification being useful for marking or targeting a cell for therapeutic treatment or priming the immune response against infected cells.

2. Description of the Background Art

Class I major histocompatibility complex (MHC) molecules, designated HLA class I in humans, bind and display peptide antigen ligands upon the cell surface. The peptide antigen ligands presented by the class I MHC molecule are derived from either normal endogenous proteins ("self") or foreign proteins ("nonself") introduced into the cell. Nonself proteins may be products of malignant transformation or intracellular pathogens such as viruses. In this manner, class I MHC molecules convey information regarding the internal fitness of a cell to immune effector cells including but not limited to, CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTLs), which are activated upon interaction with "nonself" peptides, thereby lysing or killing the cell presenting such

"nonself" peptides.

Class II MHC molecules, designated HLA class II in humans, also bind and display peptide antigen ligands upon the cell surface. Unlike class I MHC molecules which are expressed on virtually all nucleated cells, class II MHC molecules are normally confined to specialized cells, such as B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and other antigen presenting cells which take up foreign antigens from the extracellular fluid via an endocytic pathway. The peptides they bind and present are derived from extracellular foreign antigens, such as products of bacteria that multiply outside of cells, wherein such products include protein toxins secreted by the bacteria that often times have deleterious and even lethal effects on the host (e.g. human). In this manner, class II molecules convey information regarding the fitness of the extracellular space in the vicinity of the cell displaying the class II molecule to immune effector cells, including but not limited to, CD4⁺ helper T cells, thereby helping to eliminate such pathogens the examination of such pathogens is accomplished by both helping B cells make antibodies against microbes, as well as toxins produced by such microbes, and by activating macrophages to destroy ingested microbes.

Class I and class II HLA molecules exhibit extensive polymorphism generated by systematic recombinatorial and point mutation events; as such, hundreds of different HLA types exist throughout the world's population, resulting in a large immunological diversity. Such extensive HLA diversity throughout the population results in tissue or organ transplant rejection between individuals as well as differing susceptibilities and/or resistances to infectious diseases. HLA molecules also contribute significantly to

autoimmunity and cancer. Because HLA molecules mediate most, if not all, adaptive immune responses, large quantities of pure isolated HLA proteins are required in order to effectively study transplantation, autoimmunity disorders, and for vaccine development.

There are several applications in which purified, individual class I and class II MHC proteins are highly useful. Such applications include using MHC-peptide multimers as immunodiagnostic reagents for disease resistance/autoimmunity; assessing the binding of potentially therapeutic peptides; elution of peptides from MHC molecules to identify vaccine candidates; screening transplant patients for preformed MHC specific antibodies; and removal of anti-HLA antibodies from a patient. Since every individual has differing MHC molecules, the testing of numerous individual MHC molecules is a prerequisite for understanding the differences in disease susceptibility between individuals. Therefore, purified MHC molecules representative of the hundreds of different HLA types existing throughout the world's population are highly desirable for unraveling disease susceptibilities and resistances, as well as for designing therapeutics such as vaccines.

Class I HLA molecules alert the immune response to disorders within host cells. Peptides, which are derived from viral- and tumor-specific proteins within the cell, are loaded into the class I molecule's antigen binding groove in the endoplasmic reticulum of the cell and subsequently carried to the cell surface. Once the class I HLA molecule and its loaded peptide ligand are on the cell surface, the class I molecule and its peptide ligand are accessible to cytotoxic T lymphocytes (CTL). CTL survey the peptides presented by the class I molecule and destroy those cells harboring ligands derived from

infectious or neoplastic agents within that cell.

While specific CTL targets have been identified, little is known about the breadth and nature of ligands presented on the surface of a diseased cell. From a basic science perspective, many outstanding questions have permeated through the art regarding peptide exhibition. For instance, it has been demonstrated that a virus can preferentially block expression of HLA class I molecules from a given locus while leaving expression at other loci intact. Similarly, there are numerous reports of cancerous cells that fail to express class I HLA at particular loci. However, there are no data describing how (or if) the three classical HLA class I loci differ in the immunoregulatory ligands they bind. It is therefore unclear how class I molecules from the different loci vary in their interaction with viral- and tumor-derived ligands and the number of peptides each will present.

Discerning virus- and tumor-specific ligands for CTL recognition is an important component of vaccine design. Ligands unique to tumorigenic or infected cells can be tested and incorporated into vaccines designed to evoke a protective CTL response. Several methodologies are currently employed to identify potentially protective peptide ligands. One approach uses T cell lines or clones to screen for biologically active ligands among chromatographic fractions of eluted peptides. (Cox et al., Science, vol 264, 1994, pages 716-719, which is expressly incorporated herein by reference in its entirety) This approach has been employed to identify peptide ligands specific to cancerous cells. A second technique utilizes predictive algorithms to identify peptides capable of binding to a particular class I molecule based upon previously determined motif and/or individual ligand sequences. (De Groot

et al., Emerging Infectious Diseases, (7) 4, 2001, which is expressly incorporated herein by reference in its entirety) Peptides having high predicted probability of binding from a pathogen of interest can then be synthesized and tested for T cell reactivity in precursor, tetramer or ELISpot assays.

However, there has been no readily available source of individual HLA molecules. The quantities of HLA protein available have been small and typically consist of a mixture of different HLA molecules. Production of HLA molecules traditionally involves growth and lysis of cells expressing multiple HLA molecules. Ninety percent of the population is heterozygous at each of the HLA loci; codominant expression results in multiple HLA proteins expressed at each HLA locus. To purify native class I or class II molecules from mammalian cells requires time-consuming and cumbersome purification methods, and since each cell typically expresses multiple surface-bound HLA class I or class II molecules, HLA purification results in a mixture of many different HLA class I or class II molecules. When performing experiments using such a mixture of HLA molecules or performing experiments using a cell having multiple surface-bound HLA molecules, interpretation of results cannot *directly* distinguish between the different HLA molecules, and one cannot be certain that any particular HLA molecule is responsible for a given result. Therefore, a need existed in the art for a method of producing substantial quantities of individual HLA class I or class II molecules so that they can be readily purified and isolated independent of other HLA class I or class II molecules. Such individual HLA molecules, when provided in sufficient quantity and purity, would provide a powerful tool for studying and measuring

immune responses.

Therefore, there exists a need in the art for improved methods of epitope discovery and comparative ligand mapping for class I and class II MHC molecules, including methods of distinguishing an infected/tumor cell from an uninfected/non-tumor cell. The present invention solves this need by coupling the production of soluble HLA molecules with an epitope isolation, discovery, and direct comparison methodology.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1. Overview of 2-stage PCR strategy to amplify a truncated version of the human class I MHC.

FIG. 2. Edman sequence analysis of soluble B*1501, B*1501-HIS and B*1501-FLAG. Residue intensity was categorized as either dominant (3.5-fold or more picomolar increase over previous round) or strong (2.5 to 3.5-fold increase over prior round).

FIG. 3. Representative MS ion maps from soluble B*1501, B*1501-HIS and B*1501-FLAG illustrating ion overlap between the molecules. Pooled, acid-eluted peptides were fractionated by RP-HPLC, and the individual fractions were MS scanned.

FIG. 4. Fragmentation pattern generated by MS/MS on an ion selected from fraction 11 of B*1501, B*1501-HIS and B*1501-FLAG peptides illustrating a sequence-level overlap between the three molecules.

FIG. 5. Flow chart of the epitope discovery of C-terminal-tagged sHLA molecules. Class I positive transfectants are infected with a pathogen of choice and sHLA preferentially purified utilizing the tag. Subtractive comparison of MS ion maps yields ions present only in infected cell, which are

then MS/MS sequenced to derive class I epitopes.

FIG. 6. MS ion map from soluble B*0702 SupT1 cells uninfected and infected with HIV MN-1. Pooled, acid-eluted peptides were fractionated by RP-HPLC, and fraction #30 was MS scanned.

FIG. 7. MS ion map similar to FIG. 6 but zoomed in on the area from 482-488 amu to more clearly identify all ions in the immediate area.

FIG. 8. Fragmentation pattern generated by tandem mass spectrometry of the peptide ion 484.72 isolated from infected soluble B*0702 SupT1 cells.

FIG. 9. Results of a PubMed BLAST search with the sequence GPRTAALGLL identified in FIG. 8.

FIG. 10. Summary of Results of Entrez-PubMed search for the word "reticulocalbin".

FIG. 11. Results of a peptide-binding algorithm performed using Parker's Prediction using the entire source protein, reticulocalbin, which generates a list of peptides which are bound by the B*0702 HLA allele.

FIG. 12. Results of a peptide-binding algorithm performed using Rammensee's SYPEITHI Prediction using the entire source protein, reticulocalbin, which generates a list of peptides which are bound by the B*0702 HLA allele.

FIG. 13. Results of a predicted proteasomal cleavage of the complete reticulocalbin protein using the cleavage predictor PaProC.

FIG. 14. Results of a predicted proteasomal cleavage of the complete reticulocalbin protein using the cleavage predictor NetChop 2.0.

FIG. 15. Several high affinity peptides deriving from reticulocalbin were identified as peptides predicted to be presented by HLA-A*0201 and A*0101.

FIG. 16. MS ion maps from soluble B*0702 uninfected SupT1 cells of fractions 29 and 31 to determine that ion 484.72 was not present.

FIG. 17. Fragmentation patterns of soluble B*0702 uninfected SupT1 cells fraction 30 ion 484.72 under identical MS collision conditions to illustrate the absence of the reticulocalbin peptide in the uninfected cells.

FIG. 18. Comparison of the MS/MS fragmentation patterns of synthetic peptide GPRTAALGLL and peptide ion 484.72 isolated from infected soluble B*0702 SupT1 cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before explaining at least one embodiment of the invention in detail by way of exemplary drawings, experimentation, results, and laboratory procedures, it is to be understood that the invention is not limited in its application to the details of construction and the arrangement of the components set forth in the following description or illustrated in the drawings, experimentation and/or results. The invention is capable of other embodiments or of being practiced or carried out in various ways. As such, the language used herein is intended to be given the broadest possible scope and meaning; and the embodiments are meant to be exemplary - not exhaustive. Also, it is to be understood that the phraseology and terminology employed herein is for the purpose of description and should not be regarded as limiting.

The present invention generally relates to a method of epitope discovery and comparative ligand mapping as well as methods of distinguishing infected/tumor cells from uninfected/non-tumor cells. The present method broadly includes the following steps: (1) providing a cell line

containing a construct that encodes an individual soluble class I or class II MHC molecule (wherein the cell line is capable of naturally processing self or nonself proteins into peptide ligands capable of being loaded into the antigen binding grooves of the class I or class II MHC molecules); (2) culturing the cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I or class II MHC molecule from the construct, with such conditions also allowing for the endogenous loading of a peptide ligand (from the self or non-self processed protein) into the antigen binding groove of each individual soluble class I or class II MHC molecule prior to secretion of the soluble class I or class II MHC molecules having the peptide ligands bound thereto; and (4) separating the peptide ligands from the individual soluble class I or class II MHC molecules.

The methods of the present invention may, in one embodiment, utilize a method of producing MHC molecules (from genomic DNA or cDNA) that are secreted from mammalian cells in a bioreactor unit. Substantial quantities of individual MHC molecules are obtained by modifying class I or class II MHC molecules so that they are capable of being secreted, isolated, and purified. Secretion of soluble MHC molecules overcomes the disadvantages and defects of the prior art in relation to the quantity and purity of MHC molecules produced. Problems of quantity are overcome because the cells producing the MHC do not need to be detergent lysed or killed in order to obtain the MHC molecule. In this way the cells producing secreted MHC remain alive and therefore continue to produce MHC. Problems of purity are overcome because the only MHC molecule secreted from the cell is the one that has specifically been constructed to be secreted. Thus, transfection of vectors encoding such

secreted MHC molecules into cells which may express endogenous, surface bound MHC provides a method of obtaining a highly concentrated form of the transfected MHC molecule as it is secreted from the cells. Greater purity is assured by transfecting the secreted MHC molecule into MHC deficient cell lines.

Production of the MHC molecules in a hollow fiber bioreactor unit allows cells to be cultured at a density substantially greater than conventional liquid phase tissue culture permits. Dense culturing of cells secreting MHC molecules further amplifies the ability to continuously harvest the transfected MHC molecules. Dense bioreactor cultures of MHC secreting cell lines allow for high concentrations of individual MHC proteins to be obtained. Highly concentrated individual MHC proteins provide an advantage in that most downstream protein purification strategies perform better as the concentration of the protein to be purified increases. Thus, the culturing of MHC secreting cells in bioreactors allows for a continuous production of individual MHC proteins in a concentrated form.

The method of producing MHC molecules utilized in the present invention begins by obtaining genomic or complementary DNA which encodes the desired MHC, class I or class II molecule. Alleles at the locus which encode the desired MHC molecule are PCR amplified in a locus specific manner. These locus specific PCR products may include the entire coding region of the MHC molecule or a portion thereof. In one embodiment a nested or hemi-nested PCR is applied to produce a truncated form of the class I or class II gene so that it will be secreted rather than anchored to the cell surface. In another embodiment the PCR will directly truncate the MHC

molecule.

Locus specific PCR products are cloned into a mammalian expression vector and screened with a variety of methods to identify a clone encoding the desired MHC molecule. The cloned MHC molecules are DNA sequenced to insure fidelity of the PCR. Faithful truncated clones of the desired MHC molecule are then transfected into a mammalian cell line. When such cell line is transfected with a vector encoding a recombinant class I molecule, such cell line may either lack endogenous class I MHC molecule expression or express endogenous class I MHC molecules. One of ordinary skill of the art would note the importance, given the present invention, that cells expressing endogenous class I MHC molecules may spontaneously release MHC into solution upon natural cell death. In cases where this small amount of spontaneously released MHC is a concern, the transfected class I MHC molecule can be "tagged" such that it can be specifically purified away from spontaneously released endogenous class I molecules in cells that express class I molecules. For example, a DNA fragment encoding a HIS tail may be attached to the protein by the PCR reaction or may be encoded by the vector into which the PCR fragment is cloned, and such HIS tail, therefore, further aids in the purification of the class I MHC molecules away from endogenous class I molecules. Tags beside a histidine tail have also been demonstrated to work, and one of ordinary skill in the art of tagging proteins for downstream purification would appreciate and know how to tag a MHC molecule in such a manner so as to increase the ease by which the MHC molecule may be purified.

Cloned genomic DNA fragments contain both exons and introns as well.

as other non-translated regions at the 5' and 3' termini of the gene. Following transfection into a cell line which transcribes the genomic DNA (gDNA) into RNA, cloned genomic DNA results in a protein product thereby removing introns and splicing the RNA to form messenger RNA (mRNA), which is then translated into an MHC protein. Transfection of MHC molecules encoded by gDNA therefore facilitates reisolation of the gDNA, mRNA/cDNA, and protein. Production of MHC molecules in non-mammalian cell lines such as insect and bacterial cells requires cDNA clones, as these lower cell types do not have the ability to splice introns out of RNA transcribed from a gDNA clone. In these instances the mammalian gDNA transfectants of the present invention provide a valuable source of RNA which can be reverse transcribed to form MHC cDNA. The cDNA can then be cloned, transferred into cells, and then translated into protein. In addition to producing secreted MHC, such gDNA transfectants therefore provide a ready source of mRNA, and therefore cDNA clones, which can then be transfected into non-mammalian cells for production of MHC. Thus, the present invention which starts with MHC genomic DNA clones allows for the production of MHC in cells from various species.

A key advantage of starting from gDNA is that viable cells containing the MHC molecule of interest are not needed. Since all individuals in the population have a different MHC repertoire, one would need to search more than 500,000 individuals to find someone with the same MHC complement as a desired individual – such a practical example of this principle is observed when trying to find a donor to match a recipient for bone marrow transplantation. Thus, if it is desired to produce a particular MHC molecule

for use in an experiment or diagnostic, a person or cell expressing the MHC allele of interest would first need to be identified. Alternatively, in the method of the present invention, only a saliva sample, a hair root, an old freezer sample, or less than a milliliter (0.2 ml) of blood would be required to isolate the gDNA. Then, starting from gDNA, the MHC molecule of interest could be obtained via a gDNA clone as described herein, and following transfection of such clone into mammalian cells, the desired protein could be produced directly in mammalian cells or from cDNA in several species of cells using the methods of the present invention described herein.

Current experiments to obtain an MHC allele for protein expression typically start from mRNA, which requires a fresh sample of mammalian cells that express the MHC molecule of interest. Working from gDNA does not require gene expression or a fresh biological sample. It is also important to note that RNA is inherently unstable and is not as easily obtained as is gDNA. Therefore, if production of a particular MHC molecule starting from a cDNA clone is desired, a person or cell line that is expressing the allele of interest must traditionally first be identified in order to obtain RNA. Then a fresh sample of blood or cells must be obtained; experiments using the methodology of the present invention show that ≥ 5 milliliters of blood that is less than 3 days old is required to obtain sufficient RNA for MHC cDNA synthesis. Thus, by starting with gDNA, the breadth of MHC molecules that can be readily produced is expanded. This is a key factor in a system as polymorphic as the MHC system; hundreds of MHC molecules exist, and not all MHC molecules are readily available. This is especially true of MHC molecules unique to isolated populations or of MHC molecules unique to

ethnic minorities. Starting class I or class II MHC molecule expression from the point of genomic DNA simplifies the isolation of the gene of interest and insures a more equitable means of producing MHC molecules for study; otherwise, one would be left to determine whose MHC molecules are chosen and not chosen for study, as well as to determine which ethnic population from which fresh samples cannot be obtained and therefore should not have their MHC molecules included in a diagnostic assay.

While cDNA may be substituted for genomic DNA as the starting material, production of cDNA for each of the desired HLA class I types will require hundreds of different, HLA typed, viable cell lines, each expressing a different HLA class I type. Alternatively, fresh samples are required from individuals with the various desired MHC types. The use of genomic DNA as the starting material allows for the production of clones for many HLA molecules from a single genomic DNA sequence, as the amplification process can be manipulated to mimic recombinatorial and gene conversion events. Several mutagenesis strategies exist whereby a given class I gDNA clone could be modified at either the level of gDNA or at the cDNA resulting from this gDNA clone. The process of producing MHC molecules utilized in the present invention does not require viable cells, and therefore the degradation which plagues RNA is not a problem.

The soluble class I MHC proteins produced by the method described herein is utilized in the methods of epitope discovery and comparative ligand mapping of the present invention. The methods of epitope discovery and comparative ligand mapping described herein which utilize secreted individual MHC molecules have several advantages over the prior art, which utilized

MHC from cells expressing multiple membrane-bound MHCs. While the prior art method could distinguish if an epitope was presented on the surface of a cell, this prior art method is unable to directly distinguish in which specific MHC molecule the peptide epitope was bound. Lengthy purification processes might be used to try and obtain a single MHC molecule, but doing so limits the quantity and usefulness of the protein obtained. The novelty and flexibility of the current invention is that individual MHC specificities can be utilized in sufficient quantity through the use of recombinant, soluble MHC proteins.

Class I and class II MHC molecules are really a trimolecular complex consisting of an alpha chain, a beta chain, and the alpha/beta chain's peptide cargo (i.e. peptide ligand) which is presented on the cell surface to immune effector cells. Since it is the peptide cargo, and not the MHC alpha and beta chains, which marks a cell as infected, tumorigenic, or diseased, there is a great need to identify and characterize the peptide ligands bound by particular MHC molecules. For example, characterization of such peptide ligands greatly aids in determining how the peptides presented by a person with MHC-associated diabetes differ from the peptides presented by the MHC molecules associated with resistance to diabetes. As stated above, having a sufficient supply of an individual MHC molecule, and therefore that MHC molecule's bound peptides, provides a means for studying such diseases. Because the method of the present invention provides quantities of MHC protein previously unobtainable, unparalleled studies of MHC molecules and their important peptide cargo can now be facilitated.

Therefore, the present invention is also related to methods of epitope

discovery and comparative ligand mapping which can be utilized to distinguish infected/tumor cells from uninfected/non-tumor cells by unique epitopes presented by MHC molecules in the disease or non-disease state.

Creation of sHLA molecules from genomic DNA (gDNA)

1. Genomic DNA Extraction. 200 μ l of sample either blood, plasma, serum, buffy coat, body fluid or up to 5×10^6 lymphocytes in 200 μ l Phosphate buffered saline were used to extract genomic DNA using the QIAamp® DNA Blood Mini Kit blood and body fluid spin protocol. Genomic DNA quality and quantity was assessed using optical density readings at 260nm and 280nm.

2.1 PCR Strategy. Primers were designed for HLA-A, -B and -C loci in order to amplify a truncated version of the human class I MHC using a 2 stage PCR strategy. The first stage PCR uses a primer set that amplify from the 5' Untranslated region to Intron 4. This amplicon is used as a template for the second PCR which results in a truncated version of the MHC Class I gene by utilizing a 3' primer that sits down in exon 4, the 5' primer remains the same as the 1st PCR. An overview can be seen in FIG. 1. The primers for each locus are listed in TABLE I. Different HLA-B locus alleles require primers with different restriction cut sites depending on the nucleotide sequence of the allele. Hence there are two 5' and two 3' truncating primers for the -B locus.

TABLE I

| Primer name | Sequence 5'-3' | Locus | Cut site | Amplifying site | Seq. ID NO. |
|-------------|--------------------------------------|--------|----------|-----------------|-------------|
| 3P5171A | GCGCTTAGCCGACGCCGAGGATGGCC | A | XbaI | SUT | 1 |
| 3P5171A | GCCCGACCCCTGCTAAAGGT | A | XbaI | Intron 4 | 2 |
| 3P5171B | GCCCTCAGACCACCTGGACTCAGAATCTCT | B | XbaI | SUT | 3 |
| 3P5171B | TGCTTCCCTGAGAGAGAT | B | XbaI | Intron 4 | 4 |
| 3P51E39 | AGCGGAATTCAGAGTCTCTCAGACGG | B*39 | EcoRI | SUT B39 | 5 |
| 3P51CE | GGCGAATTCGGCGCCACCAATGGGGTCAITGGCCCC | C | EcoRI | SUT | 6 |
| 3P51FC | TCTGCTTCTGAGAGAC | C | EcoRI | Intron 4 | 7 |
| 3P51T | GGCGAATTCGGACTCAGAATTCGCCGACCGCGAG | B | EcoRI | SUT | 8 |
| 3P51H | CCCGAATTCATCTCAGGGTGAAGGGCT | A,B,C | EcoRI | Exon 4 | 9 |
| 3P51FH | CCCGAATTCATCTCAGGGTGAAGGGCT | A,B,C | HindIII | Exon 4 | 10 |
| 3P51HC7 | CCCGAATTCATCTCAGGGTGAAGGGCT | C/*407 | HindIII | Exon 4 | 11 |

2.2 Primary PCR. Materials: An Eppendorf Gradient Mastercycler is used for all PCR. (1) H₂O:Dionized ultrafiltered water (DIUF) Fisher Scientific, W2-4,41. (2) PCR nucleotide mix (10 mM each deoxyribonucleoside triphosphate [dNTP]), Boehringer Mannheim, #1814, 362. (3) 10X *Pfx* Amplification buffer, pH 9.0, GibcoBRL®, part # 52806, formulation is proprietary information. (4) 50mM MgSO₄, GibcoBRL®, part #52044. (5) Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (B Locus only), GibcoBRL®, 11708-013. (6) *Pfu* DNA Polymerase (A and C Locus), Promega, M7741. (7) *Pfu* DNA Polymerase 10x reaction Buffer with MgSO₄, 200mM Tris-HCL, pH 8.8, 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgSO₄, 1mg/ml nuclease free BSA, 1% Triton®X-100. (8) Amplification primers (in ng/μl) (see TABLE I): A locus: 5' sense PP5UTA (300); 3'antisense PPI4A (300); B locus (Not B*39's): sense PP5UTB (300); antisense PPI4B (300); B locus (B*39's): sense 5UTB39 (300); antisense PPI4B (300); C Locus : sense 5PKCE (300); antisense PPI4C (300). (9) gDNA Template.

2.3 Secondary PCR (also used for colony PCR). (1) H₂O:Dionized ultrafiltered water (DIUF) Fisher Scientific, W2-4,41. (2) PCR nucleotide mix (10 mM each deoxyribonucleoside triphosphate [dNTP]), Boehringer Mannheim, #1814, 362. (3) *Pfu* DNA Polymerase (A and C Locus), Promega, M7741. (4) *Pfu* DNA Polymerase 10x reaction Buffer with MgSO₄, 200mM Tris-HCL, pH 8.8, 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 20mM MgSO₄, 1mg/ml nuclease free BSA, 1% Triton®X-100. (5) Amplification primers (in ng/μl) see TABLE I: A-locus: 5' sense PP5UTA (300), 3' antisense PP3PEI (300); B-locus: sense PP5UTB (300), antisense PP3PEI (300); B-locus: sense PP5UT (300), antisense

PP3PEIH (300); B-locus B39's: sense 5UTB39 (300), antisense PP3PEIH (300); C-locus: sense 5PKCE (300), antisense PP3PEI (300); C-locus Cw*7's: sense 5PKCE (300), antisense 3PEIHC7 (300). (6) Template 1:100 dilution of the primary PCR product.

2.4 Gel Purification of PCR products and vectors. (1) Dark Reader Tansilluminator Model DR-45M, Clare Chemical Research. (2) SYBR Green, Molecular Probes Inc. (3) Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns, Bio-Rad Laboratories, 732-6165.

2.5 Restriction digests, Ligation and Transformation. (1) Restriction enzymes from New England Biolabs: (a) EcoR I #R0101S; (b) Hind III #R0104S; (c) Xba I #R0145S. (2) T4 DNA Ligase, New England Biolabs, #M0202S. (3) pcDNA3.1(-), Invitrogen Corporation, V795-20. (4) 10x Buffers from New England Biolabs: (a) EcoR I buffer, 500mM NaCl, 1000mM Tris-HCL, 10mM MgCl₂, 0.25% Triton-X 100, pH 7.5; (b) T4 DNA ligase buffer, 500mM Tris-HCL, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP, 250ug/ml BSA, pH 7.5; (c) NEB buffer 2, 500mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM DDT, pH 7.9. (5) 100x BSA, New England Biolabs. (6) Z-Competent *E. coli* Transformation Buffer Set, Zymo Research, T3002. (7) *E. coli* strain JM109. (8) LB Plates with 100 µg/ml ampicillin. (9) LB media with 100 µg/ml ampicillin.

2.6 Plasmid Extraction: Wizard Plus SV minipreps, Promega, #A1460.

2.7 Sequencing of Clones. (1) Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit, Amersham Pharmacia Biotech, 25-2538-01. (2) CY5 labelled primers.

(see TABLE II). (3) ABIExpress automated DNA sequencer, Amersham
Pharmacia Biotech.

TABLE II

| Primer Name | Sequence 5'-3' | Seq. ID NO. |
|-------------|----------------------|-------------|
| Z/Prim | TAAATCGAGTCACTATAGGG | 12 |
| B/Prim | TAGAAGGCACATCGAGG | 13 |
| FP2/R | GTCTGACCTGGGCCCC | 14 |
| FP2/F | TTTCATTTTCAGTTAGGCCA | 15 |
| APC/BEF | GGTGTCCGTCCATTCTCA | 16 |

2.8 Gel Casting. (1) PagePlus 40% concentrate, Amresco, E562, 500ml. (2) Urea, Amersham Pharmacia Biotech, 17-0889-01,500g. (3) 3 N'N'N'N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), APB. (4) Ammonium persulphate (10% solution), APB. (5) Boric acid, APB. (6) EDTA-disodium salt, APB. (7) Tris, APB. (8) Bind-Saline, APB. (9) Isopropanol, Sigma. (10) Glacial Acetic Acid, Fisher Biotech. (11) DIUF water, Fisher Scientific. (12) EtOH 200-proof.

2.9 Plasmid Preparation for Electroporation. Qiagen Plasmid Midi kit, Qiagen Inc., 12143.

3.0 Electroporation. (1) Biorad Gene Pulser with capacitance extender, Bio-Rad Laboratories. (2) Gene Pulser Cuvette, Bio-Rad Laboratories. (3) Cytomix: 120mM KCl, 0.15mM CaCl₂, 10mMK₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.6, 25mM Hepes, pH 7.6, 2mM EGTA, pH 7.6, 5mM MgCl₂, pH 7.6 with KOH. (4) RPMI 1640+ 20% Foetal Calf Serum + Pen/strep. (5) Haemocytometer. (6) Light Microscope. (7) CO₂ 37° Incubator. (8) Cells in log phase.

Primary PCR

c. A-Locus and C-Locus

| | |
|-----------------------|---------|
| 10x Pfu buffer | 5 µl |
| 5' Primer (300ng/µl) | 1 µl |
| 3' Primer (300ng/µl) | 1 µl |
| dNTP's (10mM each) | 1 µl |
| gDNA (50ng/µl) | 10 µl |
| DIUF H ₂ O | 31.4 µl |
| Pfu DNA Polymerase | 0.6 µl |
| 96°C 2 min | } x35 |
| 95°C 1 min | |
| 58°C 1 min | |
| 73°C 5 min | |

WO 02/30964

24

PCT/US01/31931

d. B-locus

| | |
|----------------------------|-------------|
| 10x Pfx buffer | 5 μ l |
| 5' Primer (300ng/ μ l) | 1 μ l |
| 3' Primer (300ng/ μ l) | 1 μ l |
| dNTP's (10mM each) | 1.5 μ l |
| MgSO ₄ (50mM) | 1 μ l |
| gDNA (100ng/ μ l) | 1 μ l |
| DIUF H ₂ O | 40 μ l |
| Pfx DNA Polymerase | 0.5 μ l |
| 94°C 2 min. | |
| 94°C 1 min | } x35 |
| 60°C 1 min | |
| 68°C 3.5 min | |
| 68°C 5 min | |

Gel Purification of PCR (all PCR and plasmids are gel purified)

Mix primary PCR with 5 μ l of 1x SYBR green and incubate at room temperature for 15 minutes then load on a 1% agarose gel. Visualize on the Dark Reader and purify using the Quantum Prep Freeze and Squeeze extraction kit according to the manufacturers instructions.

Secondary PCR

A, B and C Loci

| | |
|----------------------------|--------------|
| 10x Pfu buffer | 5 μ l |
| 5' Primer (300ng/ μ l) | 0.5 μ l |
| 3' Primer (300ng/ μ l) | 0.5 μ l |
| dNTP's (10mM each) | 1 μ l |
| 1:100 1 st PCR | 10 μ l |
| DIUF H ₂ O | 37.5 μ l |
| Pfu DNA Polymerase | 0.5 μ l |
| 96°C 2 min. | |
| 95°C 1 min | } x35 |
| 58°C 1 min | |
| 73°C 4 min | |
| 73°C 7 min | |

Restriction digests

| | |
|------------------------------------|------------|
| 2 nd PCR (gel purified) | 30 μ l |
|------------------------------------|------------|

WO 02/30964

25

PCT/US01/31931

| | |
|-----------------------|--------------|
| Restriction enzyme 2 | X μ l |
| 10x buffer | 5 μ l |
| 100x BSA | 0.5 μ l |
| DIUF H ₂ O | 10.5 μ l |

The enzymes used will be determined by the cut sites incorporated into the PCR primers for each individual PCR. The expression vector pcDNA3.1(-) will be cut in a similar manner.

Ligation

| | |
|--|------------------|
| PcDNA3.1(-) cut with same enzymes as PCR | 50ng |
| Cut PCR | 100ng |
| 10x T4 DNA ligase buffer | 2 μ l |
| T4 DNA Ligase | 1 μ l |
| DIUF H ₂ O | up to 20 μ l |

Transformation

Transform JM109 using competent cells made using Z-competent *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set and follow the manufacturers instructions.

Colony PCR

This will check for insert in any transformed cells. Follow the same protocol for the secondary PCR.

Mini Preps of colonies with insert

Use the Wizard Plus SV minipreps and follow the manufacturers instructions. Make glycerol stocks before beginning extraction protocol.

Sequencing of positive clones

Using the Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit

| | |
|-----------------------------|-----------|
| A, C, G or T mix | 3 μ l |
| CY5 Primer 1pm/ μ l | 1 μ l |
| DNA template 100ng/ μ l | 5 μ l |
| 96oC 2 min | } x25 |
| 96oC 30 sec | |
| 61oC 30 sec | |

Add 6 μ l formamide loading buffer and load 10 μ l onto sequencing gel. Analyse sequence for good clones with no misincorporations.

Midi Preps

Prepare plasmid for electroporation using the Qiagen Plasmid Midi Kit according to the manufacturers instructions.

Electroporation

Electroporations are performed as described in "The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. Gumperz, J.E., V. Litwin, J.H. Phillips, L.L. Lanier and P. Parham. J. Exp. Med. 181:1133-1144, 1995, which is expressly incorporated herein by reference."

Screening for production of Soluble HLA

An ELISA is used to screen for the production of soluble HLA. For biochemical analysis, monomorphic monoclonal antibodies are particularly useful for identification of HLA locus products and their subtypes.

W6/32 is one of the most common monoclonal antibodies (mAb) used to characterize human class I major histocompatibility complex (MHC) molecules. It is directed against monomorphic determinants on HLA-A, -B and -C HCs, which recognizes only mature complexed class I molecules and recognizes a conformational epitope on the intact MHC molecule containing both beta2-microglobulin (β 2m) and the heavy chain (HC). W6/32 binds a compact epitope on the class I molecule that includes both residue 3 of beta2m and residue 121 of the heavy chain (Ladasky JJ, Shum BP, Canavez F, Seuanez HN, Parham P. Residue 3 of beta2-microglobulin affects binding of class I MHC molecules by the W6/32 antibody. Immunogenetics 1999

Apr;49(4):312-20.). The constant portion of the molecule W6/32 binds to is recognized by CTLs and thus can inhibit cytotoxicity. The reactivity of W6/32 is sensitive to the amino terminus of human beta2-microglobulin (Shields MJ, Ribaudo RK. Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of beta2-microglobulin. Tissue Antigens 1998 May;51(5):567-70). HLA-C could not be clearly identified in immunoprecipitations with W6/32 suggesting that HLA-C locus products may be associated only weakly with b2m, explaining some of the difficulties encountered in biochemical studies of HLA-C antigens [Stam, 1986 #1]. The polypeptides correlating with the C locus products are recognized far better by HC-10 than by W6/32 which confirms that at least some of the C products may be associated with b2m more weakly than HLA-A and -B. W6/32 is available biotinylated (Serotec MCA81B) offering additional variations in ELISA procedures.

HC-10 is reactive with almost all HLA-B locus free heavy chains. The A2 heavy chains are only very weakly recognized by HC-10. Moreover, HC-10 reacts only with a few HLA-A locus heavy chains. In addition, HC-10 seems to react well with free heavy chains of HLA-C types. No evidence for reactivity of HC-10 with heavy-chain/b2m complex has been obtained. None of the immunoprecipitates obtained with HC-10 contained b2m [Stam, 1986 #1]. This indicates that HC-10 is directed against a site of the HLA class I heavy chain that includes the portion involved in interaction with the β 2m. The pattern of HC-10 precipitated material is qualitatively different from that isolated with W6/32.

TP25.99 detects a determinant in the alpha3 domain of HLA-ABC. It is found on denatured HLA-B (in Western) as well as partially or fully folded

HLA-A,B,& C. It doesn't require a peptide or $\beta 2m$, i.e. it works with the alpha 3 domain which folds without peptide. This makes it useful for HC determination.

Anti-human $\beta 2m$ (HRP) (DAKO P0174) recognizes denatured as well as complexed $\beta 2m$. Although in principle anti- $\beta 2m$ reagents could be used for the purpose of identification of HLA molecules, they are less suitable when association of heavy chain and $\beta 2m$ is weak. The patterns of class I molecules precipitated with W6/32 and anti- $\beta 2m$ are usually indistinguishable [Vasilov, 1983 #10].

Rabbit anti- $\beta 2$ -microglobulin dissociates $\beta 2$ -microglobulin from heavy chain as a consequence of binding (Rogers, M.J., Appella, E., Pierotti, M. A., Invernizzi, G., and Parmiani, G. (1979) Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1415-1419). It also has been reported that rabbit anti-human $\beta 2$ -microglobulin dissociates $\beta 2$ -microglobulin from HLA heavy chains upon binding (Nakamura, K., Tanigaki, N., and Pressman, D. (1977) Immunology 32, 139-146.). This anti-human $\beta 2m$ antibody is also available unconjugated (DAKO A0072).

The w6/32-HLA sandwich ELISA: Sandwich assays can be used to study a number of aspects of protein complexes. If antibodies are available to different components of a heteropolymer, a two-antibody assay can be designed to test for the presence of the complex. Using a variation of these assays, monoclonal antibodies can be used to test whether a given antigen is multimeric. If the same monoclonal antibody is used for both the solid phase and the label, monomeric antigens cannot be detected. Such combinations, however, may detect multimeric forms of the antigen. In these

assays negative results may be generated both by multimeric antigen held in unfavorable steric positions as well as by monomeric antigens.

The W6/32 - anti- β 2m antibody sandwich assay is one of the best techniques for determining the presence and quantity of sHLA. Two antibody sandwich assays are quick and accurate, and if a source of pure antigen is available, the assay can be used to determine the absolute amounts of antigen in unknown samples. The assay requires two antibodies that bind to non-overlapping epitopes on the antigen. This assay is particularly useful to study a number of aspects of protein complexes.

To detect the antigen (sHLA), the wells of microtiter plates are coated with the specific (capture) antibody W6/32 followed by the incubation with test solutions containing antigen. Unbound antigen is washed out and a different antigen-specific antibody (anti- β 2m) conjugated to HRP is added, followed by another incubation. Unbound conjugate is washed out and substrate is added. After another incubation, the degree of substrate hydrolysis is measured. The amount of substrate hydrolyzed is proportional to the amount of antigen in the test solution.

The major advantages of this technique are that the antigen does not need to be purified prior to use and that the assays are very specific. The sensitivity of the assay depends on 4 factors: (1) The number of capture antibody; (2) The avidity of the capture antibody for the antigen; (3) The avidity of the second antibody for the antigen; (4) The specific activity of the labeled second antibody.

Using an ELISA protocol template and label a clear 96-well polystyrene assay plate. Polystyrene is normally used as a microtiter plate. (Because it

is not translucent, enzyme assays that will be quantitated by a plate reader should be performed in polystyrene and not PVC plates).

Coating of the W6/32 is performed in Tris buffered saline (TBS); pH 8.5. A coating solution of 8.0 µg/ml of specific W6/32 antibody in TBS (pH 8.5) is prepared. (blue tube preparation stored at -20°C with a concentration of 0.2 mg/ml and a volume of 1 ml giving 0.2 mg per tube).

TABLE III

| No. of plates | Total Volume | W6/32 antibody | TBS pH 8.5 |
|---------------|--------------|----------------|------------|
| 1 | 10 ml | 400 µl | 9.6 ml |
| 2 | 20 ml | 800 µl | 19.2 ml |
| 3 | 30 ml | 1200 µl | 28.8 ml |
| 4 | 40 ml | 1600 µl | 38.4 ml |
| 5 | 50 ml | 2000 µl | 48.0 ml |

Although this is well above the capacity of a microtiter plate, the binding will occur more rapidly. Higher concentrations will speed the binding of antigen to the polystyrene but the capacity of the plastic is only about 100 ng/well (300 ng/cm²), so the extra protein will not bind. (If using W6/32 of unknown composition or concentration, first titrate the amount of standard antibody solution needed to coat the plate versus a fixed, high concentration of labeled antigen. Plot the values and select the lowest level that will yield a strong signal. Do not include sodium azide in any solutions when horseradish peroxidase is used for detection.

Immediately coat the microtiter plate with 100 µl of antigen solution per well using a multichannel pipet. Standard polystyrene will bind antibodies or antigens when the proteins are simply incubated with the plastic. The

bonds that hold the proteins are non-covalent, but the exact types of interactions are not known. Shake the plate to ensure that the antigen solution is evenly distributed over the bottom of each well. Seal the plate with plate sealers (sealplate adhesive sealing film, nonsterile, 100 per unit; Phenix; LMT-Seal-EX) or sealing tape to Nunc-Immuno™ Modules (# 236366). Incubate at 4°C overnight. Avoid detergents and extraneous proteins. Next day, remove the contents of the well by flicking the liquid into the sink or a suitable waste container. Remove last traces of solution by inverting the plate and blotting it against clean paper toweling. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance.

Wash the plate 10 times with Wash Buffer (PBS containing 0.05 % Tween-20) using a multi-channel ELISA washer. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper toweling. After the WG/32 is bound, the remaining sites on the plate must be saturated by incubating with blocking buffer made of 3% BSA in PBS. Fill the wells with 200 µl blocking buffer. Cover the plates with an adhesive strip and incubate overnight at 4°C. Alternatively, incubate for at least 2 hours at room temperature which is, however, not the standard procedure. Blocked plates may be stored for at least 5 days at 4°C. Good pipetting practice is most important to produce reliable quantitative results. The tips are just as important a part of the system as the pipette itself. If they are of inferior quality or do not fit exactly, even the best pipette cannot produce satisfactory results. The pipette working position is always vertical: Otherwise causing too much liquid to be drawn in. The immersion depth should be only a few millimeters. Allow the pipetting button to retract

gradually, observing the filling operation. There should be no turbulence developed in the tip, otherwise there is a risk of aerosols being formed and gases coming out of solution.

When maximum levels of accuracy are stipulated, prewetting should be used at all times. To do this, the required set volume is first drawn in one or two times using the same tip and then returned. Prewetting is absolutely necessary on the more difficult liquids such as 3% BSA. Do not prewet, if your intention is to mix your pipetted sample thoroughly with an already present solution. However, prewet only for volumes greater than 10 μl . In the case of pipettes for volumes less than 10 μl the residual liquid film is as a rule taken into account when designing and adjusting the instrument. The tips must be changed between each individual sample. With volumes <10 μl special attention must also be paid to drawing in the liquid slowly, otherwise the sample will be significantly warmed up by the frictional heat generated. Then slowly withdraw the tip from the liquid, if necessary wiping off any drops clinging to the outside.

To dispense the set volume hold the tip at a slight angle, press it down uniformly as far as the first stop. In order to reduce the effects of surface tension, the tip should be in contact with the side of the container when the liquid is dispensed. After liquid has been discharged with the metering stroke, a short pause is made to enable the liquid running down the inside of the tip to collect at its lower end. Then press it down swiftly to the second stop, in order to blow out the tip with the extended stroke with which the residual liquid can be blown out. In cases that are not problematic (e.g. aqueous solutions) this brings about a rapid and virtually complete discharge

of the set volume. In more difficult cases, a slower discharge and a longer pause before actuating the extended stroke can help. To determine the absolute amount of antigen (sHLA), sample values are compared with those obtained using known amounts of pure unlabeled antigen in a standard curve.

For accurate quantitation, all samples have to be run in triplicate, and the standard antigen-dilution series should be included on each plate. Pipetting should be performed without delay to minimize differences in time of incubation between samples. All dilutions should be done in blocking buffer. Thus, prepare a standard antigen-dilution series by successive dilutions of the homologous antigen stock in 3% BSA in PBS blocking buffer. In order to measure the amount of antigen in a test sample, the standard antigen-dilution series needs to span most of the dynamic range of binding. This range spans from 5 to 100 ng sHLA/ml. A stock solution E of 1 µg/ml should be prepared, aliquoted in volumes of 300 µl and stored at 4°C. Prepare a 50 ml batch of standard at the time. (New batches need to be compared to the old batch before used in quantitation).

Use a tube of the standard stock solution E to prepare successive dilutions. While standard curves are necessary to accurately measure the amount of antigen in test samples, they are unnecessary for qualitative "yes/no" answers. For accurate quantitation, the test solutions containing sHLA should be assayed over a number of at least 4 dilutions to assure to be within the range of the standard curve. Prepare serial dilutions of each antigen test solution in blocking buffer (3% BSA in PBS). After mixing, prepare all dilutions in disposable U-bottom 96 well microtiter plates before adding them to the W6/32-coated plates with a multipipette. Add 150 µl in

each well. To further proceed, remove any remaining blocking buffer and wash the plate as described above. The plates are now ready for sample addition. Add 100 μ l of the sHLA containing test solutions and the standard antigen dilutions to the antibody-coated wells.

Cover the plates with an adhesive strip and incubate for exactly 1 hour at room temperature. After incubation, remove the unbound antigen by washing the plate 10x with Wash Buffer (PBS containing 0.05 % Tween-20) as described. Prepare the appropriate developing reagent to detect sHLA. Use the second specific antibody, anti-human β 2m-HRP (DAKO P0174 / 0.4 mg/ml) conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP). Dilute the anti-human β 2m-HRP in a ratio of 1:1000 in 3% BSA in PBS. (Do not include sodium azide in solutions when horseradish peroxidase is used for detection).

TABLE IV

| No. of plates | Total Volume | anti- β 2m-HRP antibody | 3% BSA in PBS |
|---------------|--------------|-------------------------------|---------------|
| 1 | 10 ml | 10 μ l | 10 ml |
| 2 | 20 ml | 20 μ l | 2 ml |
| 3 | 30 ml | 30 μ l | 30 ml |
| 4 | 40 ml | 40 μ l | 40 ml |
| 5 | 50 ml | 50 μ l | 50 ml |

Add 100 μ l of the secondary antibody dilution to each well. All dilutions should be done in blocking buffer. Cover with a new adhesive strip and incubate for 20 minutes at room temperature. Prepare the appropriate amount of substrate prior to the wash step. Bring the substrate to room temperature.

OPD (o-Phenylenediamine) is a peroxidase substrate suitable for use in ELISA procedures. The substrate produces a soluble end product that is yellow in color. The OPD reaction is stopped with 3 N H₂SO₄, producing an orange-brown product and read at 492 nm. Prepare OPD fresh from tablets (Sigma, P6787; 2 mg/tablet). The solid tablets are convenient to use when small quantities of the substrate are required. After second antibody incubation, remove the unbound secondary reagent by washing the plate 10x with Wash Buffer (PBS containing 0.05% Tween-20). After the final wash, add 100 µl of the OPD substrate solution to each well and allow to develop at room temperature for 10 minutes. Reagents of the developing system are light-sensitive, thus, avoid placing the plate in direct light. Prepare the 3 N H₂SO₄ stop solution. After 10 minutes, add 100 µl of stop solution per 100 µl of reaction mixture to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.

Read the ELISA plate at a wavelength of 490 nm within a time period of 15 minutes after stopping the reaction. The background should be around 0.1. If your background is higher, you may have contaminated the substrate with a peroxidase. If the substrate background is low and the background in your assay is high, this may be due to insufficient blocking. Finally analyze your readings. Prepare a standard curve constructed from the data produced by serial dilutions of the standard antigen. To determine the absolute amount of antigen, compare these values with those obtained from the standard curve.

Creation of Transfectants and Production of Soluble Class I Molecules

Transfectants were established as previously described (Prilliman, KR et al., Immunogenetics 45:379, 1997, which is expressly incorporated herein by reference) with the following modifications: a cDNA clone of B*1501 containing the entire coding region of the molecule was PCR amplified in order to generate a construct devoid of the cytoplasmic domain using primers 5PXI (59-GGGCTCTAGAGGACTCAGAATCTCCCAGAC GCCGAG-39) and 3PEI (59-CCGCGAATTCTCATCTCAGGGTGAG-39) as shown in TABLE V. Constructs were also created containing a C-terminal epitope tag consisting of either 6 consecutive histidines or the FLAG epitope (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys). TABLE V Primers utilized to create B*1501-HIS and B*1501-FLAG were 5 P X I a n d 3 P E I H I S (5 9 - C C G C G A A T T C T C A G T G G T G G T G G T G G T G C C A T C T C A G G G T G A G - 3 9) o r 3 P E I F L A G (5 9 - C C G C G A A T T C T C A C T T G T C A T C G T C G T C C T T G T A A T C C C A T C T C A G G G T G A G - 3 9). PCR amplicons were purified using a Qiagen Spin PCR purification kit (Qiagen, Levsden, The Netherlands) and cloned into the mammalian expression vector pCDNA 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). TABLE V. After confirmation of insert integrity by bidirectional DNA sequencing, constructs were electroporated into the class I negative B-lymphoblastoid cell line 721.221 (Prilliman, KR et al., 1997, previously incorporated herein by reference). Transfectants were maintained in medium containing G418 post-electroporation and subcloned in order to isolate efficient producers of soluble class I as determined by ELISA (Prilliman, KR et al., 1997, previously incorporated herein by reference).

TABLE V

| name | Sequence | Full-length or Truncating | Notes | Seq. ID NO: |
|------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|-------------|
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Sall I cut site | 17 |
| | TOTCCCCAGACCCGAG | either | 5' primer, Sall I cut site | 18 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Xba I cut site | 19 |
| | TOTCCCCAGACCCGAG | either | 5' primer, Sall I cut site | 20 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Sall I cut site | 21 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Xba I cut site | 22 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Xba I cut site | 23 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Xba I cut site | 24 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Xba I cut site | 25 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Xba I cut site | 26 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Xba I cut site | 27 |
| | GGGGCTCGAGGAGACTCAGAA | either | 5' primer, Xba I cut site | 28 |

Soluble B*1501, B*1501-HIS, and B*1501-FLAG were produced by culturing established transfectants in CP3000 hollow-fiber bioreactors as previously described by Prilliman *et al*, 1997, which has previously been incorporated herein by reference. Supernatants containing soluble class I molecules were collected in bioreactor harvests and purified on W6/32 affinity columns. At least 2 column purifications were performed per molecule.

Ligand Purification, Edman Sequencing, and Reverse-Phase HPLC Separation of Peptides

Peptide ligands were purified from class I molecules by acid elution (Prilliman, KR *et al*, Immunogenetics 48:89, 1998 which is expressly incorporated herein by reference) and further separated from heavy and light chains by passage through a stirred cell (Millipore, Bedford, MA, USA) equipped with a 3-Kd cutoff membrane (Millipore). Approximately 1/100 volume of stirred cell flow through containing peptide eluted from either B*1501, B*1501-HIS, or B*1501-FLAG was subjected to 14 cycles of Edman degradation on a 492A pulsed liquid phase protein sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Norwalk, CT, USA) without the derivitization of cysteine. Edman motifs were derived by combining from multiple column elutions the picomolar yields of each amino acid and then calculating the fold increase over previous round as described in (Prilliman, KR *et al*, 1998, previously incorporated herein by reference) and are shown in FIG. 2.

Pooled peptide eluate was separated into fractions by RP-HPLC as previously described (Prilliman, KR *et al*, 1998, previously incorporated herein by reference). Briefly, 400-mg aliquots of peptides were dissolved in 100 ml of 10% acetic acid and loaded onto a 2.1 x 150 mm C18 column (Michrom

Bioresources, Auburn, CA, USA) using a gradient of 2%–10% acetonitrile with 0.06% TFA for 0.02 min followed by a 10%–60% gradient of the same for 60 min. Fractions were collected automatically at 1-min intervals with a flow rate of 180 ml/min.

Mass Spectrometric Ligand Analysis

RP-HPLC fractions were speed-vacuumed to dryness and reconstituted in 40 ml 50% methanol, 0.5% acetic acid. Approximately 6 ml from selected fractions were sprayed into an API-III triple-quadrupole mass spectrometer (PE Sciex, Foster City, CA, USA) using a NanoES ionization source inlet (Protana, Odense, Denmark). Scans were collected while using the following instrument settings: polarity—positive; needle voltage—1375 V; orifice voltage—65 V; N₂ curtain gas—0.6 ml/min; step size—0.2 amu; dwell time—1.5 ms; and mass range—325–1400. Total ion traces generated from each molecule were compared visually in order to identify ions overlapping between molecules. Following identification of ion matches, individual ions were selected for MS/MS sequencing.

Sequences were predicted using the BioMultiView program (PE Sciex) algorithm predict sequence, and fragmentation patterns further assessed manually. Determinations of ion sequence homology to currently compiled sequences were performed using advanced BLAST searches against the nonredundant, human expressed, sequence tag, and unfinished high throughput genomic sequences nucleotide databases currently available through the National Center for Biotechnology Information (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

The methodology of the present invention provides a direct comparative analysis of peptide ligands eluted from class I HLA molecules. In order to accomplish such comparative analyses, hollow-fiber bioreactors for class I ligand production were used along with reverse-phase HPLC for fractionating eluted ligands, and mass spectrometry for the mapping and sequencing of peptide ligands. The application of comparative ligand mapping also is applicable to cell lines that express endogenous class I. Prior to peptide sequence determination in class I positive cell lines, the effects of adding a C-terminal epitope tag to transfected class I molecules was found to have no deleterious effects. Either a tag consisting of 6 histidines (6-HIS) or a tag containing the epitope Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (FLAG) was added to the C-terminus of soluble B*1501 through PCR. These constructs were then transfected into class I negative 721.221 cells and peptides purified as previously established (Prilliman, KR et al, 1998, previously incorporated herein by reference). Comparison of the two tailed transfectants with the untailed, soluble B*1501 allowed for the determination that tag addition had no effect on peptide binding specificity of the class I molecule and consequently had no deleterious effects on direct peptide ligand mapping and sequencing.

Edman Motifs

The most common means for discerning ligands presented by a particular class I molecule is Edman sequencing the pool of peptides eluted from that molecule. In order to demonstrate that tailing class I molecules with Cterminal tags does not disrupt endogenous peptide loading, Edman sequences of the peptide pools from B*1501, B*1501-HIS, and B*1501-FLAG

was compared with previously published B*1501 data FIG. 2. Motifs were assigned to each of the various B*1501 molecules as shown in FIG. 2. At the anchor position 2 (P2) a dominant Q and subdominant M was seen in motifs as previously published by Falk *et al.* (Immunogenetics 41:165, 1995) and Barber *et al.* (J Exp Med 184:735, 1996). A more disparate P3 is seen in all molecules with F, K, N, P, R, and Y appearing; these results have also been previously reported by Falk and Barber. Again, a dominant Y and F are seen as the C-terminal anchors at P9 in all three molecules. The motif data for all three molecules are in close accord, therefore, with the published standard motifs.

Mass Spectrometric Profiles

Comparison of motifs for the surface bound, nontailed, and tailed B*1501 molecules identified no substantial differences in the pooled peptides bound by the various forms of B*1501 tested. However, the aim of the present invention is to subtractively compare the individual peptides bound by class I molecules from diseased and healthy cells. Subtractive analysis is accomplished through the comparison of mass spectrometric ion maps and, as such, the ion maps

of tailed and untailed class I molecules were compared in order to determine the effect of tailing upon comparative peptide mapping.

Peptides derived from tailed and untailed B*1501 were separated into fractions via reverse phase HPLC (RP-HPLC). Each fraction was then scanned using an API-III mass spectrometer in order to identify ions present in each fraction. Overall ion scans from RP-HPLC fractions 9, 10, 11, 18, 19, and 20 were produced and visually compared in order to assess ions representing

peptides overlapping between the three molecules. FIG. 3, depicts a representative section of the ion maps generated from each of the molecules. This comparison shows that the same pattern of ions is produced by the different B*1501 molecules analyzed here. The manual comparison of ion maps from each of the three fractions found little to no difference in the peptides bound by each of the three molecules.

Ligand Sequences

After identification of ion matches in MS chromatograms of each of the three molecules, individual ions were chosen for sequencing by tandem mass spectrometry in order to determine if ions were indeed matched at the peptide-sequence level. Ten ions from each fraction were initially selected for MS/MS sequence generation. Fragmentation patterns for each of the ions from each molecule were manually compared and identical fragmentation patterns were counted as peptide-sequence level matches, as illustrated in FIG. 4. Of the peptide fragmentation patterns examined, 52/57 (91%) were exact matches between the untailed molecules and the 6-HIS tailed protein (TABLE VI). A more disparate pattern of fragmentation was identified in the FLAG-tailed ions selected for MS/MS sequencing: of the 57 ions selected for MS/MS fragmentation comparison, 39 (70%) fragmentation patterns matched between the FLAG-tailed and untailed molecules. Overall, 91 out of 113 (81%) spectra examined were in accord between the tailed molecules and soluble B*1501.

TABLE VI

| Molecules | Ions Examined | Ion Matches | Percent Matched |
|----------------------|---------------|-------------|-----------------|
| B*1501-HIS | 57 | 52 | 91% |
| B*1501-FLAG | 56 | 39 | 70% |
| B*1501-Tagged | 113 | 91 | 81% |

Several ligand sequences were clearly determined from the fragmentation patterns produced. The ligand QGLISRGYSY, deriving from human periplakin, was sequenced from those peptides eluted in fraction 18. A second ligand, AVRDISEASVF, an 11-mer matching a span of the 40S ribosomal protein S26, was identified in fraction 20. Notably, these two peptides lacked the strong consensus glutamine expected by the motif data, a phenomenon previously reported by our laboratory when sequencing B*1501-eluted ligands (Prilliman, KR et al, 1997, previously incorporated herein by reference). Both these ligands, however, terminate with an aromatic tyrosine or phenylalanine; these amino acids were both predicted to be strong anchors by Edman sequencing data and by previously published observations (Prilliman, KR et al, 1998, previously incorporated herein by reference).

One embodiment of the present invention contemplates characterizing peptide ligands bound by a given class I molecule by transfecting that molecule into a class I negative cell line and affinity purification of the class I molecule and bound peptide. Complications arise, however, when cell lines are chosen for study that already possess class I molecules. In this case,

antibodies specific for one class I molecule must be used to selectively purify that class I molecule from others expressed by the cell. Because allele-specific antibodies recognize epitopes in and around the peptide binding groove, variations in the peptides found in the groove can alter antibody affinity for the class I molecule (Solheim, JC et al., J Immunol 151:5387, 1993; and Bluestone, JA et al., J Exp Med 176:1757, 1992). Altered antibody recognition can, in turn, bias the peptides available for elution and subsequent sequence analysis.

In order to selectively purify from a class I positive cell a transfected class I molecule and its peptide ligands in an unbiased way, it was necessary to alter the embodiment for class I purification in a non-class I positive cell. The C-terminal addition of a FLAG and 6-HIS tag to a class I molecule that had already been extensively characterized, B*1501 was shown to have little or no effect on peptide binding. This methodology was designed to allow purification of a single class I specificity from a complex mixture of endogenously expressed class I molecules. Ligands eluted from the tailed and untailed B*1501 molecule were compared to assess the effect of a tail addition on the peptide repertoire.

Pooled Edman sequencing is the commonly used method to determine the binding fingerprint of a given molecule, and this methodology was used to ascertain the large-scale effect of tail addition upon peptide binding. We subjected 1/100 of the peptides eluted from each class I MHC molecule to Edman degradation and derived motifs for each of the molecules. Both the HIS- and FLAG-tailed motifs matched published motifs for the soluble and membrane-bound B*1501. Each of the molecules exhibited motifs bearing a

dominant P2 anchor of Q, a more disparate P3 in which multiple residues could be found, and another dominant anchor of Y or F at P9. Small differences in the picomolar amounts of each of the amino acids detected during Edman sequencing have been noted previously in consecutive runs with the same molecule and most likely reflect differences in cell handling and/or peptide isolation rather than disparities in bound peptides. Highly similar peptide motifs indicated that the peptide binding capabilities of class I MHC molecules are not drastically altered by the addition of a tag.

In order to insure the ligands were not skewed after tag addition, MS and MS/MS were used for the mapping and sequencing of individual peptides, respectively. Peptide mixtures subjected to MS provided ion chromatograms (FIG. 3) that were used to compare the degree of ion overlap between the three examined molecules. Extensive ion overlap indicates that the peptides bound by these tailed and untailed B*1501 molecules were nearly identical.

Selected ions were then MS/MS sequenced in order to confirm that mapped ion overlaps indeed represented exact ligand matches through comparison of fragmentation patterns between the three molecules (Fig. 4). Approximately 60 peptides were chosen initially for MS/MS—ten from each fraction. Overall, fragmentation patterns were exact matches in a majority of the peptides examined (TABLE VI). Fragmentation patterns categorized as nonmatches resulted from a mixture of peptides present at the same mass to charge ratio, one or more of which was present in the tagged molecule and not apparent in the spectra of the same ion from B*1501. Of the sequence-level matches, ligands derived from HIS-tailed molecules more closely matched those derived from B*1501 than those eluted from FLAG-tailed

molecules. In total, 52/57 HIS peptides were exact matches, whereas 39/56 FLAG peptides were equivalent. Thus, the data indicates that the 6-HIS tag is less disruptive to endogenous peptide binding than is the FLAG-tag, although neither tag drastically altered the peptides bound by B*1501.

A handful of individual ligand sequences present in fractions of peptides eluted from all three molecules were determined by MS/MS. The two clearest sequences, AVRDISEASVF and QGLISRGSYS, demonstrate that tailed class I molecules indeed load endogenous peptide ligands. This supports the hypothesis that addition of a C-terminal tag does not abrogate the ability of the soluble HLA-B*1501 molecule to naturally bind endogenous peptides. Further, both peptide sequences closely matched those previously reported for B*1501 eluted peptides having a disparate N-terminus paired with a more conserved C-terminus consisting of either a phenylalanine or a tyrosine. Given the homologous Edman sequence, largely identical fragmentation patterns, and the peptide ligands shared between the three molecules, we conclude that addition of a C-terminal tag does not significantly alter the peptides bound by B*1501. Mapping and subtractively comparing eluted peptides is a direct means for identifying differences and similarities in the individual ligands bound by a class I HLA molecule. Indeed, subtractive comparisons demonstrate how overlapping ligands bind across closely related HLA-B15 subtypes as well as pointing out which ligands are unique to virus-infected cells. Direct comparative analyses of eluted peptide ligands is well suited for a number of purposes, not the least of which is viral and cancer CTL epitope discovery. Addition of a C-terminal epitope tag provides a feasible method for production and purification of class I molecules, and

therefore, peptide ligands in cell lines capable of sustaining viral infection or harboring neoplastic agents, as illustrated in FIG. 5. Direct peptide analysis from such lines should yield important information on host control of pathogenic elements as well as provide important building blocks for rational vaccine development.

The present invention further relates in particular to a novel method for detecting those peptide epitopes which distinguish the infected/tumor cell from the uninfected/non-tumor cell. The results obtained from the present inventive methodology cannot be predicted or ascertained indirectly; only with a direct epitope discovery method can the unique epitopes described herein be identified. Furthermore, only with this direct approach can it be ascertained that the source protein is degraded into potentially immunogenic peptide epitopes. Finally, this unique approach provides a glimpse of which proteins are uniquely up and down regulated in infected/tumor cells.

The utility of such HLA-presented peptide epitopes which mark the infected/tumor cell are three-fold. First, diagnostics designed to detect a disease state (i.e., infection or cancer) can use epitopes unique to infected/tumor cells to ascertain the presence/absence of a tumor/virus. Second, epitopes unique to infected/tumor cells represent vaccine candidates. Here, we describe epitopes which arise on the surface of cells infected with HIV. Such epitopes could not be predicted without natural virus infection and direct epitope discovery. The epitopes detected are derived from proteins unique to virus infected and tumor cells. These epitopes can be used for virus/tumor vaccine development and virus/tumor diagnostics. Third, the process indicates that particular proteins unique to virus infected cells are

found in compartments of the host cell they would otherwise not be found in. Thus, we identify uniquely upregulated or trafficked host proteins for drug targeting to kill infected cells.

The present invention describes, in particular, peptide epitopes unique to HIV infected cells. Peptide epitopes unique to the HLA molecules of HIV infected cells were identified by direct comparison to HLA peptide epitopes from uninfected cells.

As such, and only by example, the present method is shown to be capable of identifying: (1) HLA presented peptide epitopes, derived from intracellular host proteins, that are unique to infected cells but not found on uninfected cells, and (2) that the intracellular source-proteins of the peptides are uniquely expressed/processed in HIV infected cells such that peptide fragments of the proteins can be presented by HLA on infected cells but not on uninfected cells.

The method of the present invention also, therefore, describes the unique expression of proteins in infected cells or, alternatively, the unique trafficking and processing of normally expressed host proteins such that peptide fragments thereof are presented by HLA molecules on infected cells. These HLA presented peptide fragments of intracellular proteins represent powerful alternatives for diagnosing virus infected cells and for targeting infected cells for destruction (i.e., vaccine development).

A group of the host source-proteins for HLA presented peptide epitopes unique to HIV infected cells represent source-proteins that are uniquely expressed in cancerous cells. For example, through using the methodology of the present invention a peptide fragment of reticulocalbin is uniquely found

on HIV infected cells. A literature search indicates that the reticulocalbin gene is uniquely upregulated in cancer cells (breast cancer, liver cancer, colorectal cancer). Thus, the HLA presented peptide fragment of reticulocalbin which distinguishes HIV infected cells from uninfected cells can be inferred to also differentiate tumor cells from healthy non-tumor cells. Thus, HLA presented peptide fragments of host genes and gene products that distinguish the tumor cell and virus infected cell from healthy cells have been directly identified. The epitope discovery method of the present invention is also capable of identifying host proteins that are uniquely expressed or uniquely processed on virus infected or tumor cells. HLA presented peptide fragments of such uniquely expressed or uniquely processed proteins can be used as vaccine epitopes and as diagnostic tools.

The methodology to target and detect virus infected cells may not be to target the virus-derived peptides. Rather, the methodology of the present invention indicates that the way to distinguish infected cells from healthy cells is through alterations in host encoded protein expression and processing. This is true for cancer as well as for virus infected cells. The methodology according to the present invention results in data which indicates without reservation that proteins/peptides distinguish virus/tumor cells from healthy cells:

**Example of Comparative Ligand Mapping in Infected and Uninfected Cells
Creation of Soluble Class I Construct**

EBV-transformed cell lines expressing alleles of interest (particularly A*0201, B*0702, and Cw*0702) were grown and class I HLA typed through

the sequenced-based-typing methodology described in Turner et al. 1998, *J. Immunol.*, 161 (3) 1406-13) and U.S. Patent No. 6,287,764 Hildebrand et al. both of which are expressly incorporated herein in their entirety by reference. Total RNA was 5pXI and 3pEI, producing a product lacking the cytoplasmic and transmembrane domains. Alternatively, a 3' primer encoding a hexahistidine or FLAG epitope tag was placed on the C-terminus using the primers, 3pEIHIS or 3pEIFLAG (TABLE V). For the C-locus, a 5' primer was used encoding the Kozak consensus sequence. (Davis, et al. 1999. *J. Exp. Med.* 189: 1265-1274). Each construct was cut with the appropriate restriction endonuclease (see TABLE V) and cloned into the mammalian expression vector pCDNA 3.1- (Invitrogen, Carlsbad, CA) encoding either a resistance gene for G418 sulfate or Zeocin (Invitrogen).

Transfection in Sup-T1 cells. Sup-T1 T cells were cultured in RPMI 1640 + 20% fetal calf serum at 37°C and 5% CO₂. Cells were split daily in order to maintain log-phase growth. Plasmid DNA was purified using either Qiagen Midi-prep kits (Qiagen, Santa Clarita) or Biorad Quantum Prep Midiprep Kit (Biorad, Hercules, Ca) according to the manufacturer's protocol and resuspended in sterile DNase-free water. Cells were electroporated with 30 µg of plasmid DNA at a voltage of 400 mV and a capacitance of 960 µF. Decay constants were monitored throughout electroporation and only transfections with decay times under 25 mS were carried through to selection. Selection was performed on day 4 post-transfection with .45 mg/mL Zeocin (Invitrogen) selective medium containing 30% fetal calf with the pH adjusted visually to just higher than neutral. Cells were resuspended in selective medium at 2×10^6 cells per ml, fed until they no longer turned the wells

yellow (using the pH indicated Phenol Red (Mediatech)), and allowed to sit until cells began to divide. After the appearance of active division, cells were slowly fed with selective medium until they reached medium (T-75) tissue culture flasks. Cells were then subcloned at limiting dilutions of .5, 1, and 1.5 cells per well in 96-well tissue culture plates. Cells were allowed to sit until well turned yellow, they were then gradually moved to 24 well plates and small (T-25) tissue culture flasks. Samples were taken for soluble class I ELISA, and the best producers of class I were frozen for later use at 5×10^6 cells/ml and stored at -135°C .

Soluble MHC class I ELISA. ELISAs were employed to test the concentration of the MHC class I/peptide complexes in cell culture supernatants. The monoclonal antibody W6/32 (ATCC, Manassas, Va) was used to coat 96-well Nunc Starwell Maxi-sorp plates (VWR, West Chester, Pa). One hundred μl s of test sample containing class I was loaded into each well of the plate. Detection was with anti- β2 microglobulin (light chain) antibody conjugated to horse-radish peroxidase followed by incubation with OPD (Sigma, St. Louis, MO). ELISA values were read by a SpectraMax 340.00A, Rom Version 2.04, February 1996, using the program Softmax Pro Version 2.2.1 from Molecular Devices. For determination of MHC class I complex in carboys prior to affinity purification (see below), each sample was tested in triplicate on at least 2 separate plates. Uninfected and infected harvest concentrations were read on the same plate and uninfected samples were brought to 1% Triton X 100 prior to loading on the ELISA plate. This was in an attempt to minimize variability in mass spectra generate due to large differences in the amount of peptide loaded onto affinity columns.

Full-length construct creation. Full-length constructs (in the pCDNA3.1-/G418 sulfate resistance vector) were created and transfected into the class I negative B-LCL 721.221 and T2. Both cell lines were cultured in RPMI-1640 + 10% fetal calf serum until growing at log phase. Cells were electroporated at .25 V and 960 μ F capacitance. After 2 days, the cells were pelleted and resuspended in selective medium consisting of RPMI-1640 + 20% FCS + 1.5 mg/ml G418 sulfate (Mediatech, Herndon, Va). Cells were treated in the same manner as above (Sup-T1 transfection) after this point.

Cell pharm production. Eight liters of Sup-T1 soluble MHC class I transfectants cultured in roller bottles in RPMI-1640 + 15% FCS + 100 U penicillin/streptomycin were centrifuged for 10 min at 1100 X g. Supernatant was discarded and a total of 3×10^9 total cells were resuspended in 200 mls of conditioned medium. Infected cells were then added to a feed bottle and inoculated through the ECS feed pump of a Unisyn CP2500 cell pharm (Unisyn, Hopkington, MA) into 30 kD molecular-weight cut-off hollow-fiber bioreactors previously primed with RPMI-1640 containing 20% fetal calf serum. Cells were allowed to incubate overnight in the bioreactor at a temperature of 37°C and at a pH of 7.20 maintained automatically through CO₂ injection into the medium reservoir of the system. No new medium was introduced into the system during this time period and the ICS recirculation was maintained at a low value of 400 mls/minute. ECS feed was begun 12 hours post inoculation at a rate of 100 mls/day with 15% FCS supplemented RPMI-1640; ICS feed was likewise begun at a rate of 1 L/day. ECS recirculation was initiated at day 2 post-inoculation at a rate of 4 L/day. ECS and ICS samples were taken at 24-hour intervals and sHLA ELISAs (see

above) and glucose tests performed. ECS and ICS feed rates as well as ECS and ICS recirculation rates were adjusted based on increasing concentrations of sHLA in the harvest and decreasing levels of glucose in the ICS medium.

Virus production and infection HIV MN-1 production. HIV MN-1 cloned virus (Genbank Accession Number M17449) was thawed from frozen stock and used to infect 25×10^6 non-transfected Sup-T1 (Denny CT, et. al. 1986. Nature. 320:549.51, which is expressly incorporated herein in its entirety by reference) T cells using standard methods. Cells were cultured in RPMI-1640 +20% fetal bovine serum (MediaTech) for 5 days and observed for syncytia formation. Upon formation of syncytia, new cells were added in fresh RPMI-1640/20% FCS. Culture was continued for 5 more days when 100 mls of infected cells were removed. Supernatant was passed through a .45 um filter and cell-free virus was aliquotted and stored at -80°C . This process was continued until an appropriate amount of virus was harvested.

HIV-1 NL4-3 production. The infectious molecular clone pNL4-3 (Genbank Accession Number AF324493) was transformed into the *Escherichia coli* strain Top10F⁺ (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Plasmid DNA was midiprepped from transformed cells using either the Qiagen Midi Prep Kit (Qiagen, Santa Clarita, Ca) or the Biorad Quantum Prep Midiprep Kit (Biorad, Hercules, Ca) according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was used to transfect 293T cells (GenHunter Corporation, Nashville, TN) using Roche's Fugene 6 reagent (Roche, Basel, Switzerland) following the manufacturer's protocol. Virus-containing supernatant was harvested at 24, 48, and 72 hours, clarified by centrifugation at $500 \times g$ for 10 min, aliquotted, and stored at -80°C . Sup-T1 transfectants containing either soluble A*0201, B*0702, or

Cw*0702 were cocultured with virus resulting in high-titre virus. After 72 hours, infected cells were centrifuged at 1100 X g for 10 minutes. Supernatant containing cell-free virus was removed, passed through a .45 µm filter, aliquotted, and stored at -80°C. Virally-infected cells were resuspended in freeze medium (RPMI-1640 + 20% FCS + 10% DMSO) at approximately 6 X10⁶ cells per ml and stored at -80°C.

Viral Titer Determination. One vial of frozen viral stock derived from either strain of HIV was thawed and used in a TCID₅₀ assay scored two ways: 1) wells containing at least 3 syncytia were considered positive or 2) wells containing over 50 ng/ml p24 antigen as determined by ELISA were considered positive. The TCID₅₀ was then calculated using the Spearman-Kärber method (DAIDS Virology Manual for HIV Laboratories, Jan. 1997). The average of both scoring methods was used as the final titer of the virus. As a second means of viral titer monitoring, viral stock was used undiluted in a p24 ELISA (Beckman Coulter, Miami, FL) in order to determine the ngs of p24 present in cell-free virus.

P24 ELISA. Determination of HIV p24 major core protein was determined by the commercially available Beckman Coulter p24 ELISA according to the manufacturer's instructions with the exceptions of the following modifications: samples were treated with 10% Triton-X 100 prior to removal from a BSL-3 facility, therefore the inactivation medium included in the kit was not used. Secondly, samples were serially diluted in water prior to use.

Hollow-fiber bioreactor culture of infected cells. All work including large-scale culture of HIV was performed in a Biosafety Level 3 Laboratory in accordance with guidelines set forth by the National Institutes of Health.

HIV MN-1 frozen viral stock aliquots were thawed and pooled to a 100 ml total volume, containing approximately 5.5×10^6 TCID₅₀'s. Eight liters of Sup-T1 soluble MHC class I transfectants cultured in roller bottles in RPMI-1640 + 15% FCS + 100 U penicillin/streptomycin were centrifuged for 10 min at 1100 X g. Supernatant was discarded and a total of 3×10^9 total cells were resuspended in 200 mls of conditioned medium. The 100 mls of cell-free HIV MN-1 was then added to the resuspended cells and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 2 hours with gentle shaking every 20 minutes. Infected cells were then added to a feed bottle and inoculated through the ECS feed pump of a Unisyn CP2500 cell pharm (Unisyn, Hopkington, MA) into 30 kD molecular-weight cut-off hollow-fiber bioreactors previously primed with RPMI-1640 containing 20% fetal calf serum. Cells were allowed to incubate overnight in the bioreactor at a temperature of 37°C and at a pH of 7.20 maintained automatically through CO₂ injection into the medium reservoir of the system. No new medium was introduced into the system during this time period and the recirculation was maintained at a low value of 400 mls/minute. ECS feed was begun 12 hours post inoculation at a rate of 100 mls/day with 15% FCS supplemented RPMI-1640; ICS feed was likewise begun at a rate of 1 L/day. ECS and ICS samples were taken at 24-hour intervals, inactivated by addition of Triton-X 100 to 1%, and sHLA ELISAs, p24 ELISAs, and glucose tests performed as described above. ECS and ICS feed rates as well as ECS and ICS recirculation rates were adjusted based on increasing concentrations of sHLA in the harvest and decreasing levels of glucose in the ICS medium.

Soluble HLA purification. Soluble-HLA containing supernatant was removed in 1.9 L volumes from infected hollow-fiber bioreactors. Twenty-percent Triton-X 100 was sterilized and placed in 50 ml aliquots in 60 ml syringes; 2 syringes were injected into each 1.9 L harvest bottle as it was removed from the cell pharm, resulting in a final TX 100 percentage of 1%. Bottles were inverted gently several times to mix the TX 100 and stored at 4°C for a minimum of 1 week. After 1 week, harvest was centrifuged at 2000 X g for 10 minutes to remove cellular debris and pooled into 10 L carboys. An aliquot was then removed from the pooled, HIV-inactivated supernatant and used in a quantitative TCID₅₀ assay (as described above) and used to initiate a coculture with Sup-T1's. Only after demonstration of a completely negative coculture as well as TCID₅₀ were harvests removed from the BSL-3.

Class I/Peptide Production and Peptide Characterization Handling of MHC class I/peptide complexes from infected cells. Each 10L of cell pharm harvest was separated strictly on a temporal basis during the cell pharm run. (This was an attempt to assess any epitopic changes that might occur temporally during infection as opposed to those that might occur more globally.) Harvest was treated exactly as described above, except for the removal of a 2 ml aliquot for tests in both a TCID₅₀ assay and cell coculture assay to determine infectivity of the virus.

Affinity purification of infected and uninfected MHC class I complexes. Uninfected and infected harvest removed from CP2500 machines were treated in an identical manner post-removal from the cell pharm. Approximately 50 mgs total class I as measured by W6/32 ELISA (see above) were passed over a Pharmacia XK-50 (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) column

packed with 50 ml Sepharose Fast Flow 4B matrix (Amersham) coupled to W6/32 antibody. Bound class I complexes were washed first with 1 L 20 mM sodium phosphate wash buffer, followed by a wash with buffer containing the zwitterionic detergent Zwittergent 3-08 (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at a concentration of 10 mM, plus NaCl at 50 mM, and 20 mM sodium phosphate. The zwittergent wash was monitored by UV absorption at a wavelength of 216nm for removal of Triton-X 100 hydrophobically bound to the peptide complexes. After 1 L of wash had passed over the column (more than a sufficient amount for the UV to return to baseline), zwittergent buffer was removed with 2 L of 20 mM sodium phosphate wash buffer. Peptides were eluted post wash with freshly made 0.2N acetic acid, pH 2.7.

Peptide isolation and separation. Post-elution, peptide-containing eluate fractions were brought up to 10% glacial acetic acid concentration through addition of 100% glacial acetic acid. Fractions were then pooled into a model 8050 stirred cell (Millipore, Bedford, MA) ultrafiltration device containing a 3 kD molecular-weight cutoff regenerated cellulose membrane (Millipore). The device was capped and tubing parafilmmed to prevent leaks and placed in a 78°C water bath for 10 minutes. Post-removal, the peptide-containing elution buffer was allowed to cool to room temperature. The stirred cell was operated at a pressure of 55 psi under nitrogen flow. Peptides were collected in 50 ml conical centrifuge tubes (VWR, West Chester, Pa), flash frozen in super-cooled ethanol, and lyophilized to dryness. Peptides were resuspended either in 10% acetic acid or 10% acetonitrile. Peptides were purified through a first-round of HPLC on a Haisil C-18 column (Higgins Analytical, Mountain View, Ca), with an isocratic flow of 100% B (100% acetonitrile, 0.01% TFA).

for 40 minutes. Following elution, peptide-containing fractions were pooled, speed-vacuumed to dryness, and resuspended in 150 μ l of 10% acetic acid. Two μ g of the base methyl violet were added to the peptide mixture in 10% acetic acid and this was loaded onto a Haisil C-18 column for fractionation. Peptides were fractionated by one of two methods, the latter resulting in increased peptide resolution. The first fractionation program was 2-10% B in 2 minutes, 10-60% B in 60 minutes, with 1 minute fraction collection. The second RP-HPLC gradient consisted of a 2-14% B in 2 minutes, 14-40% B in 60 minutes, 40-70% B in 20 minutes, with 1 minute fraction collection. Peptides eluting in a given fraction were monitored by UV absorbance at 216 nm. Separate but identical (down to the same buffer preparations) peptide purifications were done for each peptide-batch from uninfected and infected cells.

Mass-spectrometric mapping of fractionated peptides: Fractionated peptides were mapped by mass spectrometry to generate fraction-based ion maps. Fractions were speed-vacuumed to dryness and resuspended in 12 μ l 50:50 methanol:water + .05% acetic acid. Two μ l were removed and sprayed via nanoelectrospray (Protana, Odense, Denmark) into a Q-Star quadrupole mass spectrometer with a time-of-flight detector (Perseptive SCIEX, Foster City, Ca). Spectra were generated for masses in the range of 50-1200 amu using identical mass spectrometer settings for each fraction sprayed. Spectra were then base-line subtracted and analyzed using the programs BioMultiview version 1.5beta9 (Perseptive SCIEX) or BioAnalyst version 1.0 (Perseptive SCIEX). Spectra from the same fraction in uninfected/infected cells were manually aligned to the same mass range,

locked, and 15 amu increments visually assessed for the presence of differences in the ions represented by the spectra (for an example, see Hickman et al. 2000. *Human Immunology*. 61:1339-1346 which is expressly incorporated herein by reference). Ions were selected for MS/MS sequencing based on upregulations or downregulation of 1.5 fold over the same ion in the uninfected cells, or the presence or absence of the ion in infected cells. Ions were thus categorized into multiple categories prior to MS/MS sequencing.

Tandem mass-spectrometric analysis of selected peptides. Lists of ion masses corresponding to each of the following categories were generated: 1) upregulated in infected cells, 2) downregulated in infected cells, 3) present only in infected cells, 4) absent in infected cells, and 5) no change in infected cells. The last category was generally disregarded for MS/MS analysis and the first 4 categories were subjected to MS/MS sequencing on the Q-Star mass spectrometer. Peptide-containing fractions were sprayed into the mass spectrometer in 3 µl aliquots. All MS settings were kept constant except for the Q0 and Cad gas settings, which were varied to achieve the best fragmentation. Fragmentation patterns generated were interpreted manually and with the aid of BioMultiView version 1.5 beta 9. No sequencing algorithms were used for interpretation of data, however multiple web-based applications were employed to aid in peptide identification including: MASCOT (Perkins, DN et al. 1999. *Electrophoresis*. 20(18):3551-3567), Protein Prospector (Clauser K. R. et al. 1999. *Analytical Chemistry*. 71:2871), Peptide Search (<http://www.narrador.emblheidelberg.de/GroupPages/PageLink/Peptidesearchpage.html>) and BLAST search

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Quality control of epitope changes. Multiple parameters were established before peptides identified in the above fashion were deemed "upregulated," "downregulated," etc. First, the peptide fractions before and after the fraction in which the peptide was identified were subjected to MS/MS at the same amu under the identical collision conditions employed in fragmentation of the peptide-of-interest and the spectra generated overlaid and compared. This was done to make sure that, in the unlikely event that the peptides had fractionated differently (even with methyl-violet base B standardization) there was not the presence of the peptide in an earlier or later fraction of the uninfected or infected peptides (and that the peptides had truly fractionated in an identical manner.) Secondly, the same amu that was used to identify the first peptide was then subjected to MS/MS in the alternate fraction (either infected or uninfected, whichever was opposite of the fraction in which the peptide was identified.) Spectra again were overlaid in order to prove conclusively that the fragmentation patterns did not match and thus the peptide was not present in the uninfected cells, or, in the case that the fragmentation patterns did match, that the peptides were upregulated in the infected cells. Finally, synthetic peptides were generated for each peptide identified. These peptides were resuspended in 10% acetic acid and RP-HPLC fractionated under the same conditions as employed for the original fractionation, ensuring that the peptide putatively identified had the same hydrophobicity as that of the ion MS/MS fragmented. This synthetic peptide was MS/MS fragmented under the same collision conditions as that of the ion, the spectra overlaid, and checked for an exact match with the original peptide

fragment.

Functional Analysis\Literature Searches. After identification of epitopes, literature searches were performed on source proteins to determine their function within the infected cell. Broad inferences can be made from the function of the protein. Source proteins were classified into groups according to functions inside the cell. Again, broad inferences can be made as to the groups of proteins that would be available for specific presentation solely on infected cells. Secondly, source proteins were scanned for other possible epitopes which may be bound by other MHC class I alleles. Peptide binding predictions (Parker, K. C., et. al. 1994. *J. Immunol.* 152:163) were employed to determine if other peptides presented from the source proteins were predicted to bind. Proteasomal prediction algorithms (A.K. Nussbaum, et. Al. 2001. *Immunogenetics* 53:87-94) were likewise employed to determine the likelihood of a peptide being created by the proteasome.

Sequence Identification. A discussion of the results seen with the application of this procedure is included using the peptide GPRTAALGLL as an example. Other examples and data obtained based on the methodology are listed in TABLE VII.

TABLE VII

| ION | FRACTION | SEQUENCE | MW | OBS'D MW | SOURCE PROTEIN | START AA | ACCESSION # | CATEGORY | SEQ ID NO. | |
|--|----------|------------|------------|----------|--|----------------|-------------|--------------------------|--------------------------|----|
| Peptides identified on infected cells that are not present on Uninfected Cells | 1832.226 | EQAEEDISL | 1221.682 | 1221.415 | HIV MN-1 ELAV | 101 | | HIV-RETRIVED | 28 | |
| | 509.680 | IPCLURPL | 1077.807 | 1077.334 | CHICKEN GIG RECEPTOR ALPHA'S POLYPEPTIDE | 250 | | | 30 | |
| | 469.180 | STTACATGL | 936.466 | 938.390 | UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEINASE | 162 | 10720940 | | 31 | |
| | 420.130 | APAKNPEL | 896.428 | 898.259 | B-ASSOCIATED TRANSCRIPT PROTEIN 3 (BAT3) | | | | 52 | |
| | 503.190 | LYMAPRTVL | 896.602 | 898.259 | HLA-B HEAVY CHAIN LEADER SEQUENCE | 2 | 4586650 | MHC GENE PRODUCT | 53 | |
| | 528.860 | APFINSPADX | 1057.388 | | UNKNOWN, CLOSE TO SEVERAL CDNA'S | | | UNKNOWN | 34 | |
| | 523.168 | TPQSNRPVW | 1044.400 | 1044.333 | RNA POLYMERASE II POLYPEPTIDE A | 527 | 4595939 | RNA MACHINERY/BINDING PR | 35 | |
| | 444.140 | AARFATSTL | 887.485 | 887.260 | ELK TRANSSCRIPTION INITIATION FACTOR | 1073 | 004837 | MACHINERY/BINDING PR | 36 | |
| | 470.680 | NANMAALMA | 840.413 | 839.410 | SFARIC-LIKE PROTEIN | 19 | 478522 | TUMOR SUPPRESSOR GENE | 37 | |
| | 490.020 | IATVDSYVI | | 979.240 | TENASCIN C (HEXABRACHION) | 1823 | 13838246 | TUMOR SUPPRESSOR GENE | 38 | |
| | 583.940 | SPNDHQAAL | 1126.937 | 1126.934 | POLY(AMINO ACID) BINDING PROTEIN 1 | 141 | 131529 | MACHINERY/BINDING PR | 39 | |
| | | 39INF | GPRTAALGLL | 869.599 | 869.425 | RETICULOCALBIN | 4 | 4908457 | TUMOR SUPPRESSOR GENE | 40 |
| | 595.150 | 18INF | NPNQNKVAL | 1111.866 | 1111.300 | ELAV (HNR) | 188 | 4503051 | RNA MACHINERY/BINDING PR | 41 |
| Peptides identified on Uninfected cells that are not present on Infected cells | | | | | | | | | | |
| | 10UNINF | GRFSMRY | | | MHC CLASS II HEAVY CHAIN C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, G, Gc | variable | multiple | MHC Class II Product | 42 | |

The first step in identification of an epitope present only on uninfected cells is performing MS ion mapping. In this case, the reversed-phase HPLC fraction 30 obtained from HIV as disclosed hereinabove (which contains a fraction of the total class I peptides) was sprayed into the mass spectrometer and an ion spectrum created. FIG. 6 shows the sections of ion map in which an ion was first identified as upregulated. The ion at 484.74 can be seen to predominate in the upper map, which is the spectrum generated from peptides from the infected cells. One can also see that there are other peptides which differ in their intensities between the uninfected cells from one spectrum to another. After a peptide is initially identified, the area of the spectrum in which the peptide is found is zoomed in in order to more fully see all the ions in the immediate area (FIG. 7). After zooming in on the area from 482-488 amu, the ion at 484.72 can be seen to only be present in the infected cells (which are seen in the spectrum on the top). A large difference such as this is not always seen, sometimes more minor differences are chosen for sequence determination. This ion, however, was considered an extremely good candidate for further analysis.

After identification of the ion, the next step in the process is to sequence the peptide by using tandem mass spectrometry. FIG. 8 shows the spectrum generated when the peptide is fragmented. These fragments are used to discern the amino acid sequence of the peptide. The sequence of this peptide was determined to be GPRTAALGLL. This peptide was isolated from infected HLA-B*0702 molecules. One early quality control step is examining the peptide's sequence to see if it fits the sequences that were previously shown to be presented by this molecule. B*0702 binds peptides

that have a G at their second position (P2) and an L as their C-terminal anchor. Based on this information, this sequence is likely to be a peptide presented by B*0702.

Descriptive characterization of peptide. Once the peptide sequence is obtained, information is gained on the source protein from which the peptide was derived in the cytosol of the infected cell. Initially, a BLAST search (available at the National Center for Biotechnology website) is done to provide protein information on the peptide. A BLAST search with the sequence GPRTAALGGL pulled up the protein reticulocalbin 2. After the source protein is known, information about the protein is ascertained first from the PubMed (again available at the National Center for Biotechnology website) and put into a format to which one can easily refer as seen in FIG. 9. All of the accession numbers for the protein, as well as the original description of the protein are included. This makes it easy to come back to the information for downstream use. Also, the protein sequence is copied, pasted, and saved as a text document for incorporation into later searches. The peptide is highlighted in the entire protein, giving some context as to where it is derived and how large the total protein is. This is the initial data gathering step post-sequence determination.

The next step in characterizing the ligand is doing literature searches on the source protein from which the peptide was derived. The protein is entered into the PubMed database and all entries with the word "reticulocalbin" are retrieved. FIG. 10 illustrates the listing that is done to summarize what has previously been described for this protein. It can be seen that for reticulocalbin, multiple articles have been published involving

this protein. The literature is summarized in a paragraph following the PubMed listings and put into the report. For reticulocalbin, some of the most interesting points are that it is an ER resident protein, which can lead to speculation on why it is presented on infected cells. Secondly, it has been previously found to be upregulated in several other types of cancers, such as breast and colorectal cancers. This again leads to speculation that this protein may be broadly applicable to treat more maladies than those caused by HIV. It is also determined whether or not this protein has been previously cited as interacting with/ or being interfered with by HIV. This was not seen for reticulocalbin and thus was not listed in the report, (although in some instances it is seen.) A broad understanding of the protein is gained through literature searches.

Predictive characterization of peptide. After the literature search, several secondary searches are performed. FIG. 11 illustrates the results of a peptide-binding algorithm performed using Parker's Prediction (which is described hereinabove). The entire source protein is used for input and the computer generates a list of peptides which are bound by the HLA allele chosen. In this case, B*0702 was chosen because that was the allele from which this peptide was derived. From the black arrow in the figure, it can be seen that the peptide sequenced by mass spectrometry is predicted to bind to HLA-B*0702 with a high affinity. Several other peptides are listed that are predicted to bind as well. FIG. 12 shows the same procedure being performed with the source peptide using another well-known search engine, SYPEITHI. (This engine can be found on the worldwide web using the URL: <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/Scripts/MHCServer.dll/EpPredict.htm>.)

Again, the results from this search engine for B*0702 shows that this peptide is predicted to bind to HLA-B*0702 with a high affinity. Also, multiple other peptides are predicted to be derived from this source protein and bound.

This prediction allows us to determine several things. First, we can tell if the peptide is predicted to be bound by previous algorithms. This allows us to know how well the programs work, and/or if other people could identify this peptide (if they had the source protein) from peptide binding algorithms. All of this information can be translated into increasing importance for the present inventive methodology not only for the peptide but also for the source protein itself.

After peptide-binding algorithms are performed, searches are done to determine whether the peptides would be created by the proteasome during normal processing of proteins into peptides. It should be strongly noted that multiple pathways for class I peptide loading are now being demonstrated and that the cleavage algorithms for human proteasomes are not well established by any means. While a positive result may indicate that the proteasome is largely responsible for cleavage, a negative result by no means indicates that the peptide is not presented in the class I molecule. FIG. 13 shows the results of the first proteasomal cleavage done for the source protein reticulocalbin using the cleavage predictor PaProC (available at URL <http://www.paproc.de/>). The epitope is outlined. By this prediction software, the peptide is not predicted to be cleaved by the normal proteasome. This may mean that in infected cells, alternative pathways of MHC class I presentation are being used, particularly in reference to the reticulocalbin peptide. This, in turn, may present novel methods for

therapeutics during viral infection. A second proteasomal cleavage search is also employed using the prediction software NetChop (available on the worldwide web) as seen in FIG. 14. By this prediction and other data from current literature in the field, the peptide would be created by the proteasome and cleaved to form the GPRTAALGLL identified.

A third round of analysis involves only the source protein. All other alleles are tested for peptide binding and lists of the highest binders generated. The proteasomal cleavage predictions are then referred to in order to elucidate how these peptides are generated. This information is useful for downstream testing of peptides and for determining whether or not this protein will be applicable for vaccine trials covering a broad range of HLA alleles. For reticulocalbin, multiple high-affinity peptides were demonstrated for differing HLA alleles (some examples of which are shown in FIG. 15). In this figure, several high affinity peptides deriving from reticulocalbin were identified for HLA-A*0201 and A*0101.

Quality control of sequence determination. There currently exists no direct means to score the quality of MS/MS sequence data. Once all descriptive and predictive steps are concluded, we return again to the original peptide sequence for quality control to ensure that the peptide is indeed what we have identified as the amino acid sequence and that the peptide is truly present only in infected cells. We employ these multiple steps so there is no doubt that the sequence is truly what we claim it to be before we move on to downstream applications involving the peptide.

Initially, we determine that the peptide is truly upregulated or present only in infected cells. For the reticulocalbin peptide, we determined that this

peptide was probably only present in infected cells. In order to make certain that the peptide was truly absent in the uninfected cells and that there was no chance that our RP-HPLC fractionation had differed (remembering that we use internal controls for our fractionation as well) we generated ion spectra using MS from the fractions before and after the one in which we identified the peptide. In the case of the reticulocalbin peptide, we identified the peptide in fraction 30, so we performed MS on fractions 29 and 31 (FIG. 16). In FIG. 16, it can be seen that there is no substantial peak at the m/z 484.72. This indicated that there was not differential fractionation and that the peptide truly was absent from uninfected cells. In the case that there was a peptide peak in one of the before or after fractions, we would then turn to MS/MS to determine whether this peak represented the ion we were characterizing or another ion with the same mass-to-charge ratio.

After determining that the peptide is not present in another fraction, MS/MS was performed on the same m/z in the uninfected spectrum (in the same fraction) in order to conclusively prove that there is no peptide present with the same sequence in the uninfected cells. In FIG. 17 one can see that the fragmentation patterns produced under identical MS collision conditions are totally different. This illustrates the absence of the reticulocalbin peptide in the uninfected cells.

Finally, in order to conclusively prove that the peptide sequence is the same as that originally identified, we synthesize synthetic peptides consisting of the same amino acids as the peptide sequence identified from the MS/MS fragmentation pattern. For the reticulocalbin peptide (i.e. the ion in fraction 30 at 484.72) we synthesized the peptide "GPRTAALGLL." We

then took this peptide and did MS/MS on the peptide under identical conditions as previously used. FIG. 18 illustrates the spectrum generated from MS/MS of the endogenously loaded reticulocalbin peptide. Matching spectra, as seen here, are indicators that this peptide sequence is GPRTAALGLL as almost every amino acid combination will generate a completely different set of fragments, both in terms of production of fragments and in terms of intensity of those fragments present. FIG. 18 shows the MS/MS endogenous and synthetic "GPRTAALGLL" peptide under identical collision conditions. As can be seen, the MS/MS graphs are virtually identical.

In accordance with the present invention, one peptide ligand (i.e. "GPRTAALGLL") has been identified as being presented by the B*0702 class I MHC molecule in cells infected with the HIV MN-1 virus but not in uninfected cells. As one of ordinary skill in the art can appreciate the novelty and usefulness of the present methodology in directly identifying such peptide ligands and the importance such identification has for numerous therapeutic (vaccine development, drug targeting) and diagnostic tools. As such, numerous other peptide ligands have been uniquely identified in cells infected with HIV MN-1 (as opposed to uninfected cells) and these results are summarized in TABLE VII. One of ordinary skill in the art given the present specification would be fully enabled to identify the "GPRTAALGLL" peptide ligand; as well as other uniquely presented peptide ligands found in cells infected with a microorganism of interest and/or tumorigenic cells.

As stated above, TABLE VII identifies the sequences of peptide ligands identified to date as being unique to HIV infected cells. Class I sHLA B*0702

was harvested for T cells infected and not infected with HIV. Peptide ligands were eluted from B*0702 and comparatively mapped on a mass spectrometer so that ions unique to infected cells were apparent. Ions unique to infected cells (and one ligand unique to uninfected cells) were subjected to mass spectrometric fragmentation for peptide sequencing. Column 1 indicates the ion selected for sequencing, column 2 is the HPLC fraction, column 3 is the peptide sequence, column 4 is the predicted molecular weight, column 5 is the molecular weight we found, column 6 is the source protein for the epitope sequenced, column 7 is where the epitope starts in the sequence of the source protein, column 8 is the accession number, and column 9 is a descriptor which briefly indicates what is known of that epitope and/or its source protein.

The methodology used herein is to use sHLA to determine what is unique to unhealthy cells as compared to healthy cells. Using sHLA to survey the contents of a cell provides a look at what is unique to unhealthy cells in terms of proteins that are processed into peptides. TABLE VII shows the utility of the method described herein for discovering epitopes and their source proteins which are unique to HIV infected cells. A detailed description of the peptide from Reticulocalbin is provided hereinabove. The other epitopes and corresponding source proteins described in TABLE VII were processed in the same manner as the reticulocalbin epitope and source protein were -- i.e. as described herein above. The data summarized in TABLE VII shows that the epitope discovery technique described herein is capable of identifying sHLA bound epitopes and their corresponding source proteins which are unique to infected/unhealthy cells.

Likewise, and as is shown in TABLE VII, peptide ligands presented in individual class I MHC molecules in an uninfected cell that are not presented by individual class I MHC molecules in an uninfected cell can also be identified. The peptide "GSHSMRY", for example, was identified by the method of the present invention as being an individual class I MHC molecule which is presented in an uninfected cell but not in an infected cell.

The utility of this data is at least threefold. First, the data indicates what comes out of the cell with HLA. Such data can be used to target CTL to unhealthy cells. Second, antibodies can be targeted to specifically recognize HLA molecules carrying the ligand described. Third, realization of the source protein can lead to therapies and diagnostics which target the source protein. Thus, an epitope unique to unhealthy cells also indicates that the source protein is unique in the unhealthy cell.

The methods of epitope discovery and comparative ligand mapping described herein are not limited to cells infected by a microorganism such as HIV. Unhealthy cells analyzed by the epitope discovery process described herein can arise from virus infection or also cancerous transformation. In addition, the status of an unhealthy cell can also be mimicked by transfecting a particular gene known to be expressed during viral infection or tumor formation. For example, particular genes of HIV can be expressed in a cell line as described (Achour, A., et al., *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10(1): p. 19-25; and Chiba, M., et al., *CTL Arch Virol*, 1999, 144(8): p. 1469-85, all of which are expressly incorporated herein by reference) and then the epitope discovery process performed to identify how the expression of the transferred gene modifies epitope presentation by sHLA. In a similar fashion, genes

known to be upregulated during cancer (Smith, E.S., et al., Nat Med, 2001, 7(8): p. 967-72, which is expressly incorporated herein by reference) can be transferred in cells with sHLA and epitope discovery then completed. Thus, epitope discovery with sHLA as described herein can be completed on cells infected with intact pathogens, cancerous cells or cell lines, or cells into which a particular cancer, viral, or bacterial gene has been transferred. In all these instances the sHLA described here will provide a means for detecting what changes in terms of epitope presentation and the source proteins for the epitopes.

Thus, in accordance with the present invention, there has been provided a methodology for epitope discovery and comparative ligand mapping which includes methodology for producing and manipulating Class I and Class II MHC molecules from gDNA that fully satisfies the objectives and advantages set forth herein above. Although the invention has been described in conjunction with the specific drawings, experimentation, results and language set forth herein above, it is evident that many alternatives, modifications, and variations will be apparent to those skilled in the art. Accordingly, it is intended to embrace all such alternatives, modifications and variations that fall within the spirit and broad scope of the invention.

All of the numerical and quantitative measurements set forth in this application (including in the examples and in the claims) are approximations.

The invention illustratively disclosed or claimed herein suitably may be practiced in the absence of any element which is not specifically disclosed or claimed herein. Thus, the invention may comprise, consist of, or consist essentially of the elements disclosed or claimed herein.

The following claims are entitled to the broadest possible scope consistent with this application. The claims shall not necessarily be limited to the preferred embodiments or to the embodiments shown in the examples.

What is claimed is:

1. A method of isolating peptide ligands for an individual class I molecule, comprising the steps of:
 - providing a cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;
 - culturing the cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecules from the construct, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand into the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;
 - isolating the secreted individual soluble class I molecules having the endogenously loaded peptide ligands bound thereto; and
 - separating the peptide ligands from the individual soluble class I molecules.
2. The method of claim 1 wherein, in the step of providing a cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the construct further encodes a tag which is attached to the individual soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.
3. The method of claim 2, wherein the tag is selected from the group consisting of a HIS tail and a FLAG tail.
4. The method of claim 1 wherein, in the step of providing a cell line, the cell line is class I negative.

5. The method of claim 1 wherein, in the step of providing a cell line, the cell line expresses endogenous class I molecules.
6. The method of claim 1 wherein, in the step of providing a cell line, the cell line is infected with at least one of a microorganism, a gene from a microorganism, or a tumor gene.
7. The method of claim 6 wherein, the cell line is infected with HIV.
8. The method of claim 1 wherein, in the step of providing a cell line, the cell line is transformed such that the cell line is a tumor cell line.
9. The method of claim 1 wherein, in the step of providing a cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the cell line containing the construct that encodes the individual soluble class I molecule is produced by a method comprising the steps of:
 - obtaining genomic DNA or cDNA encoding at least one class I molecule;
 - identifying an allele encoding an individual class I molecule in the genomic DNA or cDNA;
 - PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule in a locus specific manner such that a PCR product produced therefrom encodes a truncated, soluble form of the individual class I molecule;
 - cloning the PCR product into an expression vector, thereby forming a construct that encodes the individual soluble class I molecule;
 - and
 - transfecting the construct into a cell line.

10. The method of claim 9 wherein, in the step of providing a cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the construct further encodes a tag which is attached to the soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.

11. The method of claim 10, wherein the tag is selected from the group consisting of a HIS tail and a FLAG tail.

12. The method of claim 10, wherein the tag is encoded by a PCR primer utilized in the step of PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule.

13. The method of claim 10, wherein the tag is encoded by the expression vector into which the PCR product is cloned.

14. The method of claim 1, further comprising the step of identifying the peptide ligand.

15. The method of claim 14, further comprising the step of identifying a source protein from which the peptide ligand was obtained.

16. A peptide ligand for an individual class I molecule isolated by a method comprising the steps of:

providing a cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;

culturing the cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecules from the construct, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand into the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;

isolating the secreted individual soluble class I molecules having the endogenously loaded peptide ligands bound thereto; and

separating the peptide ligands from the individual soluble class I molecules.

17. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:29.

18. The peptide ligand of claim 17, wherein the peptide ligand is obtained from HIV-1 MN, ENV.

19. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:30.

20. The peptide ligand of claim 19, wherein the peptide ligand is obtained from Cholinergic Receptor, Alpha-3 Polypeptide.

21. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:31.

22. The peptide ligand of claim 21, wherein the peptide ligand is obtained from Ubiquitin-Specific Protease.

23. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:32.

24. The peptide ligand of claim 23, wherein the peptide ligand is obtained from β -Associated Transcript Protein 3 (BAT3).

25. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:33.

26. The peptide ligand of claim 25, wherein the peptide ligand is obtained from HLA-B Heavy Chain Leader Sequence.

27. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:34.

28. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:35.

29. The peptide ligand of claim 28, wherein the peptide ligand is obtained from RNA Polymerase II Polypeptide A.

30. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:36.

31. The peptide ligand of claim 30, wherein the peptide ligand is obtained from EUK, Translation Initiation Factor 4.

WO 02/30964

78

PCT/US01/31931

32. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:37.

33. The peptide ligand of claim 32, wherein the peptide ligand is obtained from SPARC-1 Like Protein.

34. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:38.

35. The peptide ligand of claim 34, wherein the peptide ligand is obtained from Tenascin-C.

36. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:39.

37. The peptide ligand of claim 36, wherein the peptide ligand is obtained from Polypyrimidine Tract-Binding Protein 1.

38. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:40.

39. The peptide ligand of claim 38, wherein the peptide ligand is obtained from Reticulocalbin.

40. A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:41.

41. The peptide ligand of claim 40, wherein the peptide ligand is obtained from ELAV (HuR).

42. A method for identifying at least one endogenously loaded peptide ligand that distinguishes an infected cell from an uninfected cell, comprising the steps of:

- providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the uninfected cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;
- infecting a portion of the uninfected cell line with at least one of a microorganism, a gene from a microorganism or a tumor gene, thereby providing an infected cell line;
- culturing the uninfected cell line and the infected cell line under conditions which allow for expression of individual soluble class I molecules from the construct, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand in the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;
- isolating the secreted individual soluble class I molecules having the endogenously loaded peptide ligands bound thereto from the uninfected cell line and the infected cell line;
- separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the uninfected cell line and separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the infected cell line;

isolating the endogenously loaded peptide ligands from the uninfected cell line and the endogenously loaded peptide ligands from the infected cell line;

comparing the endogenously loaded peptide ligands isolated from the infected cell line to the endogenously loaded peptide ligands isolated from the uninfected cell line; and

identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line that is not presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected cell line.

43. The method of claim 42 wherein, in the step of providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the construct further encodes a tag which is attached to the individual soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.

44. The method of claim 42 wherein, the uninfected cell line is class I negative.

45. The method of claim 42 wherein, the uninfected cell line expresses endogenous class I molecules.

46. The method of claim 42 wherein, in the step of providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the uninfected cell line containing the construct that encodes the individual soluble class I molecule is produced by a method comprising the steps of:

- obtaining genomic DNA or cDNA encoding at least one class I molecule;
identifying an allele encoding an individual class I molecule in the genomic DNA or cDNA;
PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule in a locus specific manner such that a PCR product produced therefrom encodes a truncated, soluble form of the individual class I molecule;
cloning the PCR product into an expression vector, thereby forming a construct that encodes the individual soluble class I molecule;
and
transfecting the construct into an uninfected cell line.
47. The method of claim 46 wherein, in the step of providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the construct further encodes a tag which is attached to the soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.
48. The method of claim 47, wherein the tag is selected from the group consisting of a HIS tail and a FLAG tail.
49. The method of claim 47, wherein the tag is encoded by a PCR primer utilized in the step of PCR amplifying an allele encoding the individual class I molecule.
50. The method of claim 47, wherein the tag is encoded by the expression vector into which the PCR product is cloned.

51. The method of claim 42, further comprising the step of identifying a source protein from which the at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line and not presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected cell line is obtained.

52. The method of claim 42 wherein, in the step of identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line but not on the uninfected cell line, the at least one endogenously loaded peptide ligand is obtained from a protein encoded by at least one of the microorganism, the gene from a microorganism or the tumor gene with which the cell line was infected to form the infected cell line.

53. The method of claim 42 wherein, in the step of identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line but not on the uninfected cell line, the at least one endogenously loaded peptide ligand is obtained from a protein encoded by the uninfected cell line.

54. The method of claim 53, wherein the protein encoded by the uninfected cell line from which the at least one endogenously loaded peptide ligand is obtained has increased expression in a tumor cell line.

55. The method of claim 42 wherein, in the step of infecting a portion of the uninfected cell line, the portion of the uninfected cell line is infected with HIV.

56. A method for identifying at least one endogenously loaded peptide ligand that distinguishes an infected cell from an uninfected cell, comprising the steps of:

- providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the uninfected cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;
- infected a portion of the uninfected cell line with at least one of a microorganism, a gene from a microorganism or a tumor gene, thereby providing an infected cell line;
- culturing the uninfected cell line and the infected cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecules from the construct, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand into the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;
- isolating the secreted individual soluble class I molecules having the endogenously loaded peptide ligands bound thereto from the uninfected cell line and the infected cell line;
- separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the uninfected cell line, and separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the infected cell line;
- isolating the endogenously loaded peptide ligands from the uninfected cell line and the endogenously loaded peptide ligands from the infected cell line;

comparing the endogenously loaded peptide ligands isolated from the uninfected cell line to the endogenously loaded peptide ligands isolated from the infected cell line; and
identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected cell line that is not presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line.

57. The method of claim 56 wherein, in the step of providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the construct further encodes a tag which is attached to the individual soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.

58. The method of claim 56, wherein the uninfected cell line is class I negative.

59. The method of claim 56, wherein the uninfected cell line expresses endogenous class I molecules.

60. The method of claim 56 wherein, in the step of providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the uninfected cell line containing the construct that encodes the individual soluble class I molecule is produced by a method comprising the steps of:

obtaining genomic DNA or cDNA encoding at least one class I molecule;
identifying an allele encoding an individual class I molecule in the genomic DNA or cDNA;

PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule in a locus specific manner such that a PCR product produced therefrom encodes a truncated, soluble form of the individual class I molecule;

cloning the PCR product into an expression vector, thereby forming a construct that encodes the individual soluble class I molecule; and

transfecting the construct into an uninfected cell line.

61. The method of claim 60 wherein, in the step of providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the construct further encodes a tag which is attached to the individual soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.

62. The method of claim 61, wherein the tag is selected from the group consisting of a HIS tail and a FLAG tail.

63. The method of claim 61, wherein the tag is encoded by a PCR primer utilized in the step of PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule.

64. The method of claim 62 wherein the tag is encoded by the expression vector into which the PCR product is cloned.

65. The method of claim 56, further comprising the step of identifying a source protein from which the at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected

cell line and not presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line is obtained.

66. The method of claim 56 wherein, in the step of infecting a portion of the uninfected cell line, the portion of the uninfected cell line is infected with HIV.

67. An endogenously loaded peptide ligand presented by an individual class I molecule on an infected cell but not on an uninfected cell.

68. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:29.

69. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:30.

70. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:31.

71. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:32.

72. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:33.

73. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:34.

74. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:35.

75. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:36.

76. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:37.

77. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:38.

78. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:39.

79. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:40.

80. The endogenously loaded peptide ligand of claim 67, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:41.

81. A self protein capable of being naturally processed into at least one peptide fragment, wherein the at least one peptide fragment is endogenously loaded in and presented by a class I molecule on an infected cell.

82. The self protein of claim 81 wherein the at least one peptide fragment is not endogenously loaded in and presented by a class I molecule on an uninfected cell.

83. A peptide ligand presented by an individual class I molecule on an infected cell but not on an uninfected cell, the peptide ligand identified by a method comprising the steps of:

providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;

infecting a portion of the uninfected cell line with at least one of a microorganism, a gene from a microorganism or a tumor gene, thereby providing an infected cell line;

culturing the uninfected cell line and the infected cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecules from the construct, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand in the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;

isolating the secreted individual soluble class I molecules having the endogenously loaded peptide ligands bound thereto from the uninfected cell line and the infected cell line;

separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the uninfected cell and the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the infected cell;

isolating the endogenously loaded peptide ligands from the uninfected cell line and the endogenously loaded peptide ligands from the infected cell line;

comparing the endogenously loaded peptide ligands isolated from the infected cell line to the endogenously loaded peptide ligands isolated from the uninfected cell line; and

identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line that is not presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected cell line.

84. The peptide ligand of claim 83 wherein, in the step of providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the uninfected cell line containing the construct that encodes the individual soluble class I molecule is produced by a method comprising the steps of:

obtaining genomic DNA or cDNA encoding at least one class I molecule; identifying an allele encoding an individual class I molecule in the genomic DNA or cDNA;

PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule in a locus specific manner such that a PCR product produced therefrom encodes a truncated, soluble form of the individual class I molecule;

cloning the PCR product into an expression vector, thereby forming a construct that encodes the individual soluble class I molecule; and

transfecting the construct into an uninfected cell line.

85. The peptide ligand of claim 84, wherein the construct further encodes a tag which is attached to the individual soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.

86. The peptide ligand of claim 85, wherein the tag is selected from the group consisting of a HIS tail and a FLAG tail.

87. The peptide ligand of claim 85, wherein the tag is encoded by a PCR primer utilized in the step of PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule.

88. The peptide ligand of claim 85, wherein the tag is encoded by the expression vector into which the PCR product is cloned.

89. The peptide ligand of claim 83, wherein the at least one endogenously loaded peptide ligand is obtained from a protein encoded by at least one of the microorganism, the gene from the microorganism or the tumor gene with which the portion of the uninfected cell line is infected to form the infected cell line.

90. The peptide ligand of claim 83, wherein the at least one endogenously loaded peptide ligand is obtained from a protein encoded by the uninfected cell line.

91. The peptide ligand of claim 83, wherein the portion of the uninfected cell line is infected with HIV.

92. A source protein from which the peptide ligand of claim 83 is obtained.

93. A peptide ligand endogenously loaded in an individual class I molecule and presented by the individual class I molecule on an uninfected cell.

94. The peptide ligand of claim 93 wherein the peptide ligand is not endogenously loaded in the individual class I molecule and presented by the individual class I molecule on an infected cell.

95. A self protein capable of being processed into at least one peptide fragment, wherein the at least one peptide fragment is endogenously loaded in an individual class I molecule and presented by the individual class I molecule on an uninfected cell.

96. The self protein of claim 95 wherein the at least one peptide fragment is not endogenously loaded in the individual class I molecule and presented by the individual class I molecule on an infected cell.

97. A peptide ligand endogenously loaded in an individual class I molecule and presented by the individual class I molecule on an uninfected cell but not on an infected cell, the peptide ligand identified by a method comprising the steps of:

- providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the uninfected cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;
- infecting a portion of the uninfected cell line with at least one of a microorganism, a gene from a microorganism or a tumor gene, thereby providing an infected cell line;
- culturing the uninfected cell line and the infected cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecules, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand in the antigen binding groove of each

individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;

isolating the secreted individual soluble class I molecules having the endogenously loaded peptide ligands bound thereto from the uninfected cell line and the infected cell line;

separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the uninfected cell line and the infected cell line;

isolating the endogenously loaded peptide ligands from the uninfected cell line and the endogenously loaded peptide ligands from the infected cell line;

comparing the endogenously loaded peptide ligands isolated from the uninfected cell line to the endogenously loaded peptide ligands isolated from the infected cell line; and

identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected cell line that is not presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line.

98. The peptide ligand of claim 97 wherein the construct further encodes a tag which is attached to the individual soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.

99. The peptide ligand of claim 97 wherein the uninfected cell line containing the construct that encodes the individual soluble class I molecule is produced by a method comprising the steps of:

obtaining genomic DNA or cDNA encoding at least one class I molecule;

- identifying an allele encoding an individual class I molecule in the genomic DNA or cDNA;
PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule in a locus specific manner such that a PCR product produced therefrom encodes a truncated, soluble form of the individual class I molecule;
cloning the PCR product into an expression vector, thereby forming a construct that encodes an individual soluble class I molecule; and
transfecting the construct into an uninfected cell line.
100. The peptide ligand of claim 99, wherein the construct further encodes a tag which is attached to the individual soluble class I molecule and aids in isolating the individual soluble class I molecule.
101. The peptide ligand of claim 99, wherein the tag is selected from the group consisting of a HIS tail and a FLAG tail.
102. The peptide ligand of claim 99, wherein the tag is encoded by a PCR primer utilized in the step of PCR amplifying an allele encoding the individual class I molecule.
103. The method of claim 99, wherein the tag is encoded by the expression vector into which the PCR product is cloned.
104. A source protein from which the peptide ligand of claim 97 is obtained.
105. A method for identifying a self protein that is processed into at least one peptide fragment, wherein the at least one peptide fragment is

endogenously loaded in an individual class I molecule and presented by the individual class I molecule on an infected cell but not on an uninfected cell, the method comprising the steps of:

- providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the uninfected cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;
- infecting a portion of the uninfected cell line with at least one of a microorganism, a gene from a microorganism or a tumor gene, thereby providing an infected cell line;
- culturing the uninfected cell line and the infected cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecules, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand in the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;
- isolating the secreted individual soluble class I molecules having endogenously loaded peptide ligands bound thereto from the uninfected cell line and the infected cell line;
- separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the uninfected cell line and the infected cell line;
- isolating the endogenously loaded peptide ligands from the uninfected cell line and the endogenously loaded peptide ligands from the infected cell line;
- comparing the endogenously loaded peptide ligands isolated from the infected cell line to the endogenously loaded peptide ligands isolated from the uninfected cell line;

identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line that is not presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected cell line;

determining the source protein from which the at least one endogenously loaded peptide ligand is obtained; and

identifying the source protein as a self protein if the source protein is not encoded by the microorganism, gene from a microorganism or tumor gene with which the infected cell line is infected but is encoded by the uninfected cell line.

106. A method for identifying a self protein that is processed into at least one peptide fragment, wherein the at least one peptide fragment is endogenously loaded in an individual class I molecule presented by the individual class I molecule on an uninfected cell but not on an infected cell, the method comprising the steps of:

providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the uninfected cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;

infecting a portion of the uninfected cell line with at least one of a microorganism, a gene from a microorganism or a tumor gene, thereby providing an infected cell line;

culturing the uninfected cell line and the infected cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecules, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand in the antigen binding groove of each

individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;

isolating the secreted individual soluble class I molecules having endogenously loaded peptide ligands bound thereto from the uninfected cell line and from the infected cell line;

separating the endogenously loaded peptide ligands from the soluble class I molecules from the uninfected cell line and from the infected cell line;

isolating the endogenously loaded peptide ligands from the uninfected cell line and the endogenously loaded peptide ligands from the infected cell line;

comparing the endogenously loaded peptide ligands isolated from the uninfected cell line to the endogenously loaded peptide ligands isolated from the infected cell line;

identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected cell line that is not presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line; and

determining the source protein from which the at least one endogenously loaded peptide ligand is obtained.

107. A kit for identifying endogenously loaded peptide ligands for an individual class I molecule, comprising:

a cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule; the cell line capable of naturally processing proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules such that when the cell line is cultured under conditions which allow for expression of the

individual soluble class I molecule, a peptide ligand is endogenously loaded into the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell.

108. The kit of claim 107 wherein the cell line is produced by a method comprising the steps of:

obtaining genomic DNA or cDNA encoding at least one class I molecule;
identifying an allele encoding an individual class I molecule in the genomic DNA or cDNA;

PCR amplifying the allele encoding the individual class I molecule in a locus specific manner such that a PCR product produced therefrom encodes a truncated, soluble form of the individual class I molecule;

cloning the PCR product into an expression vector, thereby forming a construct that encodes an individual soluble class I molecule; and
transfecting the construct into an uninfected cell line.

109. A method for detecting a disease state, comprising the step of:

providing means for detecting an endogenously loaded peptide ligand in an individual class I molecule, wherein the endogenously loaded peptide ligand is presented by an individual class I molecule on an infected cell but not on an uninfected cell.

110. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:29.

111. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:30.

112. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:31.

113. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:32.

114. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:33.

115. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:34.

116. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:35.

117. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:36.

118. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:37.

119. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:38.

120. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:39.

121. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:40.

122. The method of claim 109, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:41.

123. The method of claim 109, wherein the disease state is HIV infection.

124. A method for detecting a disease state, comprising the step of:
providing means for detecting an endogenously loaded peptide ligand in an individual class I molecule, wherein the endogenously loaded peptide ligand is presented by the individual class I molecule on an uninfected cell but not on an infected cell.

125. A kit for detecting a disease state, comprising:
means for detecting an endogenously loaded peptide ligand in an individual class I molecule, wherein the endogenously loaded peptide ligand is presented by the individual class I molecule on an infected cell but not on an uninfected cell.

126. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:29.

127. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:30.

WO 02/30964

100

PCT/US01/31931

128. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:31.

129. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:32.

130. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:33.

131. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:34.

132. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:35.

133. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:36.

135. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:37.

136. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:38.

137. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:39.

WO 02/30964

101

PCT/US01/31931

138. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:40.

139. The method of claim 125, wherein the endogenously loaded peptide ligand comprises SEQ ID NO:41.

140. A kit for detecting a disease state, comprising:
means for detecting a peptide ligand endogenously loaded in an individual class I molecule, wherein the peptide ligand is presented by the individual class I molecule on an uninfected cell but not on an infected cell.

141. A method of identifying a motif for endogenously loaded peptide ligands presented by an individual class I molecule, comprising the steps of:
providing a cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;
culturing the cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecule from the construct, such conditions also allowing for endogenous loading of the peptide ligand into the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;
isolating the secreted individual soluble class I molecules having endogenously loaded peptide ligands bound thereto;

- separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules, thereby forming a pool of endogenously loaded peptide ligands; and
- sequencing the pool of endogenously loaded peptide ligands and deriving a motif for the endogenously loaded peptide ligands based on dominant occurrences of particular amino acids at specific positions of the endogenously loaded peptide ligands.

142. A method of targeting a compound to an infected cell, comprising the steps of:

- providing an uninfected cell line containing a construct that encodes an individual soluble class I molecule, the cell line being able to naturally process proteins into peptide ligands capable of being loaded into antigen binding grooves of class I molecules;
- infecting a portion of such cell line with at least one of a microorganism, a gene from a microorganism or a tumor gene, thereby providing an infected cell line;
- culturing the uninfected cell line and the infected cell line under conditions which allow for expression of the individual soluble class I molecule, such conditions also allowing for endogenous loading of a peptide ligand in the antigen binding groove of each individual soluble class I molecule prior to secretion of the individual soluble class I molecules from the cell;
- isolating the secreted individual soluble class I molecules having endogenously loaded peptide ligands bound thereto from the uninfected cell line and the infected cell line;

separating the endogenously loaded peptide ligands from the individual soluble class I molecules from the uninfected cell line and the infected cell line;

isolating the endogenously loaded peptide ligands from the uninfected cell line and the endogenously loaded peptide ligands from the infected cell line;

comparing the endogenously loaded peptide ligands isolated from the infected cell line to the endogenously loaded peptide ligands isolated from the uninfected cell line; and

identifying at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual soluble class I molecule on the infected cell line that is not presented by the individual soluble class I molecule on the uninfected cell line; and

targeting a compound to a cell having the at least one endogenously loaded peptide ligand presented by the individual class I molecule on a surface of the cell.

143. The method of claim 142 wherein, in the step of targeting a compound to a cell, the compound is a drug.

144. The method of claim 142 wherein, in the step of targeting a compound to a cell, the compound is an antibody.

145. The method of claim 142 wherein, in the step of targeting a compound to a cell, the compound specifically recognizes a complex formed of the at least one endogenously loaded peptide ligand and the individual class I molecule.

146. A method of isolating ligands, comprising the steps of:
optionally providing a cell line;
optionally culturing the cell line;
isolating molecules having ligands bound thereto; and
optionally separating the ligands from the molecules.
147. A ligand isolated by a method comprising the steps of:
optionally providing a cell line;
optionally culturing the cell line;
isolating molecules having ligands bound thereto; and
optionally separating the ligands from the molecules.
148. A method for identifying at least one ligand, comprising the steps of:
optionally providing a cell line;
optionally infecting a portion of the cell line;
optionally culturing the cell line;
optionally isolating molecules having ligands bound thereto;
optionally separating the ligands from the molecules;
optionally isolating the ligands; and
identifying at least one ligand.
149. A method for identifying at least one ligand, comprising the steps of:
optionally providing an uninfected cell line;

optionally infecting a portion of the uninfected cell line;
optionally culturing the uninfected cell line and the infected cell line;
optionally isolating molecules having ligands bound thereto from the uninfected cell line and the infected cell line;
optionally separating the ligands from the molecules from the uninfected cell line and separating the ligands from the molecules from the infected cell line;
optionally isolating the ligands from the uninfected cell line and the ligands from the infected cell line;
optionally comparing the ligands isolated from the uninfected cell line to the ligands isolated from the infected cell line; and
identifying at least one ligand presented by the molecule on the uninfected cell line that is not presented by the molecule on the infected cell line.

150. A ligand presented by an individual class I molecule on an infected cell but optionally not on an uninfected cell.

151. A protein capable of being processed into at least one peptide fragment, wherein the at least one peptide fragment is loaded in and/or presented by a class I molecule.

152. A ligand identified by a method comprising the steps of:

optionally infecting a portion of the cell line;
optionally culturing the cell line;
optionally isolating molecules having ligands bound thereto;
optionally separating the ligands from the molecules;
optionally isolating the ligands; and
identifying at least one ligand.

153. A ligand loaded in a molecule and presented by the molecule on a cell.

154. A protein capable of being processed into at least one peptide fragment, wherein the at least one peptide fragment is loaded in an individual class I molecule and is optionally presented by the individual class I molecule on an uninfected cell.

155. A ligand identified by a method comprising the steps of:
optionally providing an uninfected cell line;
optionally infecting a portion of the uninfected cell line;
optionally culturing the uninfected cell line and the infected cell line;
optionally isolating molecules having ligands bound thereto from the uninfected cell line and the infected cell line;
optionally separating the ligands from the molecules from the uninfected cell line and the infected cell line;
optionally isolating the ligands from the uninfected cell line and the

optionally comparing the ligands isolated from the uninfected cell line to the ligands isolated from the infected cell line; and

identifying at least one peptide ligand presented by the molecule on the uninfected cell line that is not presented by the molecule on the infected cell line.

156. A method for identifying a self protein, the method comprising the steps of:

- optionally providing a cell line;
- optionally infecting a portion of the cell line;
- optionally culturing the cell line;
- optionally isolating molecules having ligands bound thereto;
- optionally separating the ligands from the molecules;
- optionally isolating the ligands;
- optionally identifying at least one ligand;
- determining a source protein from which the at least one ligand is obtained; and
- optionally identifying the source protein as the self protein.

157. A method for identifying a self protein, the method comprising the steps of:

- optionally providing an uninfected cell line;
- optionally infecting a portion of the uninfected cell line;
- optionally culturing the uninfected cell line and the infected cell line;

optionally isolating molecules having ligands bound thereto from the uninfected cell line and from the infected cell line;
optionally separating the ligands from the molecules from the uninfected cell line and from the infected cell line;
optionally isolating the ligands from the uninfected cell line and the ligands from the infected cell line;
optionally comparing the ligands isolated from the uninfected cell line to the ligands isolated from the infected cell line;
optionally identifying at least one ligand presented by the molecule on the uninfected cell line that is not presented by the molecule on the infected cell line; and
determining a source protein from which the at least one ligand is obtained.

158. A kit for identifying ligands, comprising:
a cell line containing a construct that encodes a class I molecule.

159. A method for detecting a disease state, comprising the step of:
providing means for detecting a ligand in a molecule.

160. A method for detecting a disease state, comprising the step of:
providing means for detecting a ligand in a molecule, wherein the ligand optionally is presented by the molecule on an uninfected cell but not

161. A kit for detecting a disease state, comprising:
means for detecting a ligand in a molecule.
162. A kit for detecting a disease state, comprising:
means for detecting a ligand, wherein the ligand optionally is
presented by an individual class I molecule on an uninfected cell but not on
an infected cell.
163. A method of identifying a motif for ligands, comprising the steps of:
optionally providing a cell line;
optionally culturing the cell line;
optionally isolating molecules having ligands bound thereto;
optionally separating the ligands from the molecules, thereby forming
a pool of ligands; and
sequencing the pool of ligands and deriving a motif for the ligands.
164. A method of targeting a compound to a cell, comprising the steps of:
optionally providing a cell line;
optionally infecting a portion of such cell line;
optionally culturing the cell line;
optionally isolating molecules having endogenously loaded peptide
ligands bound thereto;
optionally separating the ligands from the molecules;

WO 02/30964

110

PCT/US01/31931

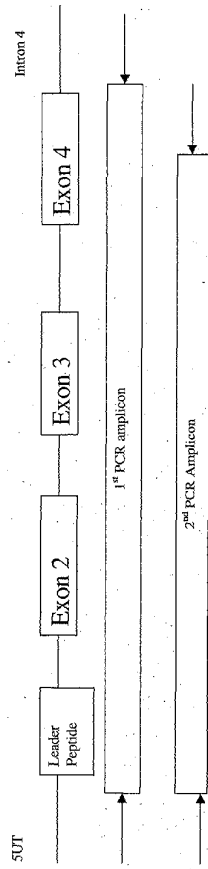
optionally identifying at least one ligand; and
targeting a compound to a cell having the at least one ligand.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/30964

PCT/US01/31931

Fig 1.



1/19

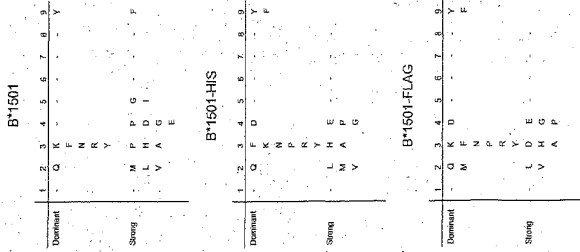
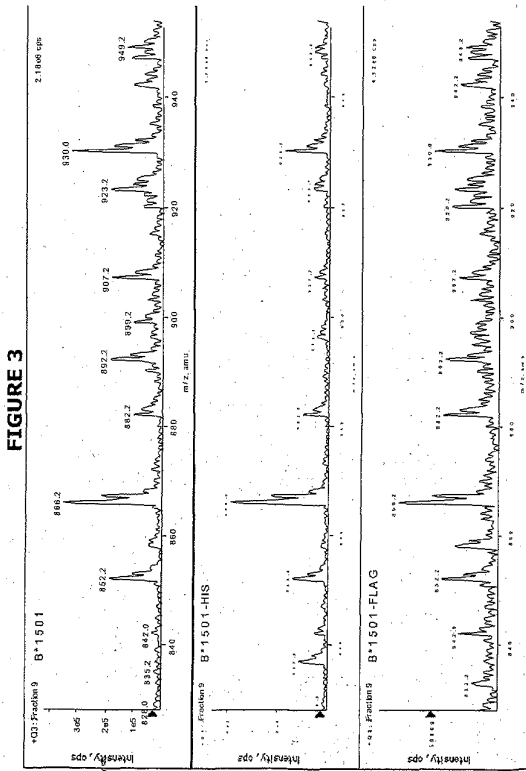


FIGURE 2



WO 02/30964

PCT/US01/31931

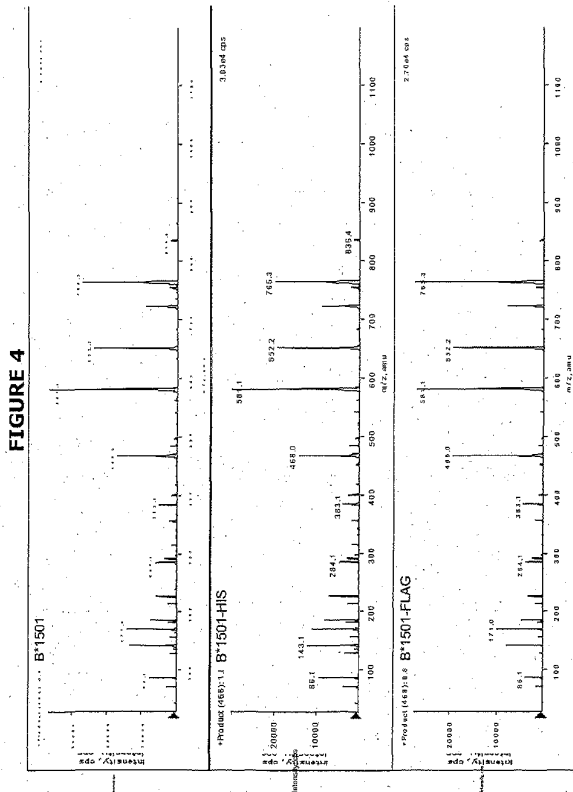
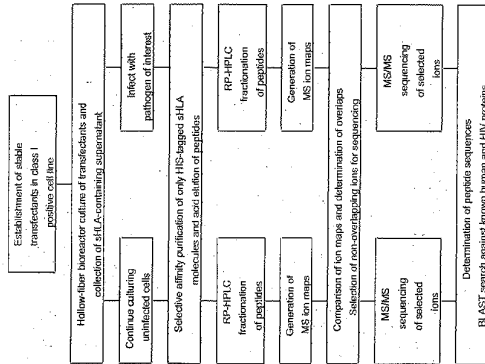


FIGURE 5



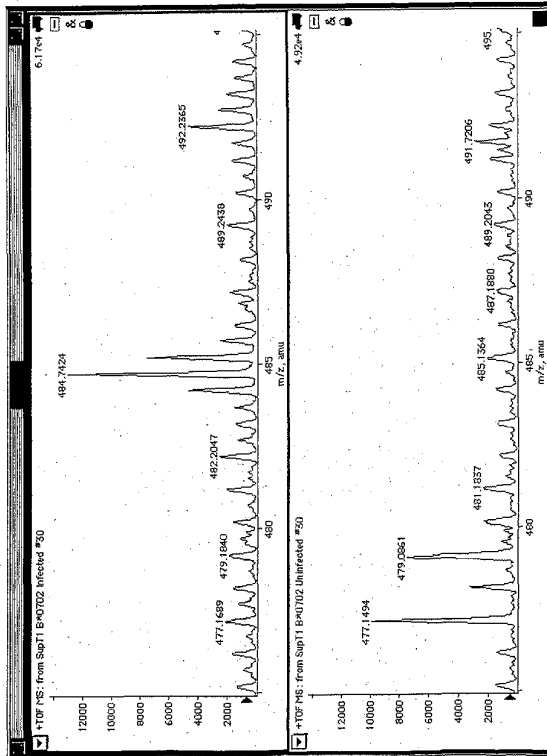


Figure 6

WO 02/30964

PCT/US01/31931

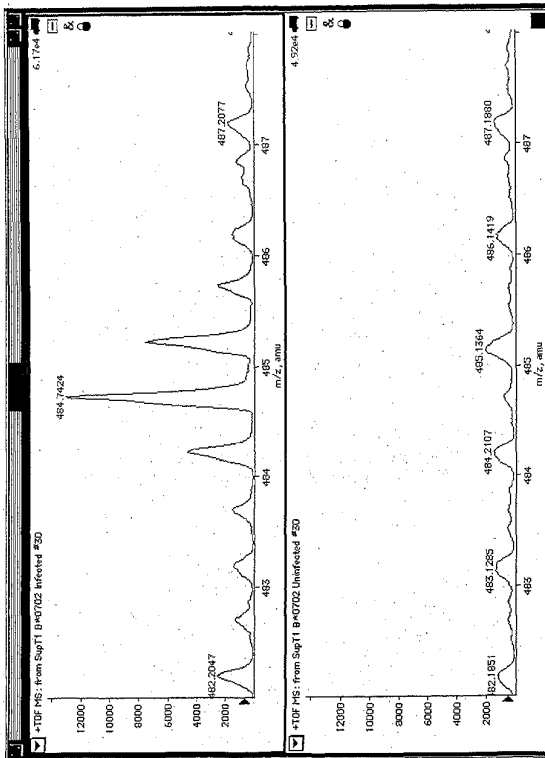


Figure 7

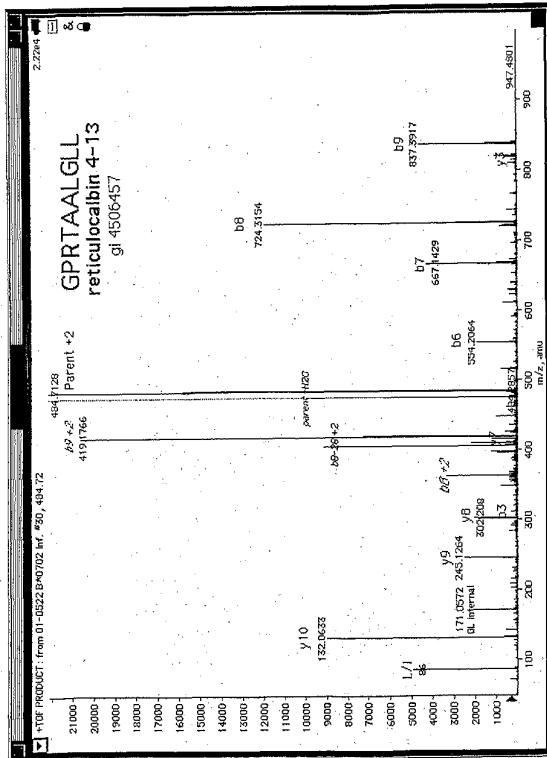


Figure 8.

| | |
|---|--|
| LIGAND | GPR1AALGLL |
| Source ELA/Purification | HLA-B*0702 from Sup-T1 subclone B*0702HIS subclone 2.44 Brandee Run D Purification number 1 (W632) Fraction 30 Infected |
| Protein Source | RETICULOCALBIN 2 |
| GI or accession # | 4506457 |
| Ligand start amino acid | 4 |
| Ligand length | Decamer |
| Predicted binding (Parker) | 800,000 |
| Protein information from GI | |
| LOCUS NP_002893 317 aa PRI 31-OCT-2000 | |
| DEFINITION reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain, Reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain (endoplasmic r | |
| reticulum calcium-binding protein, 55kD) (Homo sapiens) | |
| COMMENT REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from 8669.1. | |
| Summary: Reticulocalbin 2 is a calcium-binding protein located in the lumen of the ER. The protein contains six conserved | |
| regions with similarity to a high affinity Ca(42)-binding motif, the EF-hand. The RCN2 gene maps to the same region as type 4 | |
| Bardet-Biedl syndrome (OMIM:600374), suggesting a possible causative role for reticulocalbin 2 in the disorder. | |
| Protein sequence | |
| 1 mqrgrtcaal glllcaaaa gnglcaedlly plgersdyd realgqvcd veyvylgltg | |
| 61 eqqqrqan kkdldsdgr hseslssvr qnsthlyarq cakqtrveyd knsdtrvwd | |
| 121 eyngnydrv rfdentald daceesfrkl hikkkrrfek anqdsppgls leetratbp | |
| 181 cevdymerv rqaiccdhik rgtgrvstee fgdyrvwvpi anedpwvly ekrdrvndy | |
| 241 khdngtdlq qlpwvvyppn ggaqaqcalh lldemalngd kklaceete nppdfitsea | |
| 301 tdygrqlhld yfyhde! | |

FIG 9

Entrez-Pubmed listings:

Casper D, John M, Chen Z, Subramanian S, Wang R, Ma W, Sjovack A. Gene expression analysis of an H2O2O-resistant lens epithelial cell line. *Free Radic Biol Med*. 2001 Jul 15;31(1):90-7.

Nimnichai I, Erdmann S, Moldovan U, Finkbe H, Henrichs S, Meyer MP, Hoffmann J, Muller O. Seven genes that are differentially transcribed in endometrial tumor cell lines. *Cancer Lett*. 2000 Nov;161:601-37-43.

Ye LR, Zeng R, Shao XX, Wang N, Xu YH, Xia QC. Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2006 Aug;27(14):2659-66.

Honore B, Yonem H. The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca(2+)-binding proteins localized to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett*. 2000 Jan 21;466(1-11-8): Review.

Kent J, Lee M, Sebald A, Boyle S, Frances J, Powell M, Redman N, Abbas C, van Housingen V, Bickmore WA. The reticulocalbin gene maps to the WACR region in human and traps Shal1 expression toward decision in mouse. *Genomics*. 1997 Jun 1;42(2):249-7.

Liu Z, Brattain MG, Appert H. Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Feb 13;231(2):283-9.

Tachibana H, Nivet AF, Chiras M. Identification of the Ca(2+)-binding domains in reticulocalbin, an endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs. *J Biochem (Tokyo)*. 1997 Jan;121(1):145-9.

Weis K, Griffiths G, Lammert AI. The endoplasmic reticulum calcium-binding protein of 55 kDa is a novel EF-hand protein retained in the endoplasmic reticulum by a carboxy-terminal His-Asp-Glu-Leu motif. *J Biol Chem*. 1994 Jul 22;269(29):19442-50.

Chen JJ, Reith CE, Riedl V, Aubrey EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*. 1995 Jul 28;269(5233):579-31.

Summary of Entrez-pubmed entries:
 Reticulocalbin is a 55kD protein located in the lumen of the ER and, as the name implies, it binds calcium. It is a member of a large family of similar proteins that are found along the secretory pathway in human cells. No one knows the exact function of this protein, but it is hypothesized that it is a calcium-dependent molecular chaperone. Interestingly, this protein has been described as being upregulated in a variety of cancerous cell lines, including colorectal tumors, metastatic breast cancers, and hepatomas. In several instances, there is a multi-fold increase in its expression in the cancerous lines. In the case of breast cancer cell lines, it is found only in the invasive, metastatic lines and thus has been implicated as a potential factor of metastasis. Another interesting point is that this protein was also identified independently as the E6BP, or E6 binding protein, which binds to the human papilloma virus E6 protein. The fact that this protein is an ER resident protein and that the B7-binding peptide is derived from the leader sequence which should be cleaved in the ER gives further support to the likelihood of presentation of this peptide should reticulocalbin be upregulated in any number of cancerous or virally infected cells.

FIGURE 10

| User Parameters and Scoring Information | |
|--|-----------------|
| method selected to limit number of results | explicit number |
| number of results requested | 20 |
| HLA molecule type selected | B7 |
| length selected for subsequences to be scored | 10 |
| echoing mode selected for input sequence | Y |
| echoing format | numbered list |
| length of user's input peptide sequence | 317 |
| number of subsequences scored calculated | 308 |
| number of top-scoring subsequences reported back in scoring output table | 20 |

| Scoring Results | | | |
|-----------------|----------------|-----------------------------|---|
| Rank | Start Position | Subsequence Residue Listing | Score (Estimate of Half Time of Dissociation of a Molecule Containing This Subsequence) |
| 1 | 4 | GGPAAAGLL | 800.000 |
| 2 | 284 | DQGGAPVALL | 60.000 |
| 3 | 19 | AGAGAAEEL | 56.000 |
| 4 | 220 | TAAGAPFEL | 18.000 |
| 5 | 268 | ALPLIDFDL | 12.000 |
| 6 | 160 | KARNSGPEL | 12.000 |
| 7 | 166 | GGALAEYI | 8.000 |
| 8 | 287 | ELEENPFL | 6.000 |
| 9 | 6 | RTAALGHLL | 4.000 |
| 10 | 260 | PGGAPFEL | 4.000 |

Peptide is expected to bind to B7 with high affinity. (Estimated half time of dissociation is 800.00)

Figure 11.

PEPTIDE BINDING PREDICTION USING RAMMENSEE'S SYPEITHI PREDICTION:



Search Report

Return to search conditions
HLA-B*0702 decaners

HLA-B*0702 decaners

| Pos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | Score |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| 4 | G | P | R | T | A | A | L | G | L | L | 22 |
| 166 | G | P | G | L | S | L | E | E | F | I | 18 |
| 291 | N | P | D | L | F | I | T | S | E | A | 18 |
| 248 | D | P | Q | E | L | L | P | W | V | V | 17 |
| 1 | M | R | L | G | P | R | T | A | A | L | 15 |
| 6 | R | T | A | A | L | G | L | L | L | L | 15 |
| 35 | R | R | S | D | Y | D | R | E | A | L | 15 |
| 199 | D | K | N | G | D | G | F | V | S | L | 15 |
| 19 | A | A | C | A | G | K | A | E | E | L | 14 |
| 287 | E | I | L | E | N | F | D | L | F | L | 14 |
| 5 | P | R | T | A | A | L | G | L | L | L | 13 |
| 30 | Y | P | L | G | E | R | R | S | D | Y | 13 |
| 36 | R | S | D | Y | D | R | E | A | L | L | 13 |
| 48 | Q | E | D | V | D | E | Y | V | K | L | 13 |
| 72 | K | I | D | L | D | S | D | G | F | L | 13 |
| 130 | V | I | D | F | D | E | N | T | A | L | 13 |

12 / 19

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Peptide is predicted to bind HLA-B*0702 with a high affinity. Rammensee's prediction scores this peptide 22.

Figure 12.

PREDICTED PROTEASOMAL CLEAVAGE OF COMPLETE RETICULOCALBIN PROTEIN BY PA PRO C:
 PAProC predicts the following (109) proteasomal cleavages (made by human proteasome type III) in Name (317 amino acids)

| | | |
|-----|------------|--------------------------|
| 1 | MRIGPRTA | ALGILLICAAAA |
| 21 | CAGK | AE ELHY PLGE RRSYD |
| 41 | REALLGV | Q EDVD RYV K L GHE |
| 61 | E OOKR | L Q AIKK I DLD SDG F |
| 81 | L TE SEL | S SW IQM S FRH YA M Q |
| 101 | EA KQO | FV EYD KN S D DTVTW D |
| 121 | EY NIQMDRV | I DF D ENTALD |
| 141 | D AE EE | S F R K L HLK D KKR FE K |
| 161 | A N QDSG | PGL SL E EPI AF E H P |
| 181 | EEVD YMTF | V I Q E ALEE HDK |
| 201 | NGDGFV | SL E EPL GD Y RMDPT |
| 221 | AM EDPWILV | E KD RFV ND YD |
| 241 | KD NFG | RLDPQELL PWWPNN |
| 261 | QGLAQ | E EALHLI D EMDING D |
| 281 | KK L SE | E EILKNDLFL T SE A |
| 301 | T DYG | RQL HD DY FYHDEL |

The proteasome is not predicted to cleave this protein to produce this peptide.

Figure 13.

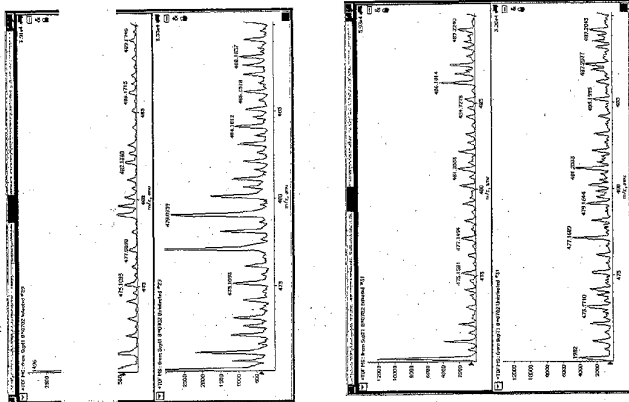
OTHER PEPTIDES PREDICTED TO BE PRESENTED FROM THIS PROTEIN:

| | | | |
|-----------|-----------------------|-------|----|
| A*0201 | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 | Score | 27 |
| | R L G P R T A A L | | |
| | A L L G V Q E D V | | 26 |
| | I L L V E K D R F V | | 25 |
| | T A A L G L L L L | | 23 |
| Nonantres | R L Q A I I K K I | | 23 |
| | I L L E N P D L P L | | 23 |
| | A L G L L L L C A | | 22 |
| | G L L L L C A A A | | 21 |
| | L L L L C A A A A | | 21 |
| | I A F E H P E E V | | 21 |
| | Y D R R A A L L G V | | 20 |
| | S L E E F I A F E | | 20 |
| | L L C A A A A G A | | 19 |
| | A G A G K A E E L | | 19 |
| | I A Q E E A L H L | | 19 |
| | R T A A L C L L L | | 18 |
| | K A E E L H Y P L | | 18 |
| | K N G D G F V S L | | 18 |
| | S L E E F L G D Y | | 18 |
| | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 | Score | 22 |
| | A M Q E A K Q Q F V | | |
| | F I A F E H P E E V | | 22 |
| | G I A Q E E A L H L | | 22 |
| | A L H L I E M D L | | 22 |
| | R T A A L G L L L L | | 21 |
| | A L G L L L L C A A | | 21 |
| | L L L C A A A G A | | 21 |
| | Y M T F F V I Q E A A | | 21 |
| | J A Q E E A L H L I | | 21 |
| | G L L L L C A A A A | | 20 |
| | W I L V E K D R F V | | 20 |
| | K L S E E E I L E N | | 20 |
| | E I L E N P D L P L | | 20 |
| | A A L G L L L L C A | | 19 |
| | K I D L D S D G F L | | 19 |
| | V I D F D E N T A L | | 19 |
| | I L E N P D L F L T | | 19 |
| | A A G A G K A E E L | | 18 |
| | F L T E S E L S S W | | 18 |
| | K A N Q D G P G L | | 18 |
| | L I D E M D L N G D | | 18 |
| | M R L G P R T A A L | | 17 |
| | L L L L C A A A G | | 17 |

Figure 15. A*0201

WO 02/30964

PCT/US01/31931



View of previous fraction showing 484.72:
Fraction 29

No evidence of the peptide in this fraction.

View of post fraction showing 484.72:
Fraction 31

No evidence of the peptide in this fraction.

Figure 16

MS/MS of uninfected fraction 30 ion 484.72 under identical collision conditions to prove ion not present:

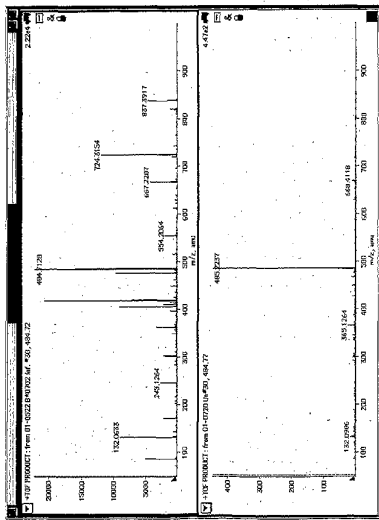


Figure 17.

WO 02/30964

PCT/US01/31931

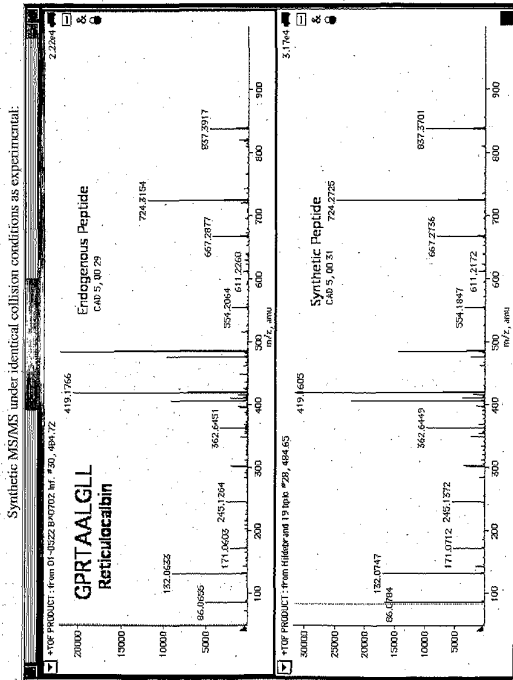


Figure 18.

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/030964 A3

(51) International Patent Classification: C12P 21/02, C07K 14/74, 14/155, 14/705, C12N 9/50, C07K 14/47, C12N 9/12, C07K 14/78, C12Q 1/02, G01N 33/53, 33/569, 33/574, A61K 47/42

(74) Agents: PALMER, John et al.; Ladas & Parry, 5670 Wilshire Boulevard, Suite 2100, Los Angeles, CA 90056-5679 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/31931

(81) Designated States (national): AI, 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, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 10 October 2001 (10.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/240,143 10 October 2000 (10.10.2000) US
60/256,409 18 December 2000 (18.12.2000) US
60/256,410 18 December 2000 (18.12.2000) US
60/299,452 20 June 2001 (20.06.2001) US
09/974,366 10 October 2001 (10.10.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, 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, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA [US/US]; 1000 AsP Avenue, Norman, OK 73019 (US).

Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
25 September 2003(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): HICKMAN, Heather [US/US]; 700 NW 49th Street, Oklahoma City, OK 73118 (US); HILDEBRAND, William [US/US]; 900 Northcreek Drive, Edmond, OK 73034 (US).

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 02/030964 A3

(54) Title: COMPARATIVE LIGAND MAPPING FROM MHC POSITIVE CELLS

(57) Abstract: The present invention relates generally to a methodology for the isolation, purification and identification of peptide ligands presented by MHC positive cells. In particular, the methodology of the present invention relates to the isolation, purification and identification of these peptide ligands from soluble class I and class II MHC molecules which may be uninfected, infected, or tumorigenic. The methodology of the present invention broadly allows for these peptide ligands and their concomitant source proteins thereof to be identified and used as markers for infected versus uninfected cells and/or tumorigenic versus nontumorigenic cells with said identification being useful for marking or targeting a cell for therapeutic treatment or priming the immune response against infected cells.

スI陰性721・221細胞にトランスフェクションし、以前に設定した通りにペプチド精製した(Prilliman, K Ret al, 1998, 本明細書で上記に参考として引用)。2個の尾のあるトランスフェクタントを尾のない可溶性のB*1501と比較することによって、タグ付加はクラスI分子のペプチド結合特異性に影響せず、従って直接ペプチドリガンドマッピングおよびシーケンシングに有害な効果を持たないと決定することができた。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0086】

幾つかのリガンド配列を、生成したフラグメンテーションパターンから明確に決定した。ヒトペリプラキン(periplakin)由来のリガンドQGLISRGYSY(配列番号:45)を、画分18で溶出したペプチドから配列決定した。40Sリボソームタンパク質S26の範囲がマッチする11マーである第二のリガンドAVRDISEASVF(配列番号:46)を、画分20で同定した。特に、これら2種類のペプチドは、B*1501溶出リガンドのシーケンシングの際に本発明者らの実験室によって以前に報告された現象であるモチーフデータによって予想されたストロングコンセンサスグルタミンを欠いていた(Prilliman, K Ret al, 1997, 本明細書で参考として上記に引用)。しかしながら、これらのリガンドは芳香族性のチロシンまたはフェニルアラニンで終わっており、これらのアミノ酸はいずれもEdmanシーケンシングデータおよび以前に公表された観察結果によってストロングアンカーであることが予想された(Prilliman, K Ret al, 1998, 本明細書で参考として上記に引用)。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0088

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0088】

クラスI陽性細胞からトランスフェクションしたクラスI分子およびそのペプチドリガンドを偏向しない方法で選択的に精製するには、非クラスI陽性細胞でのクラスI精製の態様を偏向する必要があった。既に広汎に特性決定されているクラスI陽性分子B*1501へのFLAGおよび6-HISタグ(配列番号:44)のC末端付加は、ペプチド結合にほとんどまたは全く影響しないことが示された。この方法は、内在発現したクラスI分子の複雑な混合物から単一のクラスI特異性を精製できるようにデザインされた。テイルのあるおよび尾のないB*1501分子から溶出したリガンドを比較して、ペプチドレパートリーに対するテイルの付加の影響を評価した。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0091

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0091】

次に、選択したイオンMS/MSシーケンシングし、3種類の分子間のフラグメンテーションパターンを比較することによってマッピングしたイオンオーバーラップが実際に正確なりガンドマッチを表していることを確かめた(図4)。約60種類のペプチドを最初にMS/MS用に選択した-それぞれの画分から10。全般的には、フラグメンテーションパターン検討を行ったペプチドの大部分では正確にマッチした(表VI)。非マッチと

して分類されたフラグメンテーションパターンは同じ質量 / 電荷比で存在するペプチドの混合物から生じ、それらの1個以上はタグ付き分子に存在し、B * 1501からの同一イオンのスペクトルでは明らかではなかった。配列 - レベルマッチの中、H I Sのテイルのある分子由来のリガンドは、F L A Gのテイルのある分子から溶出したものよりB * 1501由来のものに一層緊密にマッチした。全体では、52 / 57のH I Sペプチドが正確なマッチであり、39 / 56のF L A Gペプチドは同等であった。従って、このデータは、6 - H I Sタグ (配列番号 : 44) がF L A Gタグよりも内生性ペプチド結合を妨害しないが、いずれのタグもB * 1501が結合したペプチドを劇的に変化させないことを示している。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0092

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0092】

3種類総ての分子から溶出したペプチドの画分に存在する小数の個々リガンド配列は、M S / M Sによって決定した。2個の最も明確な配列A V R D I S E A S V F (配列番号 : 46) およびQ G L I S R G Y S Y (配列番号 : 45) は、尾のあるクラスI分子が実際に内在性ペプチドリガンドを装填したことを示している。これは、C末端タグの付加が可溶性のH L A - B * 1501分子が自然に内在性ペプチドに結合することができることを排除しないという仮説を支持している。更に、いずれのペプチド配列も、フェニルアラニンまたはチロシンからなる一層保存されたC - 末端と対になった異質なN - 末端を有するB * 1501から溶出したペプチドについて以前に報告されているものと厳密にマッチした。均質なE d m a n配列、ほぼ同一のフラグメンテーションパターン、および3分子間で共有されているペプチドリガンドを考慮して、本発明者らはC末端タグの付加がB * 1501を結合したペプチドを著しく変化させないと結論した。溶出したペプチドのマッピングおよび消去式比較は、クラスI H L A分子が結合した個々のリガンドの差および類似性を確認するための直接的な手段である。実際に、消去式比較は、オーバーラップしているリガンドが密接に関連したH L A - B 15サブタイプを横切ってどのように結合しているかを示し、並びにどのリガンドがウイルス感染細胞に特有であるかを指摘している。溶出したペプチドリガンドの直接的比較分析は多くの目的に極めて適しており、それらの目的の少なくともからぬものがウイルスおよび癌C T Lエピトープ検出である。C末端エピトープタグの付加により、クラスI分子、従って、図5に示されるように、ウイルス感染を持続または腫瘍形成性薬剤を収容することができる細胞系におけるペプチドリガンドの産生および精製の可能な方法が提供される。このような系からの直接的ペプチド分析は病原性要素の宿主コントロールについて重要な情報を生じるものであり、同時に合理的なワクチン開発のための重要な基礎単位を提供するものである。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0118

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0118】

配列同定。一例としてペプチドG P R T A A L G L L (配列番号 : 40) を用いてこの処理手続きの適用によって見られる結果が、包含される。この方法によって得られた他の例およびデータを、表V I Iに示す。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0121

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0121】

イオンを同定した後、この工程の次の段階は、タンデムマスペクトル分析法を用いることによってペプチドを配列決定することである。図8は、ペプチドを断片化するとき生成したスペクトルを示す。これらの断片を用いて、ペプチドのアミノ酸配列を識別する。このペプチドの配列は、G P R T A A L G L L (配列番号: 40)であると決定した。このペプチドを、感染したHLA-B*0702分子から単離した。初期の品質管理段階は、ペプチドの配列を検討して、この分子によって提示されることが以前に示された配列に適合するかどうかを見た。B*0702は、その第二の位置(P2)にG、およびそのC末端アンカーとしてLを有するペプチドを結合する。この情報に基づけば、この配列はB*0702によって提示されたペプチドであると思われる。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0122

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0122】

ペプチドの特性決定の説明。 ペプチド配列を得たならば、供給源タンパク質についての情報が得られ、これからペプチドが感染細胞の細胞質ゾルに誘導される。最初に、BLAST検索(National Center for Biotechnologyのウェブサイトで利用可能)を行って、ペプチドについてのタンパク質情報を提供する。配列G P R T A A L G L L (配列番号: 40)を用いるBLAST検索によって、タンパク質であるレティキュロカルピン2が引き寄せられた。供給源タンパク質を知った後、タンパク質についての情報を最初にPubMed(これもNational Center for Biotechnologyのウェブサイトで利用可能)から確かめ、図9に見られるように容易に参照することができるフォーマットにする。タンパク質についての総ての取得番号、およびタンパク質のオリジナルの記載が包含される。これによって、将来の使用についての情報に戻りやすくなる。また、タンパク質配列をコピーして、貼り付け、後での検索用に組込むためのテキスト文書として保存する。ペプチドはタンパク質全体で強調され、何に由来するかおよび全タンパク質がどの程度の大きさかについて幾らかの情報が提供される。これが、配列決定後の最初のデータ収集段階である。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0125

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0125】

ペプチド結合アルゴリズムを行った後、タンパク質からペプチドへの通常の処理中に、ペプチドをプロテアソームによって生成させることができるかどうかを決定する目的で、検索を行う。クラスIペプチド装填のための多数の経路が現在示されており、ヒトプロテアソームについての開裂アルゴリズムはいかなる手段によっても良好には設定されていない点に十分留意すべきである。正の結果は、プロテアソームが開裂に大きく関わっていることを示すことがあるが、負の結果は、ペプチドがクラスI分子で提示されないことを決して示していない。図13に、開裂プレディクターPaPrOC(URLで入手可能)を用いて供給源タンパク質のレティキュロカルピンについて行った第一のプロテアソーム開裂の結果を示す。エピトープの概略を示す。この予測ソフトウェアによっては、ペプチドが正常なプロテアソームによって開裂されることは予想されない。このことは、感染細胞では、特にレティキュロカルピンペプチドに関して代替経路のMHCクラスI提示が用いられていることを意味する。これは、また、ウイルス感染の際の新規な治療方法を提示することもできる。第二のプロテアソーム開裂検索も、図14に示されるように、予測ソフ

トウェア Net Chop (ワールドワイドウェブで入手可能) で用いられる。この予測法および当該技術分野における現在用いられている文献からの他のデータによって、ペプチドをプロテアソームによって作製し、開裂して、同定される G P R T A A L G L L (配列番号: 40) を形成する。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0130

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0130】

最後に、ペプチド配列が最初に同定したものと同一であることを最終的に立証するため、MS/MSフラグメンテーションパターンから同定したペプチド配列と同じアミノ酸からなる合成ペプチドを合成した。レティキュロカルピンペプチド(すなわち、484.72における画分30のイオン)については、ペプチド「G P R T A A L G L L」(配列番号: 40)を合成した。次に、このペプチドを採用して、以前に用いたのと同条件下でMS/MSを行った。図18は、内在装填したレティキュロカルピンペプチドのMS/MSから生成したスペクトルを示す。これに見られるように、ほとんど総てのアミノ酸の組合せは断片の生成および存在する断片の強度のいずれについても全く異なる断片の組を生じるので、スペクトルのマッチングは、このペプチド配列がG P R T A A L G L L (配列番号: 40)であることを示している。図18は、同一衝突条件下での内在性および合成「G P R T A A L G L L」(配列番号: 40)ペプチドのMS/MSを示す。MS/MSグラフは実質的に同一であることが分かる。

【手続補正 12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0131

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0131】

本発明によれば、ペプチドリガンド(すなわち、「G P R T A A L G L L」(配列番号: 40))が、H I V M N - 1 ウイルスに感染した細胞のB*0702クラスI M H C分子によって提示されるが未感染細胞では提示されないものとして同定された。当業者であれば、このようなペプチドリガンドの直接同定における本発明の方法の新規性および有用性、およびこのような同定が多数の治療(ワクチン開発、薬剤ターゲティング)および診断手段に対して有する重要性を理解することができる。多数の他のペプチドリガンド自体が、(未感染細胞とは反対に)H I V M N - 1に感染した細胞でのみ同定されており、これらの結果を表V I Iにまとめている。当業者であれば、本明細書を考慮すれば、「G P R T A A L G L L」(配列番号: 40)ペプチドリガンド、並びに目的とする微生物に感染した細胞および/または腫瘍形成性細胞に見られる他の唯一提示されるペプチドリガンドを完全に同定することができる。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0134

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0134】

同様に、表V I Iに示されているように、未感染細胞の個々のクラスI M H C分子ペプチドによっては提示されない未感染細胞の個々のクラスI M H C分子で提示されるペプチドリガンドを同定することもできる。例えば、ペプチド「G S H S M R Y」(配列番号: 42)は、本発明の方法によって、未感染細胞では提示されるが感染細胞では提示されない個々のクラスI M H C分子として同定された。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 9】

図 8 で同定した配列 G P R T A A L G L L (配列番号 : 4 0) による P u b M e d B L A S T 検索の結果。

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 13

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 13】

開裂プレディクター P a P r o C を用いる完全なレティキュロカルピンタンパク質 (配列番号 : 4 7) の予想プロテアソーム開裂の結果。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 14

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 14】

開裂プレディクター N e t C h o p 2 . 0 を用いる完全レティキュロカルピンタンパク質 (配列番号 : 4 7) の予想プロテアソーム開裂の結果。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 18

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 18】

合成ペプチド G P R T A A L G L L (配列番号 : 4 0) と感染した可溶性の B * 0 7 0 2 S u p T 1 細胞から単離したペプチドイオン 4 8 4 . 7 2 の M S / M S フラグメンテーションパターンの比較。

【手続補正 18】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 9 】

| | |
|---------------------|--|
| リガンド | GPRTAALGLL (配列番号 : 40) |
| HLA 供給源/精製 | Sup-T1 サブクローン B*0702tHIS サブクローン 2.44 由来の HLA-B*0702 Brandee Run D 精製番号 1 (W6/32) 画分 30 感染 |
| タンパク質供給源 | レティキユロカルビン 2 |
| GI または取得番号 | 4506457 |
| リガンド出発アミノ酸 | 4 |
| リガンド長 | デカマー |
| 予想結合 (Parker) | 800.000 |
| GI からのタンパク質情報 | |
| LOCUS | NP_002893 317 aa PRI 31-OCT-2000 |
| 定義 | レティキユロカルビン 2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン;レティキユロカルビン 2, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン(小胞体カルシウム結合タンパク質, 55kD)[ホモサビエンス] |
| 注解 | REFSEQ の検討 : この記録は NCBI スタップによって行われた。参照配列は 8669.1 から誘導した。 概要: レティキユロカルビン 2 は ER の内腔に位置したカルシウム結合タンパク質である。このタンパク質は、高親和性の Ca (+2)-結合モチーフ、EF-ハンドと類似した 6 個の保存領域を有する。RCN-2 遺伝子は 4 型 Bardet-Biedl 症候群 (MIM:600374) と同じ領域に位置し、この疾患におけるレティキユロカルビン 2 によって引き起こされる可能性を示唆している。 |
| タンパク質配列 (配列番号 : 47) | |
| 1 | mrigrprtaal gllllcaaaa gagkaeelhy plgerssdyd reallgvqed vdeyvklghe |
| 61 | eqqlrlqaii kkidldsdgf lteselsswi qmsfkhyamq eakqfveyd knsddtvtwd |
| 121 | eyniqmydrv idfentald daeesfrkl hkkkrfek anqdsppgls leefiafeh |
| 181 | eevdymtefv iqealeehdk ngdgrfvslee figdyrdpt anedpewilv ekdrfvndyd |
| 241 | kdndgrldpq ellpwvvpnn qgiaqeealh lidemdingd kklseeeile npdlfitsea |
| 301 | tdygrqlhdd yfyhdel |

【 手続補正 19 】

【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 1 1

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 1 1 】

| ユーザーパラメーターおよび評価情報 | |
|-----------------------|---------|
| 結果の数を制限するために選択した方法 | 明確な数 |
| 要求された結果の数 | 20 |
| 選択したHLA分子の型 | B7 |
| 評価を行うサブ配列について選択した長さ | 10 |
| 入力配列について選択したエコイングモード | Y |
| エコイングフォーマット | 数値を付けた系 |
| 入力ペプチド配列の長さ | 317 |
| 計算したサブ配列の得点の数 | 308 |
| 評価出力表に報告される最高評価サブ配列の数 | 20 |

| 評価結果 | | | |
|------|------|--------------|------------------------------|
| ランク | 出発位置 | 配列残基リスト | 得点(このサブ配列を含む分子の解離の半分の時間の推定値) |
| 1 | 4 | GPRTaALGLL ← | (配列番号:40) 800.000 |
| 2 | 244 | DGRldPQELL | (配列番号:48) 60.000 |
| 3 | 19 | AAGAgKAEEL | (配列番号:49) 36.000 |
| 4 | 220 | TANEdPEUIL | (配列番号:50) 18.000 |
| 5 | 268 | ALHLIDEMDL | (配列番号:51) 12.000 |
| 6 | 160 | KANQdSGPGL | (配列番号:52) 12.000 |
| 7 | 166 | GPGLsLEEFI | (配列番号:53) 8.000 |
| 8 | 287 | EILEnPDLFL | (配列番号:54) 6.000 |
| 9 | 6 | RTAaIGLLLL | (配列番号:55) 4.000 |
| 10 | 260 | NQGlaQEEAL | (配列番号:56) 4.000 |

ペプチドは、高親和性でB7に結合することが予想される(解離の半分の時間の推定値は800.00である)。

【 手続 補正 2 0 】

【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 1 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 1 2 】

RAMMENSEEのSYPEITHI予測を用いるペプチド結合予測



検索報告

検索条件に戻る
HLA-B*0702デカマ-

HLA-B*0702デカマ-

| 位置 | 配列番号 | 得点 |
|-----|------|----|
| 4 | 40 | 22 |
| 166 | 53 | 18 |
| 291 | 57 | 18 |
| 248 | 58 | 17 |
| 1 | 59 | 15 |
| 6 | 55 | 15 |
| 35 | 60 | 15 |
| 199 | 61 | 15 |
| 19 | 49 | 14 |
| 287 | 54 | 14 |
| 5 | 62 | 13 |
| 30 | 63 | 13 |
| 36 | 64 | 13 |
| 48 | 65 | 13 |
| 72 | 66 | 13 |
| 130 | 67 | 13 |

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
 G P R T A A L G L L
 G P G L S L E E F I
 N P D L L F L T S E A
 D P Q E L L P W V V
 M R L G P R T A A L
 R T A A L G L L L L
 R R S D Y D R E A L
 D K N G D G F V S L
 A A G A G K A E E L
 E I L E N P D L F L L
 P R T A A L G L L L
 Y P L G E R R S D Y
 R S D Y D R E A L L
 Q E D V D E Y V K L L
 K I D L D S D G F L L
 V I D F D E N T A L

ペプチドは、HLA-B*0702に高親和性で結合することが予想される。
RAMMENSEEの予測は、このペプチド22を評価している。

- 【 手続補正 2 1 】
- 【 補正対象書類名 】 図面
- 【 補正対象項目名 】 図 1 5 a
- 【 補正方法 】 変更
- 【 補正の内容 】

【 図 1 5 a 】

このタンパク質から提示されることが予測される他のペプチド

A*0201

ノカマー

テカマー

配列番号:

得点

| | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| RLGPR | I | A | A | L | | | | | 68 |
| A | L | L | G | V | Q | E | D | V | 69 |
| I | L | V | E | K | D | R | F | V | 70 |
| T | A | A | G | L | L | L | | | 71 |
| R | L | Q | A | I | I | K | K | I | 72 |
| I | L | E | N | P | D | L | F | L | 73 |
| A | L | G | L | L | L | C | A | | 74 |
| G | L | L | L | C | A | A | | | 75 |
| L | L | L | C | A | A | A | | | 76 |
| I | A | F | E | H | P | E | E | V | 77 |
| Y | D | R | E | A | L | L | G | V | 78 |
| S | L | E | E | F | I | A | F | E | 79 |
| L | L | C | A | A | A | A | G | A | 80 |
| A | G | A | G | K | A | E | E | L | 81 |
| I | A | Q | E | E | A | L | H | L | 82 |
| R | T | A | A | L | G | L | L | L | 83 |
| K | A | E | E | L | H | Y | P | L | 84 |
| K | M | G | D | G | I | V | S | L | 85 |
| S | L | E | E | F | L | G | D | Y | 86 |

配列番号:

得点

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | |
| A | M | O | E | A | K | Q | Q | E | V | 87 |
| F | I | A | F | E | H | P | E | E | V | 88 |
| G | I | A | Q | E | E | A | L | H | L | 89 |
| A | L | H | L | I | D | E | H | D | L | 90 |
| R | T | A | A | L | G | L | L | L | L | 91 |
| A | L | G | L | L | L | C | A | A | | 92 |
| L | L | C | A | A | A | A | G | A | | 93 |
| Y | M | T | F | V | I | Q | E | A | | 94 |
| I | A | Q | E | E | A | L | H | L | I | 95 |
| G | L | L | L | C | A | A | A | | | 96 |
| W | I | L | V | E | K | D | R | F | V | 97 |
| K | L | S | E | E | E | I | L | E | N | 98 |
| E | I | L | E | N | P | D | L | F | L | 99 |
| A | A | L | G | L | L | L | C | A | | 100 |
| K | I | D | L | S | D | G | F | L | | 101 |
| V | I | D | F | D | E | N | T | A | L | 102 |
| I | L | E | N | P | D | L | F | L | I | 103 |
| A | A | G | A | G | K | A | E | E | L | 104 |
| F | I | T | E | S | L | E | S | W | | 105 |
| K | A | N | Q | D | S | G | P | G | L | 106 |
| L | I | D | E | N | D | L | N | G | D | 107 |
| H | R | L | G | P | E | T | A | A | L | 108 |
| L | L | L | L | C | A | A | A | G | | 109 |

- 【 手続 補正 2 2 】
- 【 補正対象書類名 】 図面
- 【 補正対象項目名 】 図 1 5 b
- 【 補正方法 】 変更
- 【 補正の内容 】

A*0201

【図 15 b】

A1

ノナマー

1 2 3 4 5 6 7 8 9
 S L E E F L G D Y
 W D E Y N I Q M Y
 E K D R F V N D Y
 R L D P Q E L L P
 A Q K A E E L H Y
 A I D Y G R Q L H
 E A K Q Q F V E Y
 F E N P E E V D Y
 N E D P E W I L V
 L S E E I L L E N
 V D E Y V K L G K
 D Y D R E A L L G
 W I O H S F X H Y
 H I E F V I Q E A
 I L E N P D L F L

配列番号:

110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124

得点

28
26
26
25
22
22
20
20
20
20
19
18
18
18
18

テカマー

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
 S D D T V T U D E Y
 T U D E Y N I Q M Y
 A F E H P E E V D Y
 A I D Y G R Q L M D
 G A G K A E E L H Y
 N E D P E W I L V E
 R L D P Q E L L P V
 D L D S D G E L L E
 S W I Q M S F K H Y
 V L E E F L G D Y
 Y P L G E R R S D Y
 E S E L S S W I Q K
 Q E A K Q Q I V E Y
 A E E L H Y P L G E
 H E E Q O K R L Q A
 N Q D S G P G L S L
 N G D G F V X L E E
 A N E D P E W I L V
 V E K D R F V N D Y
 D K D N D G E L D P
 A Q E E A L H L I D

配列番号:

125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145

得点

27
26
26
23
21
21
21
20
20
20
19
18
18
17
17
17
17
17
17
17
17

A1

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No PCT/US 01/31931 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P21/02 C07K14/74 C07K14/155 C07K14/705 C12N9/50 C07K14/47 C12N9/12 C07K14/78 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/574 A61K47/42 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12P C07K C12N C12Q G01N A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | PRILLIMAN K. ET AL.: "Large-scale production of class I bound peptides: assigning a signature to HLA-B*1501" IMMUNOGENETICS, vol. 45, 1997, pages 379-385, XP002216938 cited in the application the whole document | 1,4,6,8,9,14,15,107,108,141,158 |
| X | PRILLIMAN K.R. ET AL.: "Complexity among constituents of the HLA-B*1501 peptide motif" IMMUNOGENETICS, vol. 48, 1998, pages 89-97, XP001124304 cited in the application the whole document | 1,4,6,8,9,14,15,107,108,141,158 |
| | --- -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 18 October 2002 | | Date of mailing of the international search report 17. 02. 2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5918 Patentstrasse 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Macchia, G |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/31931

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|--|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | PRILLIMAN K.R. ET AL.: "Peptide motif of the class I molecule HLA-B*1503" IMMUNOGENETICS, vol. 49, 1999, pages 144-146, XP001124303 the whole document | 1,4,6,8, 9,14,15, 107,108, 141,158 |
| X | SMITH K.D. ET AL.: "Probing HLA-B7 conformational shifts induced by peptide-binding groove mutations and bound peptide with anti-HLA monoclonal antibodies" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 157, 1996, pages 2470-2478, XP002216939 the whole document | 158 |
| P,X | HICKMAN H.D. ET AL.: "C-terminal epitope tagging facilitates comparative ligand mapping from MHC class I positive cells" HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 61, December 2000 (2000-12), pages 1339-1346, XP002217153 the whole document ----- | 1-4,6, 8-15, 42-44, 46-54, 56-58, 60-65, 105-108, 141,158 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

| | |
|--|---|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | International application No. PCT/US 01/31931 |
| Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet) | |
| This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: | |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 142-145 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> | Claims Nos.: 134 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210 |
| 3. <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). |
| Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet) | |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows: | |
| see additional sheet | |
| 1. <input type="checkbox"/> | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. |
| 2. <input type="checkbox"/> | As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. |
| 3. <input type="checkbox"/> | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: |
| 4. <input checked="" type="checkbox"/> | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-15, 42-66, 105-108, 141-145, 158 (all completely) |
| Remark on Protest | <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. |

International Application No. PCT/US 01/31931

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 134

Claim 134 is missing in the claim listing, consequently, this claim could not be searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/US 01/31931

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-15, 42-66, 105-108, 141-145, 158 all totally
Methods as disclosed in claims 1-15, 42-66, 105, 106, 141-145 and related kits.
2. Claims: 17, 18, 68, 110, 126 all totally; 16, 67, 83-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:29. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.
3. Claims: 19, 20, 69, 111, 127 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:30. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.
4. Claims: 21, 22, 70, 112, 128 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:31. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.
5. Claims: 23, 24, 71, 113, 129 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:32. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.
6. Claims: 25, 26, 72, 114, 130 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:33. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.
7. Claims: 27, 73, 115, 131 all totally; 16, 67, 83-92, 109,

International Application No. PCT/US 01/31931

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:34. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.

8. Claims: 28, 29, 74, 116, 132 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:35. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.

9. Claims: 30, 31, 75, 117, 133 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:36. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.

10. Claims: 32, 33, 76, 118, 135 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:37. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.

11. Claims: 34, 35, 77, 119, 136 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:38. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.

12. Claims: 36, 37, 78, 120, 137 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:39. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.

13. Claims: 38, 39, 79, 121, 138 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

International Application No. PCT/US 01/31931

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:40. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.

14. Claims: 40, 41, 80, 122, 139 all totally; 16, 67, 81-92, 109, 123, 125, 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand for an individual class I molecule comprising SEQ ID NO:41. Corresponding source protein. Related method and kit for detecting a disease state.

15. Claims: 93-104, 124, 140 all totally; 150, 151, 154 all partially

A peptide ligand endogenously loaded in an individual class I molecule and presented by the individual class I molecule on an uninfected cell. Corresponding self protein. Related method and kit for detecting a disease state.

16. Claims: 146 148, 149, 156, 157, 163, 164 all totally

Methods of isolating/identifying ligands/self protein/motif for ligands. Method of targeting a compound to a cell.

17. Claims: 147, 152, 153, 155 all totally

A ligand as disclosed in claims 147, 152, 153, 155

18. Claims: 159-162 all totally

Methods for detecting a disease state.

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|----------------|------------|
| C 1 2 Q 1/68 | C 1 2 Q 1/68 | A |
| G 0 1 N 33/15 | G 0 1 N 33/15 | Z |
| G 0 1 N 33/50 | G 0 1 N 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/53 | G 0 1 N 33/53 | D |
| G 0 1 N 33/566 | G 0 1 N 33/53 | M |
| | G 0 1 N 33/566 | |

- (31)優先権主張番号 60/299,452
 (32)優先日 平成13年6月20日(2001.6.20)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 09/974,366
 (32)優先日 平成13年10月10日(2001.10.10)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(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,PH,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ヘザー、ヒックマン
 アメリカ合衆国オクラホマ州、オクラホマ、シティー、エヌダブリュ、フォーティーナインス、ストリート、700

(72)発明者 ウィリアム、ヒルデブランド
 アメリカ合衆国オクラホマ州、エドモンド、ノースクリーク、ドライブ、900

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB20 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36
 FB02
 4B024 AA01 AA11 BA35 BA80 CA04 DA02 EA04 GA11 GA18 HA03
 HA12
 4B063 QA18 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
 4B064 AG01 AG32 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4H045 AA10 AA20 AA30 CA05 CA40 DA86 EA31 EA50 FA74

| | | | |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 来自MHC阳性细胞的比较配体作图 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004536554A | 公开(公告)日 | 2004-12-09 |
| 申请号 | JP2002534349 | 申请日 | 2001-10-10 |
| 申请(专利权)人(译) | 俄克拉何马州的盐湖城大学校董会 | | |
| [标]发明人 | ヘザーヒックマン ウィリアムヒルデブランド | | |
| 发明人 | ヘザー、ヒックマン ウィリアム、ヒルデブランド | | |
| IPC分类号 | A61K39/39 C07K14/08 C07K14/16 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/74 C07K14/78 C12N9/12 C12N9/64 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6878 A61K39/39 A61K2039/605 A61K2039/622 C07K14/005 C07K14/47 C07K14/4702 C07K14/4728 C07K14/70539 C07K14/70571 C07K14/78 C07K16/2833 C07K2319/00 C12N9/1247 C12N9/6421 C12N2740/16122 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/5044 G01N33/5091 G01N33/569 G01N33/6824 G01N33/6848 G01N2333/16 G01N2333/70539 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C07K14/08 C07K14/47 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA35 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG32 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA05 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 耀希达凯贤治 中村KoTakashi | | |
| 优先权 | 60/240143 2000-10-10 US 60/256409 2000-12-18 US 60/256410 2000-12-18 US 60/299452 2001-06-20 US 09/974366 2001-10-10 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明一般涉及分离，纯化和鉴定由MHC阳性细胞呈递的肽配体的方法。特别地，本发明的方法涉及从可溶性I类和II类MHC分子（其可能是未感染的，感染性的或致瘤性的）分离，纯化和鉴定这些肽配体。本发明的方法中，在广义上可被识别并用作这些肽配体的标记物和它们的伴随感染与未感染的细胞的来源的蛋白质，和/或肿瘤发生与非致瘤细胞，在鉴定对于用于治疗目的的标记或靶向细胞或针对感染细胞的免疫应答是有用的它对于启动很有用。

| | | |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------|
| (6) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 2 G O 4 5 |
| C 0 7 K 14/08 | C O 7 K 14/08 | 4 B O 2 4 |
| C 0 7 K 14/47 | C O 7 K 14/47 | 4 B O 6 3 |
| C 1 2 P 21/02 | C 1 2 P 21/02 C | 4 B O 6 4 |
| C 1 2 Q 1/02 | C 1 2 Q 1/02 | 4 H O 4 5 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 212 頁) 最終頁に於 | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-534349 (P2002-534349) | (71) 出願人 | 500201831 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年10月10日 (2001.10.10) | | ザ ホード オブ リージェンツ オフ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年4月10日 (2003.4.10) | | ザ ユニヴァーシティー オブ オクラ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/031931 | | マ |
| (87) 国際公開番号 | W02002/030964 | | アメリカ合衆国オクラホマ州、ノーマン |
| (87) 国際公開日 | 平成14年4月18日 (2002.4.18) | | バーリントン、オバール、660 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/240,143 | (74) 代理人 | 100075812 |
| (32) 優先日 | 平成12年10月10日 (2000.10.10) | | 弁理士 吉武 賢次 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100091487 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/256,409 | | 弁理士 中村 行孝 |
| (32) 優先日 | 平成12年12月18日 (2000.12.18) | (74) 代理人 | 100094640 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 紺野 昭男 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/256,410 | (74) 代理人 | 100107342 |
| (32) 優先日 | 平成12年12月18日 (2000.12.18) | | 弁理士 横田 修孝 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |