(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2020-511121
(P2020-511121A)
(43)公表日　令和2年4月16日(2020.4.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z	2G041
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	ZNA	2G045
C12Q 1/68	(2018.01)	C12Q	1/68		4B063
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		4B065
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	H	4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 158 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-543304 (P2019-543304)
(86)(22)出願日　平成30年2月12日 (2018.2.12)
(85)翻訳文提出日　令和1年10月7日 (2019.10.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/017849
(87)国際公開番号　WO2018/148671
(87)国際公開日　平成30年8月16日 (2018.8.16)
(31)優先権主張番号　62/457,978
(32)優先日　平成29年2月12日 (2017.2.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/461,162
(32)優先日　平成29年2月20日 (2017.2.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　518344612
ネオン　セラピューティクス，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　エリー　ストリート　４０，　スイート　１１０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＨＬＡに基づく方法および組成物ならびにそれらの使用

(57)【要約】
本開示は、細胞からＨＬＡ－ペプチドを単離するための組成物および方法を提供する。本開示は、任意の可能なクラスＩまたはＩＩ構築物を発現する細胞株からの内在的に提示されたＨＬＡ－ペプチドの識別を可能にする、ＨＬＡ－ペプチドームをプロファイリングするためのユニバーサルプラットフォームおよび方法を提供する。本明細書に記載の方法および組成物は、様々な用途において使用を見出す。例えば、本明細書に記載の方法および組成物は、免疫原性抗原ペプチドを識別するために使用され、個別化医療薬物などの薬物を開発するために使用することができる。

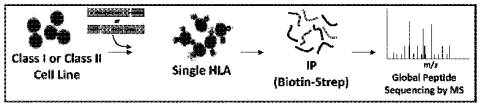

FIG. 1A

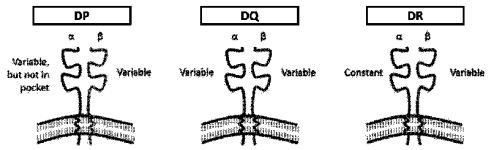

FIG. 1B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）対象によって発現されるＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる配列を含み、
（ｉ）対象によって発現される前記ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列、それに連結された、
（ｉｉ）親和性アクセプターペプチドをコードする配列
を含む組換えポリ核酸によってコードされる、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡタンパク質を細胞中で発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；
（ｂ）前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドまたは複合体を識別するステップ；および
（ｃ）（ｉ）識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドもしくは複合体の１つもしくは複数の配列に基づいて治療薬を開発するステップ、または（ｉｉ）識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドもしくは複合体の１つもしくは複数の配列を含むＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップ
を含む方法。
【請求項２】
識別された前記ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドまたは複合体の１つまたは複数の配列に基づいて治療薬を開発するステップを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記治療薬が対象に特異的である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記治療薬が疾患に特異的である、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
前記治療薬が、
（ａ）前記１つまたは複数の配列を含む１つまたは複数のペプチド、
（ｂ）前記１つまたは複数のペプチドをコードするポリヌクレオチド、
（ｃ）前記１つまたは複数のペプチドを含む１つまたは複数のＡＰＣ、
（ｄ）前記１つまたは複数のペプチドとの複合体におけるＨＬＡに特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）、
（ｅ）前記１つまたは複数のペプチドとの複合体におけるＨＬＡに特異的なＴＣＲまたはキメラＴ細胞受容体（ＣＡＲ）を含む細胞
を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項６】
前記治療薬を、疾患を有する対象に投与するステップをさらに含む、請求項２に記載の方法。
【請求項７】
前記治療薬の前記１つまたは複数のペプチドの少なくとも１つが、識別された対応するＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドと同じ長さであるか、またはそれより長い、請求項５に記載の方法。
【請求項８】
アジュバントを前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項６に記載の方法。
【請求項９】
前記疾患が、がん、自己免疫疾患または感染性疾患である、請求項６に記載の方法。
【請求項１０】
識別された前記ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドまたは複合体の１つまたは複数の配列に基づいて、前記ＨＬＡ対立遺伝子を発現する対象に特異的な治療薬を製剤化するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のペプチドが、前記細胞によ

って内在的にプロセシングされ、提示される、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のペプチドが、内在性ペプチドである、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記組換えポリ核酸が、第１の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする第１の配列および第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする第２の配列を含み、前記第１の配列が、
（ａ）第１のＨＬＡをコードする第１のＨＬＡ対立遺伝子の配列、それに連結された、
（ｂ）第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列
を含み；前記第２の配列が、
（ｃ）第２のＨＬＡをコードする第２のＨＬＡ対立遺伝子の配列、それに連結された、
（ｄ）第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列
を含み；前記第１のＨＬＡ対立遺伝子および前記第２のＨＬＡ対立遺伝子が異なるＨＬＡである、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
識別するステップが、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドの配列を識別することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
識別するステップが、対象によって発現される前記ＨＬＡ対立遺伝子に結合するＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドを識別することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
識別するステップが、前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドまたは複合体の供給源タンパク質の発現レベルを決定することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
前記発現レベルが、前記供給源タンパク質の量または前記供給源タンパク質をコードするＲＮＡの量を測定することによって決定される、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
識別するステップが、前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドまたは複合体を特徴付けることを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
識別するステップが、生化学分析、質量分析、ＭＳ分析、ＭＳ／ＭＳ分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析、またはその組合せを実施することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
識別するステップが、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドの配列の結合親和性または安定性を評価することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
識別するステップが、前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドの配列が変異を含有するかどうかを決定することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２２】
識別するステップが、前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体中のペプチドとＨＬＡ分子との会合を評価することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２３】
識別するステップが、質量分析を実施することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
識別するステップが、タンデム質量分析を実施することを含む、請求項２３に記載の方

法。
【請求項２５】
識別するステップが、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルを、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から単離されたペプチドの複数のＭＳ／ＭＳスペクトルを含むペプチドデータベースと比較することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
識別するステップが、対象に由来するＴ細胞を活性化することができるＨＬＡ－対立遺伝子特異的複合体を識別することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
前記細胞が、前記細胞によって通常発現されるＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる内在性ＨＬＡタンパク質を発現する、請求項１に記載の方法。
【請求項２８】
前記細胞が、初代細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項２９】
前記細胞が、疾患を有する対象に由来する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記細胞が、細胞株である、請求項１に記載の方法。
【請求項３１】
前記細胞が、１つもしくは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子または１つもしくは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記細胞が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）である、請求項１に記載の方法。
【請求項３３】
前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体が排出されない、請求項１に記載の方法。
【請求項３４】
前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体が、発現された場合に細胞膜に組み込まれる、請求項１に記載の方法。
【請求項３５】
前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体が、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体である、請求項１に記載の方法。
【請求項３６】
前記親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体からペプチドを単離するステップを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３７】
親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体または親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現する細胞を単離するステップを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３８】
親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３９】
富化するステップが、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降することを含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
富化するステップが、親和性アクセプターペプチド特異的結合分子を前記細胞に接触させることを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４１】

前記親和性アクセプターペプチドが（ビオチンアクセプタータンパク質）ＢＡＰである、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記親和性アクセプターペプチド特異的結合分子が、ビオチンまたは前記親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
富化するステップが、前記親和性アクセプターペプチド特異的結合分子に特異的な親和性分子を接触させることを含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記親和性分子が、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
富化するステップが、前記細胞から、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４６】
富化するステップの前に前記細胞を溶解するステップを含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４７】
前記細胞中でペプチドライブラリーを発現させるステップを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４８】
前記ペプチドライブラリーが、疾患と関連するペプチドのライブラリーを含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
疾患細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体を、非疾患細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体と比較するステップを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５０】
識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドまたは複合体の１つまたは複数の配列を含むＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５１】
前記ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを用いてマシンを訓練するステップをさらに含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための予測アルゴリズムを生成するステップをさらに含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
前記マシンが、１つまたは複数の線形モデル、サポートベクターマシン、決定木およびニューラルネットワークを組み合わせる、請求項５１に記載の方法。
【請求項５４】
前記マシンを訓練するために使用される変数が、ペプチド配列、アミノ酸の物理特性、ペプチドの物理特性、細胞内のペプチドの前記供給源タンパク質の発現レベル、タンパク質安定性、タンパク質翻訳率、ユビキチン化部位、タンパク質分解率、リボソームプロファイリングからの翻訳効率、タンパク質切断性、タンパク質局在化、ＴＡＰ輸送を容易にする宿主タンパク質のモチーフ、自食作用を受ける宿主タンパク質、リボソーム失速を好むモチーフ、およびナンセンス変異依存性分解（ＮＭＤ）を好むタンパク質特性からなる群から選択される１つまたは複数の変数を含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
リボソーム失速を好む前記モチーフが、ポリプロリンまたはポリリシン伸長物を含む、請求項５４に記載の方法。

【請求項５６】
ＮＭＤを好む前記タンパク質特性が、長い３’ＵＴＲ、最後のエクソン：エクソン接合部の核酸５０個を超えて上流にある停止コドン、およびペプチド切断性からなる群から選択される、請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための方法であって、請求項５０に記載の方法に従って生成されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを用いて訓練されたマシンを用いて、ペプチドの配列を分析するステップを含む方法。
【請求項５８】
薬学的に許容される担体、および請求項１に記載の方法に従って識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドの１つまたは複数の配列を含む１つまたは複数のペプチドを含む医薬組成物。
【請求項５９】
薬学的に許容される担体、および請求項１に記載の方法に従って識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドの１つまたは複数の配列を含む１つまたは複数のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物。
【請求項６０】
薬学的に許容される担体、および請求項１に記載の方法に従って識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドの１つまたは複数の配列を含む１つまたは複数のペプチドを含む１つまたは複数の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む医薬組成物。
【請求項６１】
薬学的に許容される担体、および（ｉ）請求項１に記載の方法に従って識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドの１つもしくは複数の配列を含む１つもしくは複数のペプチドを含むＨＬＡ－ペプチド複合体または（ｉｉ）請求項１に記載の方法に従って識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的複合体に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む医薬組成物。
【請求項６２】
薬学的に許容される担体、および（ｉ）請求項１に記載の方法に従って識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドの１つもしくは複数の配列を含む１つもしくは複数のペプチドを含むＨＬＡ－ペプチド複合体または（ｉｉ）請求項１に記載の方法に従って識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的複合体に特異的なＴＣＲを含む細胞を含む医薬組成物。
【請求項６３】
請求項１に記載の方法に従って識別されたＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドまたは複合体のペプチド配列情報を含むＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベース。
【請求項６４】
第１の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする第１の配列、および第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする第２の配列を含む組換えポリ核酸を含む組成物であって、前記第１の配列が、
（ａ）第１のＨＬＡをコードする第１のＨＬＡ対立遺伝子の配列、それに連結された、
（ｂ）第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列
を含み；前記第２の配列が、
（ｃ）第２のＨＬＡをコードする第２のＨＬＡ対立遺伝子の配列、それに連結された、
（ｄ）第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列
を含み；前記第１のＨＬＡ対立遺伝子および前記第２のＨＬＡ対立遺伝子が異なるＨＬＡ対立遺伝子である、組成物。
【請求項６５】
前記親和性アクセプターペプチドが（ビオチンアクセプターペプチド）ＢＡＰである、請求項６４に記載の組成物。
【請求項６６】

前記第１の親和性アクセプターペプチドが、前記第２の親和性アクセプターペプチドと同じである、請求項６４に記載の組成物。
【請求項６７】
前記第１の親和性アクセプターペプチドが前記第１のＨＬＡにとってユニークであり、前記第２の親和性アクセプターペプチドが前記第２のＨＬＡにとってユニークである、請求項６４に記載の組成物。
【請求項６８】
前記第１の配列および前記第２の配列が、異なる組換えポリ核酸分子上に含まれる、請求項６４に記載の組成物。
【請求項６９】
前記第１の配列および前記第２の配列が、同じポリ核酸分子上に含まれる、請求項６４に記載の組成物。
【請求項７０】
前記第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列が、前記第１の配列の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される、請求項６４に記載の組成物。
【請求項７１】
前記第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列が、前記第１の配列の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される、請求項６４に記載の組成物。
【請求項７２】
前記第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列が、前記第１の配列のＮ末端に作動可能に連結される、請求項６４に記載の組成物。
【請求項７３】
前記第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列が、前記第１の配列のＣ末端に作動可能に連結される、請求項６４に記載の組成物。
【請求項７４】
前記第１の配列が第１のユニークなバーコード配列をコードし、前記第２の配列が第２のユニークなバーコード配列をコードする、請求項６４に記載の組成物。
【請求項７５】
前記第１の配列が第１のユニークなバーコード配列を含み、前記第２の配列が第２のユニークなバーコード配列を含む、請求項６４に記載の組成物。
【請求項７６】
請求項６４に記載の組成物を含む細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、2017年2月12日に出願された米国仮出願第６２／４５７，９７８号および2017年2月20日に出願された米国仮出願第６２／４６１，１６２号およびに対する優先権を主張し、そのそれぞれは、本明細書にその全体が参照により援用される。
【背景技術】
【０００２】
主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）は、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）遺伝子をコードする遺伝子複合体である。ＨＬＡ遺伝子は、循環Ｔ細胞に対してヒト細胞の表面上に展示されるタンパク質ヘテロ二量体として発現される。ＨＬＡ遺伝子は、高度に多型性であり、適応免疫系の微調整を可能にする。適応免疫応答は、部分的には、Ｔ細胞が、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）ヘテロ二量体に結合した疾患関連ペプチド抗原を展示する細胞を識別し、除去する能力に依拠する。
【０００３】
ヒトにおいては、内在性および外因性タンパク質は、プロテアソームによって、ならびに細胞質性およびエンドソーム／リソソーム性プロテアーゼおよびペプチダーゼによって

、ペプチドにプロセシングされ、ＭＨＣによってコードされる２つのクラスの細胞表面タンパク質によって提示され得る。これらの細胞表面タンパク質は、ヒト白血球抗原（ＨＬＡクラスＩおよびクラスＩＩ）と呼ばれ、それらに結合し、免疫応答を惹起するペプチド群は、ＨＬＡエピトープと呼ばれる。ＨＬＡエピトープは、免疫系に、病原体感染および自己の形質転換などの、危険シグナルを検出させる重要な成分である。循環ＣＤ８＋Ｔ細胞は、内在性プロセシング経路に由来し、ほぼ全ての有核細胞上に展示されるクラスＩ　ＭＨＣ（ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃ）エピトープを認識する。ＣＤ４＋Ｔ細胞は、樹状細胞およびマクロファージなどの、抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に展示されるクラスＩＩ　ＭＨＣ（ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰ）エピトープを認識する。ＨＬＡクラスＩＩペプチド提示は、ヘルパーＴ細胞を活性化し、続いて、Ｂ細胞分化および抗体産生ならびにＣＴＬ応答を促進する。活性化されたヘルパーＴ細胞はまた、他のＴ細胞を活性化し、その分化を誘導するサイトカインおよびケモカインを分泌する。

【０００４】

ＨＬＡヘテロ二量体をコードする遺伝子は、高度に多型性であり、ヒト集団にわたって１２，０００個を超えるクラスＩおよび４，０００個を超えるクラスＩＩ対立遺伝子バリアントが識別されている。母系および父系ＨＬＡハプロタイプから、個体はクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ遺伝子座のそれぞれについて異なる対立遺伝子を継承することができる。クラスＩ　ＨＬＡ分子は、クラスＩ　ＨＬＡ遺伝子によってコードされるα重鎖と、β－２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）とから構成されるヘテロ二量体である。クラスＩＩ　ＨＬＡ分子は、両方ともクラスＩＩ　ＨＬＡ遺伝子によってコードされる、αおよびβ鎖のヘテロ二量体である。α鎖とβ鎖との対形成の組合せのため、ＨＬＡヘテロ二量体の集団は、高度に複雑である。さらに、それぞれのＨＬＡヘテロ二量体は、対立遺伝子特異的結合選択性で数千のペプチドに結合すると見積もられている。事実、それぞれのＨＬＡ対立遺伝子は、ヒトタンパク質をコードする遺伝子に由来する約１０００万個の潜在的な９マーのペプチドの０．１％以下である、約１，０００～１０，０００個のユニークなペプチドに結合し、これをＴ細胞に提示すると見積もられている。ＨＬＡ結合におけるそのような多様性を考慮すると、あるペプチドが特定のＨＬＡ対立遺伝子に結合するかどうかの正確な予測は、非常に困難である。α鎖とβ鎖の対形成の不均一性、コア結合エピトープを明確に割り当てる能力を制限するデータの複雑性、および高分解能生化学分析に必要とされる、免疫沈降グレードの対立遺伝子特異的抗体の欠如のため、ＨＬＡクラスＩＩ分子の対立遺伝子特異的ペプチド結合特徴に関してはあまり知られていない。さらに、所与のＨＬＡ対立遺伝子に由来するペプチドエピトープの分析は、複数のＨＬＡ対立遺伝子が細胞表面上に提示される場合、曖昧さを生じる。

【０００５】

ＨＬＡヘテロ二量体毎の結合選択性を理解することは、どのネオ抗原が腫瘍特異的Ｔ細胞応答を惹起する可能性があるかを上手く予測するための鍵である。明らかに、特定のクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ関連ペプチド（例えば、ネオ抗原ペプチド）を識別および単離する方法が必要である。そのような方法および単離された分子は、例えば、ＨＬＡ関連ペプチドの研究、ならびに限定されるものではないが、免疫に基づく治療薬などの、治療薬の開発にとって有用である。

【０００６】

参照による組込み

本明細書において述べるすべての刊行物、特許、および特許出願は、個々の刊行物、特許、または特許出願それぞれが具体的におよび個別に参照により組み込まれると示されたのと同様に参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本明細書に記載の方法および組成物は、様々な用途において使用を見出す。例えば、本

明細書に記載の方法および組成物は、免疫原性抗原ペプチドを識別するために使用され、個別化医療薬物などの薬物を開発するために使用することができる。

【０００８】

ＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付ける方法であって、細胞集団を用意するステップであって、細胞集団の１つまたは複数の細胞が親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含むポリ核酸を含み、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む、ステップ；細胞集団の１つまたは複数の細胞の少なくとも１個の細胞において親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現させ、これにより少なくとも１個の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；およびＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付けるステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。

【０００９】

一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドを特徴付けることを含む。一部の実施形態では、方法は、２つまたはそれより多いクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のための方法のステップを実行することを含む。一部の実施形態では、２つまたはそれより多いクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０個のクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、分泌されない。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、発現された場合、細胞膜に組み込まれる。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体である。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体ではない。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップをさらに含む。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、単一の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。

【００１０】

一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプターペプチドに作動可能に連結された異なるＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる異なる組換えポリペプチドを含む親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを含む１つまたは複数の細胞をそれぞれ含む細胞集団を用意するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；および富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部を特徴付けるステップを含む。

【００１１】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数のペプチドを、細胞集団に導入するステップを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つもしくは複数のペプチドと接触させること、または細胞集団中で１つもしくは複数のペプチドを発現させることを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＤＮＡである。一

部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＲＮＡであり、必要に応じて、ＲＮＡはｍＲＮＡである。一部の実施形態では、富化するステップは、四量体試薬の使用を含まない。

【００１２】

一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の配列を決定すること、必要に応じて、ペプチドまたはその一部が改変されるかどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析、質量分析、ＭＳ分析、ＭＳ／ＭＳ分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の結合親和性または安定性を評価することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部が１つまたは複数の変異を含有するかどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体中でのペプチドとＨＬＡ分子との会合を評価することを含む。

【００１３】

一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団にペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、バイオ医薬品（例えば、抗体薬）などのポリペプチド薬に由来するペプチドのライブラリーを含む。

【００１４】

一部の実施形態では、疾患または状態は、がん、感染性因子による感染、または自己免疫反応である。一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、バイオ医薬品（例えば、抗体薬）などのポリペプチド薬またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－ペプチド複合体に由来する１つまたは複数のペプチドを特徴付けるステップを含み、必要に応じて、ペプチドは、感染性因子またはポリペプチド薬の１つまたは複数の標的タンパク質に由来する。一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはポリペプチド薬の１つまたは複数の標的タンパク質に由来するペプチドの１つまたは複数の領域を特徴付けるステップを含む。

【００１５】

一部の実施形態では、方法は、感染性因子に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップを含む。一部の実施形態では、細胞集団は、疾患または状態を有する対象に由来する生体試料に由来する。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、初代細胞の集団である。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を、疾患または状態を有する対象に一致させる。

【００１６】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドは、抗原提示細胞によって提示された場合、対象に由来するＴ細胞を活性化することができる。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、がん細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体を、非がん細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体と比較することを含む。一部の実施形態では、細胞集団は、それぞれの細胞集団が、異なる組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を発現する、複数の細胞集団を含む。一部の実施形態

では、複数のうちのそれぞれの細胞集団は、同じか、または別々の容器中にある。
【００１７】
一部の実施形態では、方法は、特徴付けるステップの前に、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ＨＬＡ－ペプチド複合体は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まないＨＬＡ－ペプチド複合体は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、細胞培養の培地から単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。例えば、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）などのＨＬＡを、抗ＨＬＡ抗体を含有するビーズまたはカラムを使用して単離することができる。一部の実施形態では、ペプチドは、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、抗ＨＬＡ抗体を含有するカラムを使用して単離される。一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドの末端から１つまたは複数のアミノ酸を除去するステップをさらに含む。
【００１８】
一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトおよび全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡクラスＩＩα鎖、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、それぞれの配列は、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする。
【００１９】
一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、異なる親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、親和性アクセプターペプチドをコードす

る配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の１つまたは複数は、第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結され、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の１つまたは複数は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、異なる親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のそれぞれは、異なる親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、親和性タグをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、方法は、同じか、または異なる親和性アクセプターペプチドに作動可能に連結された異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む少なくとも第２のポリ核酸を投与するステップを含む。

【００２０】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞外で発現される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部位上に位置する。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞内で発現される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、可撓性ループ配列などの、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列の内部配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に細胞を溶解するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップをさらに含む。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチド結合分子を親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、親和性アクセプターペプチド結合分子は、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する。

【００２１】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セ

ルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、ソルターゼタグ、ビーズに対して共有ペプチド結合を形成するタグ、またはその組合せを含むタグ配列を含み、必要に応じて、親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【００２２】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性分子を親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、親和性分子は、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。

【００２３】

一部の実施形態では、親和性分子は、ビオチンに結合する分子を含む。例えば、親和性分子は、他の生物に由来するタンパク質ホモログおよびその誘導体を含む、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎを含んでもよい。

【００２４】

一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、親和性分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、固相表面は、ビーズである。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を用いて、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。

【００２５】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、コードされる組換えクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、富化するステップは、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。一部の実施形態では、富化するステップは、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。

【００２６】

一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、トランスフェクトまたは形質導入することを含む。一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸を含むベクターと接触させることを含む。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ポリ核酸は、細胞集団のゲノム中に安定に組み込まれる。

【００２７】

一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でβ２ミクログロブリンをコードする配列を発現させるステップをさらに含

む。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。

【００２８】

一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、第１の親和性アクセプターペプチドと異なり、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せからなる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【００２９】

一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【００３０】

一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析またはタンデム質量分析などの質量分析を実施することを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、ペプチドデ

ータベースに由来する富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された１つまたは複数のペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに対応するペプチド配列を取得することを含み、得られた１つまたは複数の配列は、１つまたは複数のペプチドの配列を識別する。一部の実施形態では、ペプチドデータベースは、改変データベースを含まない、または改変データベースを含むものなどの、非酵素特異性ペプチドデータベースである。一部の実施形態では、方法は、逆データベース検索戦略を使用してペプチドデータベースを検索するステップをさらに含む。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、ヒト細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、マウス細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、ＣＨＯ細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｅｘｐｉ２９３、ＨｅＬａ、Ａ３７５、７２１．２２１、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、Ｊｕｒｋａｔ、ＨｅｐＧ２、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＣＡＣＯ－２、Ｕ９３７、Ｕ－２　ＯＳ、ＥｘｐｉＣＨＯ、ＣＨＯおよびＴＨＰ１から選択される細胞株である。

【００３１】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のサイトカイン、チェックポイント阻害剤、エピジェネティック的に活性な薬物、ＩＦＮ－γ、抗原プロセシングを変更する薬剤（ペプチダーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、およびＴＡＰ阻害剤など）、またはその組合せを用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞の代謝経路または代謝状態をモジュレートする１つまたは複数の試薬を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞の細胞プロテオームをモジュレートする１つまたは複数の試薬を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞の細胞発現または転写をモジュレートまたは調節する１つまたは複数の試薬（例えば、ＡＩＲＥもしくはＣＲＥＢ結合タンパク質またはそのモジュレーター）を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞の転写因子をモジュレートまたは調節する１つまたは複数の試薬を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞のＨＬＡの細胞発現または転写をモジュレートまたは調節する１つまたは複数の試薬を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞のプロテオームの細胞発現または転写をモジュレートまたは調節する１つまたは複数の試薬を用いて処理される。

【００３２】

一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^5個の細胞、少なくとも10^6個の細胞または少なくとも10^7個の細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、樹状細胞、マクロファージ、がん細胞またはＢ細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、腫瘍細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団を、１つまたは複数の細胞から前記ＨＬＡ－ペプチド複合体を単離する前に、薬剤と接触させる。一部の実施形態では、前記薬剤は、炎症性サイトカイン、化学薬剤、アジュバント、治療剤または放射線である。

【００３３】

一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、変異したＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、バーコード配列を含む。一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の発現についてアッセイするステップをさらに含む。一部の実施形態では、アッセイするステップは、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を配列決定すること、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子ＲＮＡを検出すること、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子タンパク質を検出すること、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、発現についてアッセイするステップは、ウェスタンブロットアッセイ、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）、質量分析（ＭＳ）、マイクロアレイハイブリダイゼーションアッセイ、ＲＮＡ－ｓｅｑアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応アッセイ、ＬＡＭＰアッセイ、リガーゼ連鎖反応アッセイ、サザンブロットアッセイ、ノーザンブロットアッセイ、または酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を含んでもよい。

【００３４】

一部の実施形態では、方法は、異なるＨＬＡ対立遺伝子のための方法のステップを実行することを含む。一部の実施形態では、それぞれ異なるＨＬＡ対立遺伝子は、ユニークなバーコード配列を含む。一部の実施形態では、異なるＨＬＡ対立遺伝子をコードするそれぞれのポリ核酸は、ユニークなバーコード配列を含む。

【００３５】

本明細書に記載の方法を実行することによって得られるＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベースが、本明細書で提供される。毎回、異なるＨＬＡ－対立遺伝子を使用して、本明細書に記載の方法を反復的に実行することによって得られる２つまたはそれより多いＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベースの組合せが、本明細書で提供される。本明細書に記載のペプチド配列データベースまたは本明細書に記載の組合せを用いてマシンを訓練するステップを含む、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための予測アルゴリズムを生成するための方法が、本明細書で提供される。

【００３６】

一部の実施形態では、マシンは、１つまたは複数の線形モデル、サポートベクターマシン、決定木およびニューラルネットワークを組み合わせる。一部の実施形態では、マシンを訓練するために使用される変数は、ペプチド配列、アミノ酸の物理特性、ペプチドの物理特性、細胞内のペプチドの供給源タンパク質の発現レベル、タンパク質安定性、タンパク質翻訳率、ユビキチン化部位、タンパク質分解率、リボソームプロファイリングからの翻訳効率、タンパク質切断性、タンパク質局在化、ＴＡＰ輸送を容易にする宿主タンパク質のモチーフ、自食作用を受ける宿主タンパク質、リボソーム失速を好むモチーフ、およびＮＭＤを好むタンパク質特性からなる群から選択される１つまたは複数の変数を含む。

【００３７】

一部の実施形態では、リボソーム失速を好むモチーフは、ポリプロリンまたはポリリシン伸長物を含む。一部の実施形態では、ＮＭＤを好むタンパク質特性は、長い３’ＵＴＲ、最後のエクソン：エクソン接合部の核酸５０個を超えて上流にある停止コドン、およびペプチド切断性からなる群から選択される。

【００３８】

ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための方法であって、ＨＬＡ－対立遺伝子に関して本明細書に記載の方法を実行することによって得られるペプチド配列データベースを用いて訓練されたマシンを用いて、ペプチドの配列を分析するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、細胞内のペプチドの供給源タンパク質の発現レベルを決定するステップを含み、ここで、供給源タンパク質発現は、マシンによって使用される予測変数である。一部の実施形態では、発現レベルは、供給源タンパク質の量または前記供給源タンパク質をコードするＲＮＡの量を測定することによって決定される。

【００３９】

親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをそれぞれコードする２つまたはそれより多い配列を含む組換えポリ核酸を含む組成物であって、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、異なる組換えＨＬＡクラスＩα鎖対立遺伝子をコードする配列、親和性アクセプターペプチドをコードする配列、および必要に応じて、β２ミクログロブリンをコードする配列を含み、（ａ）および（ｂ）、ならびに必要に応じて（ｃ）の配列が、作動可能に連結される、組成物が本明細書で提供される。

【００４０】

親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列をそれぞれ含む２つまたはそれより多い配列を含む組換えポリ核酸を含む組成物であって、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、組換えＨＬＡクラスＩＩα鎖対立遺伝子をコードする配列、親和性アクセプターペプチドをコードする配列、および必要に応じて、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含み、（ａ）および（ｂ）、ならびに必要に応じて（ｃ）の配列が、作動可能に連結される、組成物が本明細書で提供される。一部の実施形態では、組換えポリ核酸は、単離される。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬ

Ａ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。

【００４１】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプター分子をコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。

【００４２】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、同じポリヌクレオチドから発現される。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、異なるポリヌクレオチドから発現される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、２つまたはそれより多い親和性アクセプターペプチドを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする３つまたはそれより多い配列を含み、ここで、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする３つまたはそれより多い配列のうちの少なくとも２つは、同じ親和性アクセプターペプチドを含む。一部の実施形態では、２つまたはそれより多い親和性アクセプターペプチドは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列のそれぞれについてユニークである。

【００４３】

一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ

、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せからなる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【００４４】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、親和性分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、組換えクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、組換えポリ核酸の２つまたはそれより多くについて、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列は、細胞のゲノム中に安定に組み込まれる。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、ＨＡタグを含む。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによって組換えＨＬＡおよび親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。

【００４５】

一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【００４６】

本明細書に記載の組成物のポリ核酸によってコードされる２つまたはそれより多い単離されたポリペプチド分子を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物のポリ核酸によってコードされる２つまたはそれより多いポリペプチド分子を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物を含む１つまたは複数の細胞を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。

【００４７】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性クラスＩまたはクラスＩＩＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。一部の実施形態では、組成物は、患者のＨＬＡ型に特異的なペプチドまたはペプチドをコードするポリ核酸を使用して製剤化される。細胞を作製する方法であって、２つまたはそれより多い細胞に、本明細書に記載の組成物の２つまたはそれより多いポリ核酸を形質導入するか、またはトランスフェクトするステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【００４８】

本明細書に記載の方法に従って識別されるペプチドが、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、細胞は、ＨＬＡ－ペプチド複合体としてペプチドを提示する。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【００４９】

一部の実施形態では、免疫応答は、Ｔ細胞免疫応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、ＣＤ８　Ｔ細胞応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、ＣＤ４　Ｔ細胞応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、液性免疫応答である。

【００５０】

疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、疾患は、がんである。一部の実施形態では、疾患は、感染性因子による感染である。一部の実施形態では、感染性因子は、病原体、必要に応じて、ウイルスまたは細菌、または寄生虫である。

【００５１】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＢＫウイルス（ＢＫＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３、ＤＥＮＶ－４、ＤＥＮＶ－５）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトＴ細胞リンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ－１）、インフルエンザウイルス、ＲＳＶ、ＨＰＶ、狂犬病、流行性耳下腺炎、風疹ウイルス、ポリオウイルス、黄熱、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ロタウイルス、水痘ウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、天然痘、帯状疱疹、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【００５２】

一部の実施形態では、細菌は、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｓｐｐ．、Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ　ｗｈｉｐｐｌｅｉ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｅｐｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔ

ｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、腸チフス、肺炎球菌、髄膜炎菌、ヘモフィルスＢ、炭疽菌、破傷風トキソイド、Ｂ群髄膜炎菌、ｂｃｇ、コレラ、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【００５３】

一部の実施形態では、寄生虫は、寄生蠕虫または原生動物である。一部の実施形態では、寄生虫は、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐｐ．、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｓｐｐ．、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ、Ａｓｃａｒｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ、Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ ｔｒｉｃｈｉｕｒａ、Ｎｅｃａｔｏｒ ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｓｐｐ．、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【００５４】

免疫原性ペプチドを富化する方法であって、組換えＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる組換えＨＬＡに作動可能に連結された親和性アクセプターペプチドを含む親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現する１つまたは複数の細胞を含む細胞集団を用意するステップ；および親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを含むＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された免疫原性ペプチドの配列を決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、決定するステップは、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用することを含む。

【００５５】

対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を含む細胞を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。

【００５６】

疾患または状態を有する対象のための治療薬を開発する方法であって、疾患または状態を有する対象に由来する細胞集団を用意するステップ、親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む配列をコードするポリ核酸を、１つまたは複数の細胞中に導入することによって、細胞集団の１つまたは複数の細胞中で、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子を発現させ、これにより１つまたは複数の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化し、特徴付けるステップ；および必要に応じて、特徴付けに基づいて治療薬を開発するステップを含む方法が本明細書で提供される。

【００５７】

少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原を識別し、少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原を含む対象特異的免疫原性組成物を調製する方法であって、対象が疾患を有し、少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原が対象および対象の疾患に特異的であり、前記方法が、疾患または状態を有する対象に由来する細胞集団を用意するステップ；親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む配列をコードするポリ核酸を、１つまたは複数の細胞中に導入することによって、対象に由来する細胞集団の１つまたは複数の細胞中で、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子を発現させ、これにより１つまたは複数の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；１つまたは複数の細胞から親和性アクセプタータグ付

きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；対象および対象の疾患に特異的である富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から免疫原性ペプチドを識別するステップ；ならびに識別された対象特異的免疫原性ペプチドの１つまたは複数に基づいて対象特異的免疫原性組成物を製剤化するステップを含む、方法が、本明細書で提供される。

【００５８】

一部の実施形態では、治療薬または対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドまたは富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、治療薬または対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現するＴ細胞を含む。一部の実施形態では、対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドに特異的に結合する受容体を発現するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞を含む。

【００５９】

一部の実施形態では、方法は、別の治療剤、必要に応じて、免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、アジュバント、必要に応じて、ポリ－ＩＣＬＣを対象に投与するステップをさらに含む。

【００６０】

一部の実施形態では、疾患または障害は、がんである。一部の実施形態では、疾患または障害は、自己免疫疾患である。一部の実施形態では、疾患または障害は、感染である。一部の実施形態では、感染は、感染性因子による感染である。一部の実施形態では、感染性因子は、病原体、ウイルス、細菌、または寄生虫である。

【００６１】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＢＫウイルス（ＢＫＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３、ＤＥＮＶ－４、ＤＥＮＶ－５）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトＴ細胞リンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ－１）、インフルエンザウイルス、ＲＳＶ、ＨＰＶ、狂犬病、流行性耳下腺炎、風疹ウイルス、ポリオウイルス、黄熱、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ロタウイルス、水痘ウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、天然痘、帯状疱疹、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【００６２】

一部の実施形態では、細菌は、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ ｗｈｉｐｐｌｅｉ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、腸チフス、肺炎球菌、髄膜炎菌、ヘモフィルスＢ、炭疽菌、破傷風トキソイド、Ｂ群髄膜炎菌、ｂｃｇ、コレラ、およびその組合せからなる群から選択される。

【００６３】

一部の実施形態では、寄生虫は、寄生蠕虫または原生動物である。一部の実施形態では、寄生虫は、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐｐ．、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｓｐｐ．、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ、Ａｓｃａｒｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ、Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ ｔｒｉｃｈｉｕｒａ、Ｎｅｃａｔｏｒ ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｓｐｐ．、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【００６４】

疾患または状態を有する対象のための治療薬を開発する方法であって、細胞集団を用意するステップであって、細胞集団の１つまたは複数の細胞が少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む

ポリ核酸を含み、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列が第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された第１のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む第１の組換え配列、および第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む第２の組換え配列を含む、ステップ；少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを、細胞集団の１つまたは複数の細胞の少なくとも１つの細胞中で発現させ、これにより少なくとも１つの細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；および富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップ；ならびに識別されたペプチドの１つまたは複数に基づいて免疫原性組成物を製剤化するステップであって、第１および第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子が、対象のＨＬＡハプロタイプに一致する、ステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、対象は、疾患または状態を有する。

【００６５】

一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子と異なる。一部の実施形態では、第１の親和性アクセプターペプチドは、第２の親和性アクセプターペプチドと同じである。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドを特徴付けるステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０個のクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、排出されない。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、発現された場合、細胞膜に組み込まれる。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体ではない。

【００６６】

一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の外因性ペプチドを、細胞集団に導入するステップを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つもしくは複数の外因性ペプチドと接触させること、または細胞集団中で１つもしくは複数の外因性ペプチドを発現させることを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つまたは複数の外因性ペプチドをコードする１つまたは複数の核酸と接触させることを含む。

【００６７】

一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＤＮＡである。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＲＮＡであり、必要に応じて、ＲＮＡは、ｍＲＮＡである。

【００６８】

一部の実施形態では、富化するステップは、四量体試薬の使用を含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の配列を決定

するステップを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析、質量分析、ＭＳ分析、ＭＳ／ＭＳ分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析、またはその組合せを含む。

【００６９】

一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の結合親和性または安定性を評価するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部が、１つまたは複数の変異を含有するかどうかを決定するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体中でのペプチドと、ＨＬＡ分子との会合を評価するステップを含む。

【００７０】

一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団に、ペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。

【００７１】

一部の実施形態では、疾患または状態は、がんまたは感染性因子による感染である。一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞中に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体に由来する１つまたは複数のペプチドを特徴付けるステップを含み、必要に応じて、ペプチドは、感染性因子の１つまたは複数の標的タンパク質に由来する。一部の実施形態では、方法は、感染性因子の１つまたは複数の標的タンパク質に由来するペプチドの１つまたは複数の領域を特徴付けるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、感染性因子に由来する第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップを含む。

【００７２】

一部の実施形態では、細胞集団は、疾患または状態を有する対象に由来する生体試料に由来する。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、初代細胞の集団である。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドは、抗原提示細胞によって提示された場合、対象に由来するＴ細胞を活性化することができる。一部の実施形態では、方法は、疾患細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体を、非疾患細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体と比較するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、識別するステップの前に、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。

【００７３】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞集団によって通常発現される内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノ

ックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトおよび全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡクラスＩＩα鎖、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。

【００７４】

一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、それぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、異なるポリヌクレオチド分子上に含まれる。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および／または第２のコードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞外で発現される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、細胞内で発現される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。

【００７５】

一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に細胞を溶解するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップをさらに含む。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチド結合分子を、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、ここで、親和性アクセプターペプチド結合分子は、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する。

【００７６】

一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、ビオ

チンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、またはその組合せを含むタグ配列を含み、必要に応じて、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【００７７】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは第１および／もしくは第２の親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性分子を、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、ここで、親和性分子は、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。

【００７８】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、親和性分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、固相表面は、ビーズである。

【００７９】

一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を用いて、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、コードされる第１および／または第２のクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。

【００８０】

一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、トランスフェクトまたは形質導入することを含む。一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸を含むベクターと接触させることを含む。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ポリ核酸は、細胞集団のゲノム中に安定に組み込まれる。

【００８１】

一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のＨＬＡクラスＩα鎖であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のＨＬＡクラスＩα鎖である。

【００８２】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でβ２ミクログロブリンをコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、リンカーによって第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第３の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。

【００８３】

一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドと異なる。一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖および／またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、第１のＨＬＡクラスＩＩα鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、第１のＨＬＡクラスＩＩα鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、第１のＨＬＡクラスＩＩβ鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含む。

【００８４】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、第１のＨＬＡクラスＩＩβ鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖またはＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列は、第３の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドと異なる。

【００８５】

一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１の親和性アクセプターペプチドと異なり、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロ

ラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せからなる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【００８６】

一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【００８７】

一部の実施形態では、方法は、生化学分析またはタンデム質量分析などの質量分析を実施するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ペプチドデータベースに由来する富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された１つまたは複数のペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに対応するペプチド配列を取得するステップを含み、ここで、得られた１つまたは複数の配列は、１つまたは複数のペプチドの配列を識別する。

【００８８】

一部の実施形態では、細胞集団は、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｅｘｐｉ２９３、ＨｅＬａ、Ａ３７５、７２１．２２１、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、Ｊｕｒｋａｔ、ＨｅｐＧ２、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＣＡＣＯ－２、Ｕ９３７、Ｕ－２ＯＳ、ＥｘｐｉＣＨＯ、ＣＨＯおよびＴＨＰ１から選択される細胞株である。一部の実施形態では、細胞株は、１つまたは複数のサイトカイン、チェックポイント阻害剤、エピジェネティック的に活性な薬物、ＩＦＮ－γ、またはその組合せを用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^5個の細胞、少なくとも10^6個の細胞または少なくとも10^7個の細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、樹状細胞、マクロファージ、がん細胞またはＢ細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、腫瘍細胞を含む。

【００８９】

一部の実施形態では、細胞集団を、１つまたは複数の細胞から第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体を単離する前に、薬剤と接触させる。一部の実施形態では、薬剤は、炎症性サイトカイン、化学薬剤、アジュバント、治療剤または放射線である。

【００９０】

一部の実施形態では、第１および／または第２のＨＬＡ対立遺伝子は、変異したＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、第１および／または第２のＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、バーコード配列を含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／

または第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の発現についてアッセイするステップをさらに含む。

【００９１】

一部の実施形態では、アッセイするステップは、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を配列決定すること、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子ＲＮＡをコードするＲＮＡを検出すること、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子タンパク質を検出すること、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、第１および第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ユニークなバーコード配列を含む。一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、ユニークなバーコード配列を含む。

【００９２】

本開示の特性は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載される。本開示の特性および利点のより良い理解は、本開示の原理が使用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明および添付の図面を参照することによって得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００９３】

【図１Ａ】図１Ａは、ユニバーサル免疫精製およびデータ生成のパイプラインの略図である。クラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ分子を、クラスＩ　ＨＬＡもクラスＩＩ　ＨＬＡも発現しない細胞を含む任意の細胞に導入して、特定のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を細胞中で発現させる。遺伝子操作されたＨＬＡを発現する細胞の集団を回収し、溶解し、そのＨＬＡ－ペプチド複合体をタグ付け（例えば、ビオチン化）し、免疫精製する（例えば、ビオチン－ストレプトアビジン相互作用を使用して）。単一のＨＬＡに特異的なＨＬＡ会合ペプチドを、そのタグ付けされた（例えば、ビオチン化された）複合体から溶出させ、評価する（例えば、高分解能ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用して配列決定する）ことができる。

【００９４】

【図１Ｂ】図１Ｂは、ＨＬＡクラスＩＩ分子－ＤＰ、－ＤＱ、および－ＤＲの構造の図である。ＨＬＡ－ＤＲ分子は、定常α鎖および可変β鎖を含有するヘテロ二量体である。ＨＬＡ－ＤＱおよびＨＬＡ－ＤＰ分子は、可変α鎖および可変β鎖を含有するヘテロ二量体である。

【００９５】

【図２】図２は、培養細胞株中でのＨＬＡクラスＩおよびＩＩの発現のために設計された構築物の略図である。ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１構築物は、ビオチン化および免疫精製のためのビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）を実装するＨＬＡクラスＩ設計である。ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１１：０１構築物は、ビオチン化および免疫精製のためのビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）を実装するＨＬＡクラスＩＩ設計である。

【００９６】

【図３】図３は、ＨＬＡクラスＩおよびクラスＩＩ構築物を発現する安定な細胞株を生成するために使用することができる例示的なレンチウイルスベクターの図である。

【００９７】

【図４Ａ】図４Ａは、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるユニバーサルＩＰおよびＨＬＡ会合ペプチド配列決定のためのクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物のトランスフェクションに基づく導入の略図である。

【００９８】

【図４Ｂ】図４Ｂは、クラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物のトランスフェクションに基づく導入、次いで、選択プロセス、例えば、抗生物質耐性遺伝子の含有の略図である。次いで、選択された細胞を、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるユニバーサルＩＰおよびＨＬＡ会合ペプチド配列決定に提出することができる。

【００９９】
【図５】図５は、クラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡのためのユニバーサル免疫精製の図である。ＨＥＫ２９３Ｔ（ヒト胚性腎臓）などの細胞を、トランスフェクトするか、または形質導入して、免疫精製のための親和性タグを有する単一のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を発現させる。ＨＬＡ－タグを発現する細胞を回収し、溶解し、ビオチン－ストレプトアビジン相互作用を使用して、そのＨＬＡ－ペプチド複合体をビオチン化し、免疫精製する。単一のＨＬＡに特異的なＨＬＡ会合ペプチドを、そのビオチン化された複合体から溶出させ、分析する（例えば、高分解能ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用して配列決定する）。
【０１００】
【図６Ａ】図６Ａは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞中でのクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の発現を示すビオチン化に基づく免疫沈降のための、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１構築物を用いるモック、ＧＦＰおよび空のプラスミドのトランスフェクションを比較するウェスタンブロット（抗ビオチン化）である。
【０１０１】
【図６Ｂ】図６Ｂは、ウェスタンブロット分析のためのローディング対照として使用されるＰｏｎｃｅａｕ染色ゲルである。
【０１０２】
【図６Ｃ】図６Ｃは、図６Ａおよび図６Ｂにおいて画像化された操作されたＨＥＫ２９３Ｔ細胞を生成するために使用されるクラスＩ　ＨＬＡ構築物の略図である。
【０１０３】
【図７Ａ】図７Ａは、ＣおよびＮ末端標識されたＨＬＡ－ＢＡＰビオチン化が、クラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ－ＢＡＰ発現細胞の両方について１０分で完了することを示す、ビオチン化時間経過実験のウェスタンブロット（上）およびローディング対照（下）の画像である。結果は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞により発現されたクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ－ＢＡＰ対立遺伝子のトランスフェクションおよびビオチン化の最適化を示す。
【０１０４】
【図７Ｂ】図７Ｂは、ＮおよびＣ末端ＢＡＰで標識されたクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物の両方を発現する細胞に由来する、抗ＢＡＰ（上）およびローディング対照（下）に対するウェスタンブロットである。
【０１０５】
【図７Ｃ】図７Ｃは、トランスフェクションおよびビオチン化の最適化のために使用されたＮおよびＣ末端ＢＡＰで標識されたクラスＩ（ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１）およびクラスＩＩ（ＨＬＡ－ＤＲβ＊１１：０１）構築物の両方の略図である。
【０１０６】
【図８Ａ】図８Ａは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞中でのＨＬＡ免疫沈降のために使用されるビオチン化されたクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物の発現を示すウェスタンブロット画像（ＢＡＰ標識については抗ストレプトアビジンおよびＨＡ標識については抗ＨＡ）およびローディング対照（Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ）である。ビオチンの添加前（－ビオチン）、ビオチンの添加後（＋ビオチンインプット）、ならびにビオチン化およびその後のストレプトアビジンビーズを用いるプルダウン後（＋ビオチンＦＴ）に、溶解物を分析した。＋ビオチンＦＴレーンにおけるシグナルの低下は、ビオチン化されたＭＨＣが溶解物から除去され、ストレプトアビジンビーズに結合することを示す。
【０１０７】
【図８Ｂ】図８Ｂは、ＨｅＬａ（ヒト子宮頸がん）細胞中でのＨＬＡ免疫沈降のために使用されるビオチン化されたクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物の発現を示すウェスタンブロット画像（ＢＡＰ標識については抗ストレプトアビジンおよびＨＡ標識については抗ＨＡ）およびローディング対照（Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ）である。ビオチンの添加前（－ビオチン）、ビオチンの添加後（＋ビオチンインプット）、ならびにビオチン化およびその後のストレプトアビジンビーズを用いるプルダウン後（＋ビオチンＦＴ）に、溶解物

を分析した。＋ビオチンＦＴレーンにおけるシグナルの低下は、ビオチン化されたＭＨＣが溶解物から除去され、ストレプトアビジンビーズに結合することを示す。

【０１０８】

【図８Ｃ】図８Ｃは、Ａ３７５（ヒト悪性メラノーマ）細胞中でのＨＬＡ免疫沈降のために使用されるビオチン化されたクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物の発現を示すウェスタンブロット画像（ＢＡＰ標識については抗ストレプトアビジンおよびＨＡ標識については抗ＨＡ）およびローディング対照（Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ）である。ビオチンの添加前（－ビオチン）、ビオチンの添加後（＋ビオチンインプット）、ならびにビオチン化およびその後のストレプトアビジンビーズを用いるプルダウン後（＋ビオチンＦＴ）に、溶解物を分析した。＋ビオチンＦＴレーンにおけるシグナルの低下は、ビオチン化されたＭＨＣが溶解物から除去され、ストレプトアビジンビーズに結合することを示す。

【０１０９】

【図８Ｄ】図８Ｄは、Ｅｘｐｉ２９３細胞（高密度培養およびタンパク質発現のために遺伝子操作されたヒト胚性腎臓）中でのＨＬＡ免疫沈降のために使用されるビオチン化されたクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物の発現を示すウェスタンブロット画像（ＢＡＰ標識については抗ストレプトアビジンおよびＨＡ標識については抗ＨＡ）およびローディング対照（Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ）である。ビオチンの添加前（－ビオチン）、ビオチンの添加後（＋ビオチンインプット）、ならびにビオチン化およびその後のストレプトアビジンビーズを用いるプルダウン後（＋ビオチンＦＴ）に、溶解物を分析した。＋ビオチンＦＴレーンにおけるシグナルの低下は、ビオチン化されたＭＨＣが溶解物から除去され、ストレプトアビジンビーズに結合することを示す。

【０１１０】

【図９Ａ】図９Ａは、ユニバーサルＨＬＡ免疫沈降（ユニバーサルＩＰ）パイプラインを使用して単離されたＨＬＡ会合ペプチドの例示的なＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析の棒グラフである。ユニバーサルＩＰパイプラインにおいて使用される親和性タグ付きクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物を発現する複数の細胞型（Ａ３７５；灰色、ＨＥＫ２９３Ｔ；橙色、ＨｅＬａ；青色）から識別された合計のユニークなＨＬＡ会合ペプチドのバープロット表示を示す。

【０１１１】

【図９Ｂ】図９Ｂは、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるクラスＩ　ＨＬＡ一対立遺伝子ペプチドプロファイリングに由来する代表的なデータを示すバープロットである。それぞれのバーは、親和性タグ付きＨＬＡ構築物を実装したクラスＩ一対立遺伝子実験から識別されたユニークなＨＬＡ会合ペプチドの総数を表す。

【０１１２】

【図９Ｃ】図９Ｃは、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるクラスＩＩ　ＨＬＡ一対立遺伝子ペプチドプロファイリングに由来する代表的なデータを示すバープロットである。それぞれのバーは、親和性タグ付きＨＬＡ構築物を実装したクラスＩＩ一対立遺伝子実験から識別されたユニークなＨＬＡ会合ペプチドの総数を表す。

【０１１３】

【図１０Ａ】図１０Ａは、ユニバーサルＩＰパイプラインを使用して発見されたクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ会合ペプチドの特徴の例示的な図である。ユニバーサルＩＰプラットフォームを使用して単離および配列決定されたクラスＩ　ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１会合ペプチドおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ－ＤＲβ＊１１：０１会合ペプチドの例示的な配列ロゴ表示を示す。

【０１１４】

【図１０Ｂ】図１０Ｂは、ユニバーサルＩＰパイプラインを使用して識別されたクラスＩ（赤色；ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１）およびクラスＩＩ（青色；ＨＬＡ－ＤＲβ＊１１：０１）ＨＬＡ会合ペプチドを比較するＨＬＡ会合ペプチドの長さ分布を示す棒グラフである。ユニバーサルＩＰを使用して識別されたクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ会合ペプチドの両方の長さ分布は、予想された傾向に従う。

【０１１５】
【図１１Ａ】図１１Ａは、ユニバーサルＩＰパイプラインのための異なる細胞型による発現のために操作されたクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物の略図である。
【０１１６】
【図１１Ｂ】図１１Ｂは、内在性クラスＩＩ　ＨＬＡα鎖およびβ鎖サブユニットを発現する細胞株中で、図１１Ａに示された構築物の発現時に形成し得るクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体の略図である。クラスＩＩ　ＨＬＡ複合体は、異なる親和性ハンドルでそれぞれタグ付けされる、α鎖とβ鎖の対形成によって形成される。
【０１１７】
【図１２Ａ】図１２Ａは、図１１Ｂに示されたクラスＩＩ　ＨＬＡα鎖とβ鎖の対形成および特定のクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体への一義的なペプチド結合割り当てのデコンボリューションのために使用することができる一連のユニバーサルＩＰ戦略の略図であり、複数の親和性タグを含有するクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体の一連のユニバーサルＩＰの検証を示す。二重親和性タグ付きクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物を発現する細胞を溶解し、ビオチン化し、抗ＨＡ抗体に結合させたビーズと共にインキュベートする。ＨＡタグ付きサブユニットを含むクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体を単離し、洗浄し、ＨＡペプチド（例えば、ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ）を使用して溶出させる。次いで、溶出液を、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎまたはストレプトアビジンに結合させたビーズと共にインキュベートして、ＨＡタグ付きおよびビオチンタグ付きクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体を単離する。次いで、二重タグ付きクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体に結合したペプチドを溶出させ、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって配列決定する。
【０１１８】
【図１２Ｂ】図１２Ｂは、二重タグ付きＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１構築物を発現するＨＥＫ２９３Ｔ中での一連のユニバーサルＩＰ戦略のウェスタンブロット検証である。抗ＨＡ抗体を使用して、一連の富化プロセスを行った。ローディング対照（Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ染色ゲル）を示す。
【０１１９】
【図１２Ｃ】図１２Ｃは、二重親和性タグ付きクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物ＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１を発現する細胞を溶解し、ビオチン化を用いずに、抗ＨＡ抗体に結合させたビーズと共にインキュベートした例示的な陰性対照実験に由来する結果を表す。一連のユニバーサルＩＰパイプラインの特異性を証明するために、ウェスタンブロットおよびローディング対照（Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ染色ゲル）を示す。ビオチン化ステップを一連のユニバーサルＩＰプロトコールから除去した場合、富化は観察されなかった。
【０１２０】
【図１３】図１３は、コア結合エピトープの識別を可能にするＨＬＡクラスＩＩトリミング実験の概観の略図である。ＨＬＡクラスＩＩ分子は、同じ供給源タンパク質から生成された、通常は１２～１８アミノ酸長であるペプチドの入れ子セットに結合する。より長いペプチドは、ＨＬＡクラスＩＩ分子のＮおよびＣ末端側から突出するが、コアエピトープは、ペプチド結合溝と最も強く相互作用する。ＨＬＡクラスＩＩ分子に結合したペプチドを、ＮおよびＣ末端に特異的なペプチダーゼを使用してトリミングする。トリミングの後、コアペプチドエピトープを、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用して配列決定する。
【０１２１】
【図１４Ａ】図１４Ａは、ビオチン親和性タグを実装する一対立遺伝子ＨＬＡ－ペプチドームプロファイリング手法の略図である。本開示の例示的な実施形態は、ＢｉｒＡ酵素によりリシン（Ｋ）残基上でビオチン化されたビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）を使用する。ＢＡＰペプチド配列は、ＢｉｒＡ酵素、ビオチン、およびＡＴＰの添加時にビオチン化されるリシン残基を含有する。ビオチン化された生成物は、ストレプトアビジン／ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎに対する高い親和性を示す。ストレプトアビジン／ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎビーズを使用して、ビオチン化されたＢＡＰペプチド配列を富化することができる。

【０１２２】
【図１４Ｂ】図１４Ｂは、遺伝子操作されたＨＬＡ分子のビオチンに基づく免疫精製の略図である。ＨＬＡタンパク質のＮまたはＣ末端のいずれかにＢＡＰ配列を有する特定のＨＬＡ対立遺伝子を、例えば、プラスミドのトランスフェクションまたは形質導入により、細胞中に導入する。プラスミドは、それぞれの対立遺伝子について細胞株をモニタリングするためのＰＣＲに基づく方法を可能にするＤＮＡバーコードを含有することに留意されたい。バーコード長は、少なくとも５塩基対、少なくとも１０塩基対、少なくとも１５塩基対、少なくとも２０塩基対またはそれより長いものであってもよい。ＨＬＡ－ＢＡＰタンパク質を発現する細胞を溶解し、ビオチン化する。ＨＬＡ－ＢＡＰ－ペプチド複合体を、複合体溶解物混合物から免疫精製し、ペプチドの識別のためにＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析にかけることができる。
【０１２３】
【図１５】図１５は、標的エピトープの検証および発見のためのユニバーサルＩＰプラットフォームの例示的な適用の略図である。目的の細胞株を操作して、対立遺伝子特異的ＨＬＡタグ付き（例えば、ＢＡＰ）構築物を発現させる。ＨＬＡタグ付き（例えば、ＢＡＰ）分子を発現する細胞を遺伝子操作して、単一のエピトープまたは複数のエピトープを発現させる。エピトープを発現する細胞を溶解し、ＨＬＡ－ＢＡＰ－ペプチド複合体を免疫精製する。単離されたペプチド抗原を、任意の好適な手段により検査する、例えば、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳにより配列決定することができ、導入されたエピトープから生成されるペプチド断片を、ＨＬＡ－対立遺伝子一致抗原のプロセシングおよび提示のための高効率リードアウトとして使用することができる。
【０１２４】
【図１６】図１６は、ユニバーサルＩＰパイプライン内でのＨＬＡ対立遺伝子多重化の略図である。複数のクラスＩおよびクラスＩＩ対立遺伝子を、単一のＨＬＡ構築物から発現させることができる。例えば、複数の重鎖を、クラスＩ構築物中に含有させることができ、複数のβおよび／またはα鎖を、クラスＩＩ構築物中に含有させることができる。単一の構築物中でＨＬＡ対立遺伝子を多重化することによって、複数のＨＬＡ分子を、目的の細胞株中に送達し、発現させることができる。対立遺伝子多重化は、患者のＨＬＡ型とのマッチングおよびユニバーサルＩＰパイプラインを適用した個別化されたペプチド抗原リードアウトならびにその後の複合体および／またはペプチド分析、例えば、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳリードアウトを可能にする。
【０１２５】
【図１７】図１７は、ＨＬＡリガンドプロファイリングにおける多対立遺伝子および一対立遺伝子手法の図である。多対立遺伝子手法では、ＨＬＡリガンドを、患者材料または細胞株に直接由来するＨＬＡヘテロ二量体を用いて同時免疫沈降させる（上）。これらの細胞は複数のＨＬＡ対立遺伝子を天然に発現したため、そのような多対立遺伝子手法から識別されるペプチドをデコンボリューションして、ＨＬＡ型が公知である場合、特定のＨＬＡヘテロ二量体への結合を割り当てなければならない。一対立遺伝子手法では、ＨＬＡリガンドを、単一のＨＬＡ対立遺伝子のみの発現のために遺伝的に改変された細胞株に由来するＨＬＡヘテロ二量体を用いて同時免疫沈降させる（下）。したがって、一対立遺伝子手法から識別されたペプチドは、ＨＬＡヘテロ二量体結合割り当てに関するデコンボリューションを必要としない。
【０１２６】
【図１８Ａ】図１８Ａは、ＭＨＣ上に提示された変異したネオ抗原性ペプチドを示す図である。
【０１２７】
【図１８Ｂ】図１８Ｂは、本明細書に記載の個別化されたネオ抗原標的化治療を開発する方法の図である。
【０１２８】
【図１９】図１９は、異なるＨＬＡリガンドプロファイリングの異なる実験手法を示す図

を示す。生化学的ペプチド：ＭＨＣ（ｐ：ＭＨＣ）結合アッセイは、遅く、低効率であり、プロセシングに関する洞察がない。多対立遺伝子質量分析は、高効率であり、プロセシング規則を学習する能力を有する；しかしながら、それは、ペプチドを対立遺伝子に割り当てるために、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏでのインピュテーションを必要とする。一対立遺伝子質量分析は、多様なＭＨＣ対立遺伝子にわたってペプチド結合モチーフを定義するための迅速で、偏りのない、クリーンな手法を提供する。一対立遺伝子質量分析は、対立遺伝子カバレッジギャップを迅速かつ体系的に充填し、対立遺伝子特異的ペプチド長選択を活用することを可能にする。

【０１２９】

【図２０Ａ】図２０Ａは、一対立遺伝子手法を使用して明らかにされたＡ＊０１：０１、Ｂ＊５１：０１、Ａ＊２９：０２、およびＢ＊５４：０１対立遺伝子に関する例示的なＨＬＡ結合ペプチドの表を示す。一対立遺伝子手法は、ＮｅｔＭＨＣｐａｎによりあまりスコア化されないが、強力な結合剤として生化学的に検証するＨＬＡ結合ペプチドを明らかにする。

【０１３０】

【図２０Ｂ】図２０Ｂは、１００のシミュレートされたデコンボリューションにおける不正確な割り当ての比率を示す棒グラフである。ランダムな６つの対立遺伝子患者ＨＬＡ遺伝子型（ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃのそれぞれの２つの対立遺伝子、ＵＳ対立遺伝子頻度でサンプリング）を生成した。それぞれの対立遺伝子について、関連一対立遺伝子実験に由来する５００のペプチドをサンプリングし、組み合わせて、モック３０００ペプチド多対立遺伝子データセットを作出した。それぞれのペプチドを、最良のＮｅｔＭＨＣｐａｎ％ランクスコアをもたらす対立遺伝子に割り当てて、ＮｅｔＭＨＣｐａｎによって不正確に割り当てられたペプチドのパーセンテージを決定した。このプロセスを、１００回繰り返した。

【０１３１】

【図２１】図２１は、ＭＳデータを使用する多様な個々のＭＨＣクラスＩ対立遺伝子のためのＭＨＣ提示予測因子の図解である。モデル訓練および評価を、非重複供給源タンパク質上で行う。ＭＳにより観察されたペプチドを、供給源タンパク質に応じて訓練／試験に割り当てる。評価手法は、真の結合剤に対して５０００：１過剰のデコイを用いる。

【０１３２】

【図２２】図２２は、プロセシングおよび対立遺伝子特異的結合の両方に関して予測を有意に改善したことを示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【０１３３】

以下の説明および実施例は、本開示の実施形態を詳細に例示するものである。本開示は、本明細書に記載の特定の実施形態に限定されず、したがって、変化してもよいことが理解されるべきである。当業者であれば、本開示の多数の変化および改変があり、それらはその範囲内に包含されることを認識するであろう。

【０１３４】

全ての用語は、それらが当業者によって理解される通りに理解されることが意図される。別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【０１３５】

本明細書で使用されるセクションの見出しは、組織的な目的のためだけのものであり、記載される主題を限定するものと解釈されるべきではない。

【０１３６】

本開示の様々な特性を単一の実施形態の文脈で記載することができるが、特性を、別々に、または任意の好適な組合せで提供することもできる。逆に、本開示を、明確性のために別々の実施形態の文脈で本明細書に記載することができるが、本開示を単一の実施形態において実行することもできる。

【０１３７】
以下の定義は、当技術分野におけるものを補足し、現在の適用に対して向けられるものであり、任意の関連する、または関連しない事例、例えば、任意の一般的に所有される特許または出願に帰属するものではない。本明細書に記載のものと類似するか、または等価な任意の方法および材料を、本開示の試験の実施に際して使用することができるが、例示的な材料および方法を、本明細書に記載する。したがって、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態だけを説明するためのものであり、限定を意図するものではない。
【０１３８】
定義
本出願では、単数形の使用は、別途具体的に記述されない限り、複数形を含む。本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、内容が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。本出願では、「または」の使用は、別途記述されない限り、「および／または」を意味する。さらに、用語「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」ならびに「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」および「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」などの他の形態の使用は、限定ではない。
【０１３９】
メンバー群の１つもしくは複数、または少なくとも１つのメンバーなどの、用語「１つまたは複数」または「少なくとも１つ」は、さらなる例示によって、自体明らかであり、この用語は、特に、前記メンバーのいずれか１つ、または前記メンバーのいずれか２つもしくはそれより多く、例えば、前記メンバーのいずれか３つ以上、４つ以上、５つ以上、６つ以上もしくは７つ以上など、および最大で全部の前記メンバーに対する参照を包含する。
【０１４０】
「一部の実施形態」、「実施形態」、「一実施形態」または「他の実施形態」に対する本明細書における参照は、実施形態と関連して記載される特性、構造、または特徴が、少なくとも一部の実施形態に含まれるが、本開示の全ての実施形態に必ずしも含まれないことを意味する。
【０１４１】
本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、単語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」（ならびに「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」などの「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」の任意の形態）、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」（ならびに「有する（ｈａｖｅ）」および「有する（ｈａｓ）」などの「有する（ｈａｖｉｎｇ）」の任意の形態）、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」（ならびに「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」および「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」などの「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」の任意の形態）または「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」（ならびに「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｓ）」および「含有する（ｃｏｎｔａｉｎ）」などの「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」の任意の形態）は、包括的であるか、または制約がなく、追加の、記載されていない要素も方法ステップも排除しない。本明細書で考察される任意の実施形態を、本開示の任意の方法または組成物に関して実行することができること、およびその逆が企図される。さらに、本開示の組成物を使用して、本開示の方法を達成することができる。
【０１４２】
パラメーター、量、時間的期間などの測定可能な値を参照する場合に本明細書で使用される用語「約」または「およそ」は、そのような変動が本開示において実施するのに適切である限りにおいて、特定の値からの＋／－２０％もしくはそれ未満、＋／－１０％もしくはそれ未満、＋／－５％もしくはそれ未満、または＋／－１％もしくはそれ未満の変動を包含することを意味する。修飾語句「約」または「およそ」が指す値は、それ自体も具体的に開示されることが理解されるべきである。
【０１４３】

用語「免疫応答」は、Ｔ細胞共刺激のモジュレーションによって影響されるＴ細胞媒介性および／またはＢ細胞媒介性免疫応答を含む。例示的な免疫応答は、Ｔ細胞応答、例えば、サイトカイン産生、および細胞性細胞傷害性を含む。さらに、用語免疫応答は、Ｔ細胞活性化、例えば、抗体産生（液性応答）およびサイトカイン応答細胞、例えば、マクロファージの活性化によって間接的に影響される免疫応答を含む。

【０１４４】

「受容体」は、リガンドに結合することができる生物学的分子または分子群を意味すると理解されるべきである。受容体は、細胞、細胞形成または生物における情報を伝達するために働くことができる。受容体は、少なくとも１つの受容体単位を含み、それぞれの受容体単位がタンパク質分子、例えば、糖タンパク質分子からなってもよい２つまたはそれより多い受容体単位を含有してもよい。受容体は、リガンドの構造を補完する構造を有し、結合パートナーとしてリガンドを複合体化することができる。シグナル伝達情報は、細胞表面上でのリガンドとの結合後の受容体のコンフォメーション変化によって伝達され得る。本開示によれば、受容体は、リガンド、例えば、好適な長さのペプチドまたはペプチド断片と受容体／リガンド複合体を形成することができるＭＨＣクラスＩおよびＩＩのタンパク質を指してもよい。

【０１４５】

「バーコード」配列は、バーコードが付着する配列の同一性または配列が由来する試料の同一性などの、配列に関する情報の項目をコードすることができる核酸配列であってよい。

【０１４６】

「リガンド」とは、受容体と複合体を形成することができる分子を意味する。本開示によれば、リガンドは、例えば、そのアミノ酸配列中に好適な長さおよび好適な結合動機を有するペプチドまたはペプチド断片を意味するものとして理解され、それによりペプチドまたはペプチド断片は、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩのタンパク質と複合体を形成できる。

【０１４７】

「抗原」は、免疫応答を刺激することができる分子であり、がん細胞または感染性因子または自己免疫疾患によって産生され得る。ヘルパーＴリンパ球（ヘルパーＴ（T_H）細胞）であっても、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）であっても、Ｔ細胞によって認識される抗原は、インタクトなタンパク質として認識されず、むしろ、細胞表面上のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＭＨＣタンパク質と会合する低分子ペプチドとして認識される。天然に存在する免疫応答の経過中に、抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のクラスＩＩ　ＭＨＣ分子と会合して認識される抗原は、細胞の外部から獲得され、内在化し、クラスＩＩ　ＭＨＣ分子と会合する低分子ペプチドにプロセシングされる。ＡＰＣはまた、外因性抗原をプロセシングし、クラスＩ　ＭＨＣ分子上にプロセシングされた抗原を提示することによって、ペプチド抗原を交差提示することもできる。クラスＩ　ＭＨＣ分子と会合して認識されるタンパク質を生じる抗原は、一般的には、細胞内で産生されるタンパク質であり、これらの抗原はプロセシングされ、クラスＩ　ＭＨＣ分子と会合する。ここで、所与のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＭＨＣ分子と会合するペプチドが、共通の結合モチーフを有することを特徴とすることが理解され、多数の異なるクラスＩおよびＩＩ　ＭＨＣ分子のための結合モチーフが決定されている。所与の抗原のアミノ酸配列に対応し、所与のクラスＩまたはＩＩ　ＭＨＣ分子のための結合モチーフを含有する合成ペプチドを合成することもできる。次いで、これらのペプチドを適切なＡＰＣに添加し、ＡＰＣを使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでヘルパーＴ細胞またはＣＴＬ応答を刺激することができる。結合モチーフ、ペプチドを合成するための方法、およびヘルパーＴ細胞またはＣＴＬ応答を刺激するための方法は、全て公知であり、当業者には容易に利用可能である。

【０１４８】

用語「ペプチド」は、本明細書では「変異ペプチド」および「ネオ抗原性ペプチド」と互換的に使用される。同様に、用語「ポリペプチド」は、本明細書では、「変異ポリペプ

チド」および「ネオ抗原性ポリペプチド」と互換的に使用される。「ネオ抗原」または「ネオエピトープ」とは、発現されるタンパク質中で腫瘍特異的変異から生じる腫瘍抗原または腫瘍エピトープのクラスを意味する。本開示は、腫瘍特異的変異を含むペプチド、既知の腫瘍特異的変異を含むペプチド、および本開示の方法によって識別された変異ポリペプチドまたはその断片をさらに含む。これらのペプチドおよびポリペプチドは、本明細書では「ネオ抗原性ペプチド」または「ネオ抗原性ポリペプチド」と呼ばれる。ポリペプチドまたはペプチドは、様々な長さ、その中性（非荷電）形態または塩である形態にあってもよく、グリコシル化、側鎖酸化、リン酸化、もしくは任意の翻訳後修飾を含まないか、またはこれらの修飾を含有してもよく、改変が本明細書に記載のポリペプチドの生物活性を破壊しない条件にかけてもよい。一部の実施形態では、本開示のネオ抗原性ペプチドは、ＭＨＣクラスＩについては、長さ２２残基またはそれ未満、例えば、約８～約２２残基、約８～約１５残基、または９もしくは１０残基；ＭＨＣクラスＩＩについては、長さ４０残基またはそれ未満、例えば、長さ約８～約４０残基、長さ約８～約２４残基、約１２～約１９残基、または約１４～約１８残基を含んでもよい。一部の実施形態では、ネオ抗原性ペプチドまたはネオ抗原性ポリペプチドは、ネオエピトープを含む。

【０１４９】

用語「エピトープ」は、本明細書で定義される抗体、抗体ペプチド、および／または抗体様分子（限定されるものではないが、Ｔ細胞受容体を含む）に特異的に結合することができる任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、典型的には、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、一般的には、特定の３次元構造特徴および特定の電荷特徴を有する。

【０１５０】

「Ｔ細胞エピトープ」とは、ペプチド提示ＭＨＣ分子またはＭＨＣ複合体の形態でクラスＩまたはＩＩのＭＨＣ分子によって結合され、次いで、この形態で、それぞれ、細胞傷害性Ｔリンパ球またはヘルパーＴ細胞によって認識および結合され得るペプチド配列を意味する。

【０１５１】

本明細書で使用される用語「抗体」は、ＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４を含む）、ＩｇＡ（ＩｇＡ１およびＩｇＡ２を含む）、ＩｇＤ、ＩｇＥ、またはＩｇＭ、およびＩｇＹを含み、一本鎖全抗体を含む全抗体、およびその抗原結合（Ｆａｂ）断片を含むことを意味する。抗原結合抗体断片としては、限定されるものではないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ（ＶＨおよびＣＨ１からなる）、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、一本鎖抗体、ジスルフィド結合可変断片（ｄｓＦｖ）およびＶＬまたはＶＨドメインを含む断片が挙げられる。抗体は、任意の動物起源に由来してもよい。一本鎖抗体を含む抗原結合抗体断片は、可変領域を単独で、または以下：ヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインの全部もしくは一部と組み合わせて含んでもよい。また、可変領域と、ヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインの任意の組合せも含まれる。抗体は、例えば、ＨＬＡ会合ポリペプチドまたはＨＬＡ－ペプチド複合体に特異的に結合する、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、ヒト化、ならびにヒトモノクローナルおよびポリクローナル抗体であってもよい。当業者であれば、様々な免疫親和性技術が、可溶性ＨＬＡ－ペプチド複合体などの可溶性タンパク質、または例えば、膜からタンパク質分解的に切断された、膜結合型ＨＬＡ会合ポリペプチドを富化するのに好適であることを認識するであろう。これらは、（１）可溶性タンパク質に特異的に結合することができる１つまたは複数の抗体を、固定された、または移動性の基質（例えば、プラスチックウェルまたは樹脂、ラテックスまたは常磁性ビーズ）に固定する技術、および（２）生体試料に由来する可溶性タンパク質を含有する溶液を、抗体で被覆された基質上に通過させ、可溶性タンパク質を抗体に結合させる技術を含む。抗体を含む基質および結合した可溶性タンパク質を、溶液から分離し、必要に応じて、抗体および可溶性タンパク質を、例えば、抗体浴液のｐＨおよび／またはイオン強度および／またはイオン組成を変化させることによって解離させる。あるいは、抗体および可溶性タンパク質を混合し、

巨大分子凝集体を形成させる免疫沈降技術を使用することができる。巨大分子凝集体を、サイズ排除技術または遠心分離によって溶液から分離することができる。

【０１５２】

用語「免疫精製（ＩＰ）」（または免疫親和性精製もしくは免疫沈降）は、当技術分野で周知のプロセスであり、試料からの所望の抗原の単離のために広く使用されている。一般に、このプロセスは、所望の抗原を含有する試料を、固相に共有結合させた抗原に対する抗体を含む親和性マトリックスと接触させることを含む。試料中の抗原は、免疫化学結合を介して親和性マトリックスに結合するようになる。次いで、親和性マトリックスを洗浄して、任意の未結合種を除去する。親和性マトリックスと接触する溶液の化学組成を変更することにより、親和性マトリックスから抗原を除去する。免疫精製を、親和性マトリックスを含有するカラム上で行うことができ、その場合、溶液は溶離液である。あるいは、免疫精製は、バッチプロセスであってもよく、その場合、親和性マトリックスは、溶液中の懸濁液として維持される。プロセスにおける重要なステップは、マトリックスからの抗原の除去である。これは、一般的には、親和性マトリックスと接触する溶液のイオン強度を増大させることにより、例えば、無機塩の添加により達成される。ｐＨの変更もまた、抗原と親和性マトリックスとの免疫化学結合を解離させるのに有効であり得る。

【０１５３】

「薬剤」とは、任意の低分子化合物、抗体、核酸分子、もしくはポリペプチド、またはその断片を意味する。

【０１５４】

「変更」または「変化」は、増加または減少を意味する。変更は、最小で１％、２％、３％、４％、５％、１０％、２０％、３０％、もしくは４０％、５０％、６０％、またはさらには、最大で７０％、７５％、８０％、９０％、もしくは１００％であってもよい。

【０１５５】

「生体試料」とは、生物に由来する任意の組織、細胞、流体、または他の材料を意味する。本明細書で使用される場合、用語「試料」は、生物に由来する任意の組織、細胞、流体、または他の材料などの生体試料を含む。「特異的に結合する」とは、ある分子（例えば、ポリペプチド）を認識し、これに結合するが、試料、例えば、生体試料中の他の分子を実質的に認識せず、これに結合しない化合物（例えば、ペプチド）を意味する。

【０１５６】

「捕捉試薬」とは、ある分子（例えば、核酸分子またはポリペプチド）に特異的に結合して、その分子（例えば、核酸分子またはポリペプチド）を選択または単離する試薬を意味する。

【０１５７】

本明細書で使用される場合、用語「決定すること」、「評価すること」、「アッセイすること」、「測定すること」、「検出すること」およびその文法的等価物は、量的決定と質的決定の両方を指し、したがって、用語「決定すること」は、本明細書では、「アッセイすること」、「測定すること」などと互換的に使用される。量的決定が意図される場合、分析物などの「量を決定すること」という語句が使用される。質的および／または量的決定が意図される場合、分析物の「レベルを決定すること」または分析物を「検出すること」という語句が使用される。

【０１５８】

「断片」とは、参照タンパク質または核酸と実質的に同一であるタンパク質または核酸の一部を意味する。一部の実施形態では、部分は、本明細書に記載の参照タンパク質または核酸の生物活性の少なくとも５０％、７５％、または８０％、または９０％、９５％、またはさらには９９％を保持する。

【０１５９】

用語「単離された」、「精製された」、「生物学的に純粋な」およびその文法的等価物は、その天然状態で見出される際にそれに通常付随する成分を様々な程度で含まない材料を指す。「単離する」は、元の供給源または環境からの分離の程度を示す。「精製する」

は、単離よりも高い分離の程度を示す。「精製された」または「生物学的に純粋な」タンパク質は、不純物がタンパク質の生物学的特性に実質的に影響しない、または他の有害な結果を引き起こさないように、他の材料を十分に含まない。すなわち、本開示の核酸またはペプチドは、それが、組換えＤＮＡ技術によって産生された場合、細胞材料、ウイルス材料、もしくは培養培地を、または化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない場合、精製されている。純度および均一性は、典型的には、分析化学技術、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを使用して決定される。用語「精製された」は、核酸またはタンパク質が、電気泳動ゲル中で本質的には１つのバンドを生じることを示してもよい。改変、例えば、リン酸化またはグリコシル化を受けてもよいタンパク質については、異なる改変は、別々に精製することができる異なる単離されたタンパク質を生じてもよい。

【０１６０】

「単離された」ポリペプチド（例えば、ＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチド）またはポリペプチド複合体（例えば、ＨＬＡ－ペプチド複合体）は、それに天然に付随する成分から分離されている本開示のポリペプチドまたはポリペプチド複合体を意味する。典型的には、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、それが天然に会合するタンパク質および天然に存在する有機分子から少なくとも６０重量％遊離している場合、単離されている。調製物は、本開示のポリペプチドまたはポリペプチド複合体が少なくとも７５重量％、少なくとも９０重量％、または少なくとも９９重量％であってもよい。単離された本開示のポリペプチドまたはポリペプチド複合体を、例えば、天然の供給源からの抽出により、そのようなポリペプチドまたはポリペプチド複合体の１つもしくは複数の成分をコードする組換え核酸の発現により、あるいはポリペプチドまたはポリペプチド複合体の１つもしくは複数の成分を化学的に合成することにより取得することができる。純度を、任意の適切な方法、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはＨＰＬＣ分析によって測定することができる。

【０１６１】

用語「ベクター」とは、異種核酸を輸送するか、またはその発現を媒介することができる核酸分子を指す。プラスミドは、用語「ベクター」により包含される属の種である。ベクターは、典型的には、宿主細胞中での複製および／または維持にとって必要な複製起点および他の実体を含有する核酸配列を指す。作動可能に連結された遺伝子および／または核酸配列の発現を指令することができるベクターを、本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。一般に、有用な発現ベクターは、そのベクター形態では染色体に結合せず、典型的には、安定な、もしくは一過的な発現のための実体またはコードされるＤＮＡを含む環状二本鎖ＤＮＡ分子を指す「プラスミド」の形態にあることが多い。本明細書に開示される方法において使用することができる他の発現ベクターとしては、限定されるものではないが、プラスミド、エピソーム、細菌人工染色体、酵母人工染色体、バクテリオファージまたはウイルスベクターが挙げられ、そのようなベクターは、宿主のゲノム中に組み込まれるか、または細胞中で自律的に複製することができる。ベクターは、ＤＮＡまたはＲＮＡベクターであってもよい。等価な機能を果たす当業者には公知の他の形態の発現ベクター、例えば、自己複製する染色体外ベクターまたは宿主ゲノム中に組み込むことができるベクターを使用することもできる。例示的なベクターは、自己複製する、および／またはベクターが連結された核酸を発現させることができるものである。

【０１６２】

「分子プロファイル」とは、２つまたはそれより多いマーカー（例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）の発現または発現レベルの特徴付けを意味する。

【０１６３】

融合タンパク質を参照して使用される用語「スペーサー」または「リンカー」とは、融合タンパク質を含むタンパク質を接合するペプチドを指す。一般に、スペーサーは、タンパク質またはＲＮＡ配列間を接合するか、またはその一部の最小距離もしくは他の空間的関係を保持する以外の特定の生物活性を有しない。しかしながら、一部の実施形態では、

スペーサーの構成アミノ酸を、分子のフォールディング、正味電荷、または疎水性などの分子のある特性に影響するように選択することができる。本開示の実施形態における使用のための好適なリンカーは、当業者には周知であり、限定されるものではないが、直鎖もしくは分枝鎖炭素リンカー、複素環炭素リンカー、またはペプチドリンカーが挙げられる。リンカーは、一部の実施形態では、それぞれの抗原性ペプチドが適切にフォールディングすることを確保するのに十分な距離によって２つの抗原性ペプチドを分離するために使用される。例示的なペプチドリンカー配列は、可撓性の伸長したコンフォメーションを採用し、秩序ある二次構造を展開する傾向を示さない。可撓性タンパク質領域中の典型的なアミノ酸としては、Ｇｌｙ、ＡｓｎおよびＳｅｒが挙げられる。Ｇｌｙ、ＡｓｎおよびＳｅｒを含有するアミノ酸配列の実質的に任意の順列は、リンカー配列に関する上記基準を満たすと予想される。ＴｈｒおよびＡｌａなどの他の中性に近いアミノ酸も、リンカー配列中で使用することができる。リンカーとして使用することができるさらに他のアミノ酸配列は、Marateaら（１９８５年）、Gene　４０巻：３９～４６頁；Murphyら（１９８６年）、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA　８３巻：８２５８～６２頁；米国特許第４，９３５，２３３号；および米国特許第４，７５１，１８０号に開示されている。

【０１６４】

用語「新生物」とは、不適切に高レベルの細胞分裂、不適切に低レベルのアポトーシス、またはその両方によって引き起こされる、またはそれをもたらす任意の疾患を指す。神経膠芽腫は、新生物またはがんの１つの非限定例である。用語「がん」または「腫瘍」または「過増殖性障害」とは、未制御の増殖、不死、転移能力、急速な成長および増殖速度、ならびにある特定の特徴的な形態学的特性などの、がんを引き起こす細胞に典型的な細胞プロセシング特徴の存在を指す。がん細胞は、腫瘍の形態にあることが多いが、そのような細胞は、動物内で単独で存在してもよく、または白血病細胞などの非腫瘍形成性がん細胞であってもよい。がんとして、Ｂ細胞がん、例えば多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、重鎖病、例えばアルファ鎖病、ガンマ鎖病およびミュー鎖病、良性モノクローナルガンマグロブリン血症および免疫細胞アミロイドーシス、メラノーマ、乳がん、肺がん、気管支がん、結腸直腸がん、前立腺がん（例えば転移性、ホルモン不応性前立腺がん）、膵がん、胃がん、卵巣がん、膀胱がん、脳または中枢神経系がん、末梢神経系がん、食道がん、子宮頸がん、子宮または子宮内膜がん、口腔または咽頭がん、肝がん、腎がん、精巣がん、胆道がん、小腸または虫垂がん、唾液腺がん、甲状腺がん、副腎がん、骨肉腫、軟骨肉腫、血液学的組織のがんなどが挙げられるが、これらに限定されない。本開示によって包含される方法に適用可能ながんの型の他の非限定例としては、ヒト肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、結腸直腸がん、膵がん、乳がん、卵巣がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝細胞腫、胆管癌、肝がん、絨毛癌、精上皮腫、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、骨がん、脳腫瘍、精巣がん、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫；白血病、例えば、急性リンパ球性白血病および急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病）；慢性白血病（慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病）；および真性多血症、リンパ腫（ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症ならびに重鎖病が挙げられる。一部の実施形態では、がんは、限定されるものではないが、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸がん、婦人科がん、腎がん、喉頭がん、肺がん、口腔がん、頭頸部がん、卵巣がん、膵がん、前立腺がんまたは皮膚がんなどの、上皮がんである。他の実施形態では、がんは、乳がん、前立腺がん、肺がん、または結腸がんである。さらに他の実施形態では、上皮がんは、非小細胞肺がん、非乳頭状腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌（例えば、漿液性卵巣癌）、または乳癌である。上皮がんは、限定されるものでは

ないが、漿液性、類内膜性、粘液性、明細胞、ブレンナー、または未分化を含む、様々な他の様式で特徴付けることができる。一部の実施形態では、本開示は、リンパ腫、または限定されるものではないが、マントル細胞リンパ腫を含むそのサブタイプの処置、診断および／または予後診断において使用される。また、リンパ増殖性障害は、増殖性疾患であると考えられる。

【０１６５】

用語「ワクチン」は、疾患（例えば、新生物／腫瘍／感染性因子／自己免疫疾患）の予防および／または処置のための免疫を生成するための組成物を意味するものと理解されるべきである。したがって、ワクチンは、抗原を含み、ワクチン接種によって特定の防衛および防御物質を生成するためにヒトまたは動物において使用されることが意図される医薬である。「ワクチン組成物」は、薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含んでもよい。本開示の態様は、抗原に基づくワクチンの調製における技術の使用に関する。これらの実施形態では、ワクチンは、１つまたは複数の疾患特異的抗原性ペプチド（またはそれらをコードする対応する核酸）を指すことを意味する。一部の実施形態では、抗原に基づくワクチンは、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも１６個、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、少なくとも２０個、少なくとも２１個、少なくとも２２個、少なくとも２３個、少なくとも２４個、少なくとも２５個、少なくとも２６個、少なくとも２７個、少なくとも２８個、少なくとも２９個、少なくとも３０個、またはそれより多い抗原性ペプチドを含有する。一部の実施形態では、抗原に基づくワクチンは、２～１００個、２～７５個、２～５０個、２～２５個、２～２０個、２～１９個、２～１８個、２～１７個、２～１６個、２～１５個、２～１４個、２～１３個、２～１２個、２～１０個、２～９個、２～８個、２～７個、２～６個、２～５個、２～４個、３～１００個、３～７５個、３～５０個、３～２５個、３～２０個、３～１９個、３～１８個、３～１７個、３～１６個、３～１５個、３～１４個、３～１３個、３～１２個、３～１０個、３～９個、３～８個、３～７個、３～６個、３～５個、４～１００個、４～７５個、４～５０個、４～２５個、４～２０個、４～１９個、４～１８個、４～１７個、４～１６個、４～１５個、４～１４個、４～１３個、４～１２個、４～１０個、４～９個、４～８個、４～７個、４～６個、５～１００個、５～７５個、５～５０個、５～２５個、５～２０個、５～１９個、５～１８個、５～１７個、５～１６個、５～１５個、５～１４個、５～１３個、５～１２個、５～１０個、５～９個、５～８個、または５～７個の抗原性ペプチドを含有する。一部の実施形態では、抗原に基づくワクチンは、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、または２０個の抗原性ペプチドを含有する。一部の場合、抗原性ペプチドは、ネオ抗原性ペプチドである。一部の場合、抗原性ペプチドは、１つまたは複数のネオエピトープを含む。

【０１６６】

用語「薬学的に許容される」とは、米国連邦政府もしくは州政府の規制当局によって認可されているか、もしくは認可され得る、またはヒトを含む動物における使用のために米国薬局方もしくは他の一般的に認識される薬局方に列挙されていることを指す。「薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤」とは、薬剤と一緒に、対象に投与することができ、その薬理学的活性を破壊せず、治療量の薬剤を送達するのに十分な用量で投与した場合に非毒性的である賦形剤、担体または希釈剤を指す。本明細書に記載のプールされた疾患特異的抗原の「薬学的に許容される塩」は、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症なしに、人類または動物の組織と接触する使用にとって好適であると当技術分野で一般に考えられる酸性または塩基性塩であってよい。そのような塩としては、アミンなどの塩基性残基の無機塩および有機酸塩、ならびにカルボン酸などの酸性残基のアルカリまたは有機塩が挙げられる。特定の薬学的塩としては、限定されるものではないが、塩酸、リン酸、臭化水素酸、リンゴ酸、グリコール酸、フマル酸、硫酸、ス

ルファミン酸、スルファニル酸、ギ酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、エタンジスルホン酸、２－ヒドロキシエチルスルホン酸、硝酸、安息香酸、２－アセトキシ安息香酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、ステアリン酸、サリチル酸、グルタミン酸、アスコルビン酸、パモ酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、プロピオン酸、ヒドロキシマレイン酸、ヨウ化水素酸、フェニル酢酸、酢酸、ＨＯＯＣ－（ＣＨ２）ｎ－ＣＯＯＨ（式中、ｎは０～４である）などのアルカン酸などの酸の塩が挙げられる。同様に、薬学的に許容されるカチオンとしては、限定されるものではないが、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、リチウムおよびアンモニウムが挙げられる。当業者であれば、本開示および当技術分野における知識から、Remington's Pharmaceutical Sciences、第１７版、Mack Publishing Company、Easton、PA、１４１８頁（１９８５年）によって列挙されたものなどの、本明細書で提供されるプールされた疾患特異的抗原のためのさらなる薬学的に許容される塩を認識するであろう。一般に、薬学的に許容される酸性または塩基性塩を、任意の従来の化学的方法によって塩基性または酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。簡単に述べると、そのような塩を、適切な溶媒中で、遊離酸または塩基型のこれらの化合物を、化学量論量の適切な塩基または酸と反応させることによって調製することができる。

【０１６７】

本開示の方法において有用な核酸分子は、本開示のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子を含む。そのような核酸分子は、内在性核酸配列と１００％同一である必要はないが、典型的には、実質的な同一性を示す。内在性配列に対する実質的な同一性を有するポリヌクレオチドは、典型的には、二本鎖核酸分子の少なくとも一方の鎖とハイブリダイズすることができる。「ハイブリダイズする」とは、様々なストリンジェンシー条件下で、相補的ポリヌクレオチド配列、またはその一部の間で対形成して、二本鎖分子を形成することを意味する（例えば、Wahl, G. M.およびS. L. Berger（１９８７年）、Methods Enzymol. １５２巻：３９９頁；Kimmel, A. R.（１９８７年）、Methods Enzymol. １５２巻：５０７頁を参照されたい）。例えば、ストリンジェントな塩濃度は、通常、約７５０ｍＭ未満のＮａＣｌおよび７５ｍＭ未満のクエン酸三ナトリウム、約５００ｍＭ未満のＮａＣｌおよび５０ｍＭ未満のクエン酸三ナトリウム、または約２５０ｍＭ未満のＮａＣｌおよび２５ｍＭ未満のクエン酸三ナトリウムであってよい。低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを、有機溶媒、例えば、ホルムアミドの非存在下で得ることができるが、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを、少なくとも約３５％のホルムアミド、または少なくとも約５０％のホルムアミドの存在下で得ることができる。ストリンジェントな温度条件は、通常、少なくとも約３０℃、少なくとも約３７℃、または少なくとも約４２℃の温度を含んでもよい。ハイブリダイゼーション時間、界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）の濃度、および担体ＤＮＡの含有または排除などの様々なさらなるパラメーターが、当業者には周知である。様々なレベルのストリンジェンシーは、必要に応じてこれらの様々な条件を組み合わせることによって達成される。例示的な実施形態では、ハイブリダイゼーションは、７５０ｍＭのＮａＣｌ、７５ｍＭのクエン酸三ナトリウム、および１％ＳＤＳ中、３０℃で行ってもよい。別の例示的な実施形態では、ハイブリダイゼーションは、５００ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのクエン酸三ナトリウム、１％ＳＤＳ、３５％ホルムアミド、および１００μｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）中、３７℃で行ってもよい。別の例示的な実施形態では、ハイブリダイゼーションは、２５０ｍＭのＮａＣｌ、２５ｍＭのクエン酸三ナトリウム、１％ＳＤＳ、５０％ホルムアミド、および２００μｇ／ｍｌのｓｓＤＮＡ中、４２℃で行ってもよい。これらの条件に対する有用な変化は、当業者には容易に明らかであろう。ほとんどの適用のために、ハイブリダイゼーションの後の洗浄ステップもまた、ストリンジェンシーが変化してもよい。洗浄ストリンジェンシー条件を、塩濃度および温度によって定義することができる。上記のように、塩濃度を低下させることにより、または温度を増加させることにより、洗浄ストリンジェンシーを増加させることができる。例えば、洗浄ステップのためのストリンジェントな塩濃度は、約３０ｍＭ未満のＮａＣｌお

よび３ｍＭ未満のクエン酸三ナトリウム、または約１５ｍＭ未満のＮａＣｌおよび１．５ｍＭ未満のクエン酸三ナトリウムであってもよい。洗浄ステップのためのストリンジェントな温度条件は、少なくとも約２５℃、少なくとも約４２℃、または少なくとも約６８℃の温度を含んでもよい。例示的な実施形態では、洗浄ステップは、３０ｍＭのＮａＣｌ、３ｍＭのクエン酸三ナトリウム、および０．１％ＳＤＳ中、２５℃で行ってもよい。他の例示的な実施形態では、洗浄ステップは、１５ｍＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのクエン酸三ナトリウム、および０．１％ＳＤＳ中、４２℃で行ってもよい。別の例示的な実施形態では、洗浄ステップは、１５ｍＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのクエン酸三ナトリウム、および０．１％ＳＤＳ中、６８℃で行ってもよい。これらの条件に対するさらなる変化は、当業者には容易に明らかであろう。ハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知であり、例えば、BentonおよびDavis（Science １９６巻：１８０頁、１９７７年）；Grunsteinおよび Hogness（Proc. Natl. Acad. Sci.、USA ７２巻：３９６１頁、１９７５年）；Ausubelら（Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience、New York、２００１年）；BergerおよびKimmel（Guide to Molecular Cloning Techniques、１９８７年、Academic Press、New York）；ならびにSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New Yorkに記載されている。

【０１６８】

「実質的に同一」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか１つ）または核酸配列（例えば、本明細書に記載の核酸配列のいずれか１つ）に対して少なくとも５０％の同一性を示すポリペプチドまたは核酸分子を意味する。そのような配列は、比較のために使用される配列とアミノ酸レベルまたは核酸レベルで少なくとも６０％、８０％、または８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、またはさらには９９％またはそれより高く同一であってもよい。配列同一性は、典型的には、配列分析ソフトウェア（例えば、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ、１７１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．５３７０５、ＢＬＡＳＴ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＧＡＰ、またはＰＩＬＥＵＰ／ＰＲＥＴＴＹ ＢＯＸプログラム）を使用して測定される。そのようなソフトウェアは、相同性の程度を、様々な置換、欠失、および／または他の改変を割り当てることによって、同一の、または類似する配列を一致させる。保存的置換は、典型的には、以下の群：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン内に置換を含む。同一性の程度を決定するための例示的な手法においては、ＢＬＡＳＴプログラムを、密接に関連する配列を示す、ｅ－３とｅ－ｍ°との間の確率スコアと共に使用することができる。「参照」とは、比較の標準を意味する。

【０１６９】

用語「対象」または「患者」とは、処置、観察、または実験の対象物である動物を指す。ほんの一例として、対象としては、限定されるものではないが、ヒトを含む哺乳動物または非ヒト霊長類、ネズミ、ウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、もしくはネコなどの非ヒト哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７０】

用語「処置する」、「処置された」、「処置すること」、「処置」などは、障害および／またはそれと関連する症状（例えば、新生物または腫瘍または感染性因子または自己免疫疾患）を低減させること、防止すること、または改善することを指すことを意味する。「処置すること」は、疾患（例えば、がんまたは感染性因子による感染または自己免疫疾患）の開始、または開始の疑いの後の、対象への治療の投与を指してもよい。「処置すること」は、「軽減すること」の概念を含み、これは疾患と関連する任意の症状もしくは他の悪影響および／または治療と関連する副作用の発生もしくは再発の頻度、または重症度

を低下させることを指す。用語「処置すること」はまた、「管理すること」の概念を包含し、これは患者における疾患もしくは障害の重症度を低減させること、例えば、疾患を有する患者の人生を延長すること、もしくは患者の生存性を延長すること、またはその再発を遅延させること、例えば、疾患に罹患していた患者における寛解の期間を延ばすことを指す。除外されないが、障害または状態を処置することは、障害、状態、またはそれと関連する症状が完全に除去されることを必要としないことが理解される。

【０１７１】

本明細書で使用される用語「防止する」、「防止すること」、「防止」およびその文法的等価物は、疾患または状態と関連する症状の開始を、薬剤または化合物の投与が始まる時点でそのような症状を発症していない対象において回避すること、または遅延させることを意味する。

【０１７２】

用語「治療効果」とは、障害（例えば、新生物、腫瘍、または感染性因子による感染または自己免疫疾患）の症状の１つもしくは複数またはその関連する病状のある程度の緩和を指す。本明細書で使用される「治療有効量」とは、細胞または対象への単回または複数回用量の投与時に、そのような処置の非存在下で予想されるものを超えて、そのような障害を有する患者の生存性を延長する、障害の１つまたは複数の徴候または症状を低減させる、防止する、または遅延させることなどに有効である薬剤の量を指す。「治療有効量」は、治療効果を達成するのに必要とされる量を定量化することが意図される。当技術分野における通常の知識を有する医師または獣医師であれば、必要とされる医薬組成物の「治療有効量」（例えば、ED_{50}）を容易に決定し、処方することができる。例えば、医師または獣医師であれば、所望の治療効果を達成するために必要とされるものよりも低いレベルで、医薬組成物中で使用される本開示の化合物の用量を開始し、所望の効果が達成されるまで、投与量を徐々に増加させることができる。疾患、状態、および障害は、本明細書では互換的に使用される。

【０１７３】

一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子をコードする核酸配列は、ＨＬＡ－タンパク質を免疫精製するために使用することができる、ペプチドタグ、親和性タグ、エピトープタグ、または親和性アクセプタータグをさらに含む。当業者であれば、用語「ペプチドタグ」、「親和性タグ」、「エピトープタグ」または「親和性アクセプタータグ」は、本明細書では互換的に使用されることを認識するであろう。本明細書で使用される場合、用語「親和性アクセプタータグ」とは、例えば、親和性精製により、タグ付けされたタンパク質を容易に検出または精製することを可能にするアミノ酸配列を指す。親和性アクセプタータグは、一般的には（必要ではないが）、ＨＬＡ対立遺伝子のＮもしくはＣ末端に、またはその近くに置かれる。様々なペプチドタグが当技術分野で周知である。非限定例としては、ポリ－ヒスチジンタグ（例えば、８個の連続するＨｉｓ残基などの、４～１５個の連続するＨｉｓ残基）；ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ；ＨＡタグ（例えば、Fieldら、Mol. Cell. Biol.、８巻：２１５９頁、１９８８年）；ｃ－ｍｙｃタグ（例えば、Evansら、Mol. Cell. Biol.、５巻：３６１０頁、１９８５年）；単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ（例えば、Paborskyら、Protein Engineering、３巻：５４７頁、１９９０年）；ＦＬＡＧタグ（例えば、Hoppら、BioTechnology、６巻：１２０４頁、１９８８年；米国特許第４，７０３，００４号および第４，８５１，３４１号）；ＫＴ３エピトープタグ（例えば、Martineら、Science、２５５巻：１９２頁、１９９２年）；チューブリンエピトープタグ（例えば、Skinner、Biol. Chem.、２６６巻：１５１７３頁、１９９１年）；Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ（例えば、Lutz-Freyemuthら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、８７巻：６３９３頁、１９９０年）；ストレプトアビジンタグ（ＳｔｒｅｐＴａｇ（商標）もしくはＳｔｒｅｐＴａｇＩＩ（商標）；例えば、Schmidtら、J. Mol. Biol.、２５５巻（５号）：７５３～７６６頁、１９９６年もしくは米国特許第５，５０６，１２１号を参照されたい；また、Ｓｉｇｍａ－Ｇｅｎｏｓｙｓから商業的に入手可能である）；または水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質に由来するＶ

ＳＶ－Ｇエピトープタグ；またはサルウイルス５（ＳＶ５）のパラミクソウイルスのＰおよびＶタンパク質上に見出される小エピトープ（Ｐｋ）に由来するＶ５タグが挙げられる。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、ＨＬＡ－タンパク質に認識可能なエピトープ（抗体結合部位）を付加して、対応する抗体の結合を提供し、これによりタグ付けされたタンパク質の識別または親和性精製を可能にするペプチドタグの型である、「エピトープタグ」である。エピトープタグの非限定例は、ＩｇＧに結合するプロテインＡまたはプロテインＧである。一部の実施形態では、ＩｇＧ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　６　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗクロマトグラフィー樹脂のマトリックスを、ヒトＩｇＧに共有結合させる。この樹脂は、プロテインＡでタグ付けされたタンパク質の迅速かつ便利な精製のための、高い流量を可能にする。多数の他のタグ部分が、当業者には公知であり、当業者によって想定され得、本明細書で企図される。ペプチドタグを親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のエレメントとして発現させることができる限り、任意のペプチドタグを使用することができる。

【０１７４】

本明細書で使用される場合、用語「親和性分子」とは、親和性アクセプターペプチドに化学的特異性をもって結合する分子またはリガンドを指す。化学的特異性は、タンパク質の結合部位が特定のリガンドに結合する能力である。タンパク質が結合することができるリガンドが少ないほど、その特異性は高くなる。特異性は、所与のタンパク質とリガンドとの結合の強度を記述する。この関係は、タンパク質－リガンド系について結合状態と未結合状態との平衡を特徴付ける、解離定数（K_D）によって記述することができる。

【０１７５】

用語「親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体」とは、親和性アクセプターペプチドを含む単一の対立遺伝子組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡペプチドに特異的に結合したＨＬＡクラスＩもしくはクラスＩＩ会合ペプチドまたはその一部を含む複合体を指す。

【０１７６】

親和性分子と親和性アクセプタータグとの相互作用、またはエピトープとＨＬＡペプチドとの相互作用を参照して使用される場合の用語「特異的結合」または「特異的に結合すること」は、相互作用がタンパク質上の特定の構造（すなわち、抗原性決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味する；換言すれば、親和性分子は、一般のタンパク質よりもむしろ、特定の親和性アクセプターペプチド構造を認識し、これに結合している。

【０１７７】

本明細書において使用される用語「親和性」は、結合対の２つのメンバー、例えば「親和性結合タグ」と「親和性分子」とＨＬＡ結合ペプチドとクラスＩまたはＩＩ　ＨＬＡとの間の結合の強度の測定値を指す。K_Dは、解離定数であり、モル濃度の単位を有する。親和定数は、解離定数の逆数である。親和定数は、この化学実体を記載するための一般的な用語として使用される場合がある。これは、結合のエネルギーの直接測定値である。親和性は、商業的に入手できるＢｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲ装置を使用して例えば表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって実験的に決定できる。親和性を、５０％のペプチドが置き換えられる濃度である、阻害濃度５０（IC_{50}）として表すこともできる。同様に、ｌｎ（IC_{50}）とは、IC_{50}の自然対数を指す。K_{off}とは、例えば、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－エピトープ複合体からの親和性分子の解離に関する、オフ速度定数を指す。

【０１７８】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）を含み、ストレプトアビジン／ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎビーズを使用して複雑な細胞混合物から免疫精製される。ビオチン－アビジン／ストレプトアビジン結合は、天然で公知の最も強力な非共有結合性相互作用である。この特性は、ビオチンが共有結合するタンパク質の免疫精製などの、様々な適用のための生物学的手

段として活用されている。例示的な実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子をコードする核酸配列は、免疫精製のための親和性アクセプタータグとしてビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）を実装する。ＢＡＰを、タグ内の単一のリシン残基で、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで特異的にビオチン化することができる（例えば、米国特許第５，７２３，５８４号；第５，８７４，２３９号；および第５，９３２，４３３号；ならびに英国特許第ＧＢ２３７００３９号）。ＢＡＰは、典型的には、１５アミノ酸長であり、ビオチンアクセプター残基として単一のリシンを含有する。一部の実施形態では、ＢＡＰは、単一対立遺伝子ＨＬＡペプチドのＮもしくはＣ末端に、またはその近くに置かれる。一部の実施形態では、ＢＡＰは、クラスＩ　ＨＬＡペプチドの重鎖ドメインと、β２ミクログロブリンドメインとの間に置かれる。一部の実施形態では、ＢＡＰは、クラスＩＩ　ＨＬＡペプチドのβ鎖ドメインとα鎖ドメインとの間に置かれる。一部の実施形態では、ＢＡＰは、クラスＩ　ＨＬＡの重鎖のα１、α２、およびα３ドメインの間、またはそれぞれ、クラスＩＩ　ＨＬＡのα鎖およびβ鎖のα１およびα２およびβ１およびβ２ドメインの間のループ領域中に置かれる。ビオチン化および免疫精製のためにＢＡＰを実装するＨＬＡクラスＩおよびＩＩ発現のために設計される例示的な構築物を、図２に記載する。

【０１７９】

本明細書で使用される場合、用語「ビオチン」とは、化合物であるビオチン自体ならびにそのアナログ、誘導体およびバリアントを指す。したがって、用語「ビオチン」は、ビオチン（ｃｉｓ－ヘキサヒドロ－２－オキソ－１Ｈ－チエノ［３，４］イミダゾール－４－ペンタン酸）ならびにビオチン様化合物を含む、その任意の誘導体およびアナログを含む。そのような化合物としては、例えば、ビオチン－ｅ－Ｎ－リシン、ビオシチンヒドラジド、２－イミノビオチンのアミノまたはスルフヒドリル誘導体ならびにビオチニル－Ｅ－アミノカプロン酸－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、スルホスクシンイミドイミノビオチン、ビオチンブロモアセチルヒドラジド、ｐ－ジアゾベンゾイルビオシチン、３－（Ｎ－マレイミドプロピオニル）ビオシチン、デスチオビオチンなどが挙げられる。用語「ビオチン」はまた、リザビジン、アビジン、ストレプトアビジン、タマビジン部分、または他のアビジン様ペプチドのうちの１つまたは複数に特異的に結合することができるビオチンバリアントも含む。

【０１８０】

ＨＬＡリガンドプロファイリング手法

ＨＬＡ－エピトープ発見のための生化学的ペプチド－ＭＨＣ結合アッセイは、人工ニューラルネットワークを使用する対立遺伝子特異的予測因子であるＮｅｔＭＨＣのための基礎であった；しかしながら、生化学的ｐ：ＭＨＣ結合アッセイは遅く、低効率な方法である（図１９）。細胞株および患者由来材料からプロファイリングされた内在的にプロセシングされ、提示されたＨＬＡ－リガンドは、一般的には多対立遺伝子であり、これは、これらの試料から生成されるＬＣ－ＭＳ／ＭＳデータが、図１７および図１９に示されるように、複数の同時に発現されるＨＬＡ対立遺伝子の１つに結合することができるリガンドの混合集団を含有することを意味している。多対立遺伝子データセットは、どのペプチドが個体によって提示される異なるＨＬＡヘテロ二量体に結合するかを確認するためにデコンボリューションを必要とする。したがって、多対立遺伝子データセットに由来するリガンドは、（１）元々存在するデータを用いて訓練された結合予測因子または（２）大きいリガンドデータセットで表されるＨＬＡ対立遺伝子にわたって重複を活用するデコンボリューションアルゴリズムを使用して、その対応するＨＬＡヘテロ二量体に割り当てる必要がある。利用可能なＨＬＡタイピング情報を有するＬＣ－ＭＳ／ＭＳデータセットのみを、明確にデコンボリューションすることができることに留意することが重要である。事実、免疫エピトープデータベース（ＩＥＤＢ）における多対立遺伝子研究から報告されたＨＬＡクラスＩ複合体に結合した天然にプロセシングされたリガンドのほぼ４０％が、ＨＬＡタイピング情報の欠如またはデコンボリューション不能性のため、ＨＬＡ対立遺伝子特異的割り当てを欠き、対立遺伝子特異的エピトープ予測のためにこのデータのサブセットを使用するのを困難にする。さらに、デコンボリューションのための十分な注釈付きデー

タがないため、稀なクラスＩ　ＨＬＡヘテロ二量体および多くのクラスＩＩ　ＨＬＡヘテロ二量体に結合したペプチドを識別するのは困難である。多対立遺伝子データ生成手法はまた、そのデコンボリューションが元々存在する知識に依拠するため、新規の結合モチーフの発見を制限する。対立遺伝子特異的エピトープ予測のために多対立遺伝子データセットを使用することに対する注意事項があるが、それらは複数の対立遺伝子の同時発現を必要とするリガンド提示のパターンの決定、およびエピトープ予測アルゴリズムの検証にとって非常に価値がある。

【０１８１】

多対立遺伝子データ生成およびその後のデコンボリューションのための直交手法は、単一のＨＬＡ対立遺伝子によって提示されるペプチド集団が識別される一対立遺伝子データセットの作出である（図１７および図１９）。一対立遺伝子データを生成するための１つの方法は、ＨＬＡ発現が欠損した細胞株を使用する。これらの細胞に、単一のＨＬＡ対立遺伝子をトランスフェクトまたは形質導入することができ、したがって、リガンドをＬＣ－ＭＳ／ＭＳによってプロファイリングして、対立遺伝子特異的リガンドライブラリーを生成することができる。可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）分子に結合したペプチドを、細胞培地から単離し、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによってプロファイリングして、一対立遺伝子データを産生することもできる。一対立遺伝子データセットの主な利点は、それらがデコンボリューションを必要とせず、元々存在するデータなしに明確なペプチド－ＨＬＡ対立遺伝子割り当てを可能にするということである。一対立遺伝子手法はまた、以前に特徴付けられていないＨＬＡ対立遺伝子のためのデータを迅速に提供する－多対立遺伝子データは、十分な重複が大きいデータセット中に存在する場合にのみ行うことができるタスクである。さらに、明確なＨＬＡ－結合割り当てのために予めの知識が必要とされないため、新規ペプチド結合モチーフを、一対立遺伝子系を使用して容易に発見することができる。デコンボリューション方法がそうすることに失敗した場合であっても、一対立遺伝子データを活用して、多対立遺伝子データセットからリガンドを割り当てることができる。

【０１８２】

現在利用可能な一対立遺伝子手法の制限因子は、それがＨＬＡ欠損細胞株を必要とするということである。本開示の重要な革新的特性は、一対立遺伝子データ生成のためにＨＬＡ欠損細胞株が必要とされないということである。本明細書で提供される親和性タグ付き構築物を、内在性ＨＬＡ－ペプチド複合体を提示する任意の細胞株に入れて、親和性タグを使用して目的の対立遺伝子を単離することができる。本開示の別の利点は、試薬が同じ親和性タグを有し、本明細書で開示される方法を拡張できる（自動化できる）という条件で、ライブラリー中の任意のクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子のために同じ試薬を使用することができるということである。一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団に、ペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。一部の実施形態では、疾患または状態は、がんである。一部の実施形態では、細胞集団は、疾患または状態を有する対象に由来する生体試料に由来する。

【０１８３】

一部の実施形態では、方法は、特徴付けるステップの前に親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ペプチドは、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、抗ＨＬＡ抗体を含有するカラムを使用して単離される。

【０１８４】

方法および組成物

ＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付ける方法であって、細胞集団を用意するステップであって、細胞集団の１つまたは複数の細胞が親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含むポリ核酸を含み、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む、ステップ；細胞集団の１つまたは複数の細胞の少なくとも１個の細胞において親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現させ、これにより少なくとも１個の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；およびＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付けるステップを含む方法が本明細書で提供される。

【０１８５】

一部の実施形態では、特徴付けるステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを特徴付けることを含む。一部の実施形態では、方法は、異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のための方法のステップを実行することを含む。一部の実施形態では、方法は、１つを超えるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を使用するステップを含む。一部の実施形態では、細胞集団は、対象（例えば、疾患を有する患者）に由来する。一部の実施形態では、細胞集団は、クラスＩおよび／またはクラスＩＩ陰性細胞株である。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップをさらに含む。

【０１８６】

ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成する方法であって、親和性アクセプターペプチドに作動可能に連結された異なるＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる異なる組換えポリペプチドを含む親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを含む１つまたは複数の細胞をそれぞれ含む第１および第２の細胞集団を用意するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部を特徴付けるステップ；およびＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【０１８７】

一部の実施形態では、富化するステップは、四量体試薬の使用を含まない。

【０１８８】

一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の配列を決定することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、ペプチドまたはその一部が修飾されている（例えば、翻訳後修飾）かどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析を含む。一部の実施形態では、決定するステップは、質量分析を含む。一部の実施形態では、質量分析は、ＭＳ分析、ＭＳ／ＭＳ分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析、またはその組合せである。一部の実施形態では、ＭＳ分析は、インタクトなペプチドの質量を決定するために使用される。例えば、決定するステップは、インタクトなペプチドの質量を決定することを含んでもよい（例えば、ＭＳ分析）。一部の実施形態では、ＭＳ／ＭＳ分析は、ペプチド断片の質量を決定するために使用される。例えば、決定するステップは、ペプチドまたはその一部のアミノ酸配列を決定するために使用することができる、ペプチド断片の質量を決定することを含んでもよい（例えば、ＭＳ／ＭＳ分析）。一部の実施形態では、ペプチド断片の質量は、ペプチド内のアミノ酸の配列を決定するために使用される。一部の実施形態では、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析は、複合体ペプチド混合物を分離するために使用される。例えば、決定するステップは、液体クロマトグラフィーなどにより、複合体ペプチド混合物を分離すること、およびインタクトなペプチドの質量、ペプチド断片の質量、またはその組合せを決定することを含んでもよい（例えば、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析）。このデータを、例えば、ペプチド配列決定のため

に使用することができる。

【０１８９】

一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の結合親和性または安定性を評価することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部が１つまたは複数の変異を含有するかどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、ペプチドまたはその一部が修飾されている（例えば、翻訳後修飾）かどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のペプチドと、ＨＬＡ対立遺伝子との会合を評価することを含む。

【０１９０】

一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団に、ペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。一部の実施形態では、疾患または状態は、がんである。一部の実施形態では、細胞集団は、疾患または状態を有する対象に由来する生体試料に由来する。

【０１９１】

一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、初代細胞の集団である。

【０１９２】

一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を、疾患または状態を有する対象と一致させる。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその変異体を含む抗原提示細胞は、対象に由来するＴ細胞受容体を発現するＴ細胞に対する反応性を有する。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、がん細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体を、非がん細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体と比較することを含む。

【０１９３】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトおよび全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトは、ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子の機能の除去を含む。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトは、遺伝子編集によって達成される。一部の実施形態では、遺伝子編集は、それを必要とする個体に、ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子またはクラスＩＩ対立遺伝子をノックアウトされるように標的化するヌクレアーゼを投与することによって実施される。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質（例えば、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９）、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、またはメガヌクレアーゼである。一部の実施形態では、遺伝子編集は、それを必要とする個体に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を投与することによって達成される。一部の実施形態では、所望の認識部位にニックまたは二本鎖切断を誘導する任意の好適なヌクレアーゼが使用される。一部の実施形態では、天然に存在する、または天然のヌクレアーゼが使用される。一部の実施形態では、改変された、または操作されたヌクレア

ーゼが使用される。

【０１９４】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックダウンである。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックダウンである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックダウンである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックダウンである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックダウンおよび全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子のノックダウンは、ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子の発現の減少を含む。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子またはクラスＩＩ対立遺伝子のノックダウンは、それを必要とする個体に、治療有効量の低分子二本鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、短ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）を投与することによって達成され、ここで、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡは、ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子またはクラスＩＩ対立遺伝子をノックダウンされるように標的化する。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子の発現は、ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子またはクラスＩＩ対立遺伝子がノックダウンされていない場合と比較して、約９９％、約９５％、約９０％、約８５％、約８０％、約７５％、約７０％、約６５％、約６０％、約５５％、約５０％、約４５％、約４０％、約３５％、約３０％、約２５％、または約２０％減少する。

【０１９５】

一部の実施形態では、細胞集団は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）などにより、ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子、ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子、またはその組合せの細胞表面発現のために富化または選別された細胞を含む。一部の実施形態では、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）は、細胞集団を選別するために使用される。一部の実施形態では、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）は、ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子、ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子、またはその組合せの細胞表面発現について細胞集団を選別するために使用される。一部の実施形態では、ＦＡＣＳは、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞を富化または選別するために使用される。

【０１９６】

一部の実施形態では、細胞の集団は、異なる組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をそれぞれ発現する、複数の細胞集団を含む。一部の実施形態では、複数のうちのそれぞれの細胞集団は、別々の容器中にある。

【０１９７】

一部の実施形態では、方法は、特徴付けるステップの前に親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドの末端をトリミングするステップをさらに含む（図１３）。

【０１９８】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態

では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、非古典的クラスＩ－ｂ群である。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される非古典的クラスＩ－ｂ群である。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡクラスＩＩα鎖、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖、またはその組合せを含む。

【０１９９】

一部の実施形態では、異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードするそれぞれの配列は、異なる親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞外で発現される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞内で発現される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。

【０２００】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。

【０２０１】

一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む。

【０２０２】

一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップをさらに含む。

【０２０３】

一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサ

ビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、またはその組合せを含んでもよく；必要に応じて、親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。

【０２０４】

一部の実施形態では、富化するステップは、親和性分子を、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、ここで、親和性分子は、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、親和性分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、固相表面は、ビーズである。

【０２０５】

一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を用いて、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、コードされる組換えクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、富化するステップは、ＨＬＡ－ペプチド複合体の細胞外部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。一部の実施形態では、富化するステップは、ＨＬＡ－ペプチド複合体のＮ末端部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。

【０２０６】

一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団を、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列を含むポリ核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、トランスフェクトまたは形質導入することを含む。一部の実施形態では、準備するステップは、細胞集団を、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列を含むポリ核酸を含むベクターまたはプラスミドと接触させることを含む。一部の実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。

【０２０７】

任意の好適な生化学アッセイを使用して、細胞（例えば、操作された細胞株）中で発現されるＨＬＡを決定することができる。細胞（例えば、操作された細胞株）中で発現されるＨＬＡ対立遺伝子の同一性を決定するための例示的方法としては、例えば、ＨＬＡ対立遺伝子のクラス（クラスＩまたはクラスＩＩ）を決定するためのウェスタンブロット分析、例えば、個々の対立遺伝子を配列決定する（例えば、類似する配列の異なる対立遺伝子の識別のための異なるプライマーを使用する）配列分析が挙げられる。一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子をコードするポリ核酸はバーコード配列を含む。バーコード配列を使用して、細胞中で発現されるＨＬＡ対立遺伝子を識別することができる。一部の実施形態では、バーコード配列は、単一のＨＬＡにとってユニークである。一部の実施形態では、バーコード配列は、単一のＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子にとってユニークである。

【０２０８】
一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列を含むポリ核酸は、細胞集団のゲノム中に安定に組み込まれる。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でβ２ミクログロブリンをコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。

【０２０９】
一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。

【０２１０】
一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、第１の親和性アクセプターペプチドとは異なり、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、またはその組合せを含んでもよい。

【０２１１】
一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピ

ング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【０２１２】

一部の実施形態では、決定するステップは、タンデム質量分析などの質量分析を実施することを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、ペプチドデータベースに由来する富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された１つまたは複数のペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに対応するペプチド配列を取得することを含み、得られた１つまたは複数の配列は、１つまたは複数のペプチドの配列を識別する。

【０２１３】

一部の実施形態では、細胞集団は、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｅｘｐｉ２９３、ＨｅＬａ、Ａ３７５、７２１．２２１、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、Ｊｕｒｋａｔ、ＨｅｐＧ２、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＣＡＣＯ－２、Ｕ９３７、Ｕ－２ＯＳ、ＥｘｐｉＣＨＯ、ＣＨＯおよびＴＨＰ１から選択される細胞株である。一部の実施形態では、細胞株は、１つまたは複数のサイトカイン、チェックポイント阻害剤、エピジェネティック的に活性な薬物、ＩＦＮ－γ、抗原プロセシングを変更する薬剤（例えば、ペプチダーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、およびＴＡＰ阻害剤など）、またはその組合せを用いて処理される。一部の実施形態では、ペプチドデータベースは、改変データベースを含まない、または改変（例えば、リン酸化もしくはシステイン化）データベースを含むものなどの、非酵素特異性ペプチドデータベースである。一部の実施形態では、ペプチドデータベースは、ポリペプチドデータベースである。一部の実施形態では、ポリペプチドデータベースは、タンパク質データベースである。一部の実施形態では、方法は、逆データベース検索戦略を使用してペプチドデータベースを検索するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、逆データベース検索戦略を使用してタンパク質データベースを検索するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ｄｅ　ｎｏｖｏ検索を実施して、例えば、通常のペプチドにもタンパク質データベース中にも含まれない新しいペプチドを発見する。

【０２１４】

一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^5個の細胞、少なくとも10^6個の細胞または少なくとも10^7個の細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、樹状細胞、マクロファージ、がん細胞またはＢ細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、腫瘍細胞または感染性因子によって感染した細胞またはその一部を含む。

【０２１５】

一部の実施形態では、細胞集団を、１つまたは複数の細胞から前記ＨＬＡ－ペプチド複合体を単離する前に薬剤と接触させる。一部の実施形態では、前記薬剤は、炎症性サイトカイン、化学薬剤、アジュバント、治療剤または放射線である。

【０２１６】

一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、変異したＨＬＡ対立遺伝子である。

【０２１７】

一部の実施形態では、方法は、異なるＨＬＡ対立遺伝子のための方法のステップを実行することを含む。

【０２１８】

本明細書に記載の方法を実行することによって得られるＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベースが、本明細書で提供される。各回、異なるＨＬＡ－対立遺伝子を使用して、本明細書に記載の方法を繰り返し実行することによって得られる２つまたはそれより多いＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベースの組合せが、本明細書で提供される。本明細書に記載のペプチド配列データベースを用いてマシンを訓練するステップを含む、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための予測アルゴリズムを生成するための方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、マシンは、１つまたは複数の線形モデル、サポートベクターマシン、決定木およびニューラルネッ

トワークを組み合わせる。

【０２１９】

マシンを訓練することによる予測アルゴリズムの生成は、周知の技術である。マシンの訓練において最も重要なものは、訓練のために使用されるデータベースの品質である。典型的には、マシンは、１つまたは複数の線形モデル、サポートベクターマシン、決定木および／またはニューラルネットワークを組み合わせる。

【０２２０】

一部の実施形態では、マシンまたはアルゴリズムを訓練するために使用される変数は、ペプチド配列、アミノ酸の物理特性、ペプチドの物理特性、細胞内のペプチドの供給源タンパク質の発現レベル、タンパク質安定性、タンパク質翻訳率、ユビキチン化部位、タンパク質分解率、リボソームプロファイリングからの翻訳効率、タンパク質切断性、タンパク質局在化、ＴＡＰ輸送を容易にする宿主タンパク質のモチーフ、自食作用を受ける宿主タンパク質、リボソーム失速を好むモチーフ（例えば、ポリプロリンまたはポリリシン伸長物）、ＮＭＤを好むタンパク質特性（例えば、長い３’ＵＴＲ、最後のエクソン：エクソン接合部の５０ｎｔを超えて上流にある停止コドンおよびペプチド切断性）からなる群から選択される１つまたは複数の変数を含む。

【０２２１】

ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための方法であって、ＨＬＡ－対立遺伝子に関して本明細書に記載の方法を実行することによって得られるペプチド配列データベースを用いて訓練されたマシンを用いて、ペプチドの配列を分析するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、細胞内のペプチドの供給源タンパク質の発現レベルを決定するステップを含み、ここで、供給源タンパク質発現は、マシンによって使用される予測変数である。一部の実施形態では、発現レベルは、供給源タンパク質の量または前記供給源タンパク質をコードするＲＮＡの量を測定することによって決定される。

【０２２２】

親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列をそれぞれ含む第１および第２の組換えポリ核酸を含む組成物であって、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、（ａ）異なる組換えＨＬＡクラスＩα鎖対立遺伝子をコードする配列、（ｂ）親和性アクセプターペプチドをコードする配列、および必要に応じて、（ｃ）β２ミクログロブリンをコードする配列を含み、（ａ）および（ｂ）、ならびに必要に応じて（ｃ）の配列が作動可能に連結される、組成物が本明細書で提供される。

【０２２３】

親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列をそれぞれ含む第１および第２の組換えポリ核酸を含む組成物であって、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、（ａ）組換えＨＬＡクラスＩＩα鎖対立遺伝子をコードする配列、（ｂ）親和性アクセプターペプチドをコードする配列、および必要に応じて、（ｃ）ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含み、（ａ）および（ｂ）、ならびに必要に応じて（ｃ）の配列が作動可能に連結される、組成物が本明細書で提供される。

【０２２４】

一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸は単離される。

【０２２５】

一部の実施形態では、配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、非古典的クラスＩ－ｂ群である。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される非古典的クラスＩ－ｂ群である。

【０２２６】

一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸の両方について、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列の配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸の両方について、親和性アクセプター分子をコードする配列は、異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸の両方について、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列の配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸の両方について、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸の両方について、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸の親和性アクセプターペプチドは異なる。

【０２２７】

一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、またはその組合せを含んでもよく；必要に応じて、親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたは複数の反復を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、親和性分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、コードされる組換えクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸の両方について、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列は、細胞のゲノム中に安定に組み込まれる。一部の実施形態では、β２ミク

ログロブリンをコードする配列またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。

【０２２８】

一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、ＨＡタグを含む。一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、またはその組合せを含んでもよく；必要に応じて、第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【０２２９】

一部の実施形態では、第１および第２の組換えポリ核酸の両方について、β２ミクログロブリンをコードする配列またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによって異なる組換えＨＬＡおよび親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【０２３０】

それぞれ、本明細書に記載の組成物の第１および第２のポリ核酸によってコードされた第１および第２の単離されたポリペプチド分子を含む組成物が、本明細書で提供される。それぞれ、本明細書に記載の組成物の第１および第２のポリ核酸によってコードされた第１および第２のポリペプチド分子を含む第１および第２の細胞を含む組成物が、本明細書で提供される。それぞれ、本明細書に記載の組成物の第１および第２のポリ核酸を含む第１および第２の細胞を含む組成物が、本明細書で提供される。それぞれ、本明細書に記載の組成物の第１および第２のポリ核酸を含む１つまたは複数の細胞を含む第１および第２の細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。

【０２３１】

一部の実施形態では、第１および第２の細胞集団は、１つまたは複数の内在性クラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、第１および第２の細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、第１および第２の細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、第１および第２の細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、第１および第２の細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、第１および第２の細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。

【０２３２】

細胞を作製する方法であって、第１および第２の細胞に、それぞれ、本明細書に記載の組成物の第１および第２のポリ核酸を形質導入するか、またはトランスフェクトするステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【０２３３】

本明細書に記載の方法に従って識別されるペプチドが、本明細書で提供される。

【０２３４】

免疫原性ペプチドを富化する方法であって、組換えＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる組換えＨＬＡに作動可能に連結された親和性アクセプターペプチドを含む親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現する１つまたは複数の細胞を含む細胞集団を用意するステップ；および親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを含むＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された免疫原性ペプチドの配列を決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、決定するステップは、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用することを含む。

【０２３５】

ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）系

免疫系を、２つの機能的な下位系：自然免疫系と適応免疫系に分類することができる。自然免疫系は、感染に対する第１の防衛線であり、ほとんどの潜在的な病原体は、それらが、例えば、顕著な感染を引き起こし得る前に、この系によって迅速に中和される。適応免疫系は、侵入生物の、抗原と呼ばれる分子構造に反応する。自然免疫系と違って、適応免疫系は、病原体に対して高度に特異的である。適応免疫はまた、長期的な防御を提供することができる；例えば、麻疹から回復する人は、今やその生涯にわたって麻疹に対して防御される。液性免疫反応および細胞性免疫反応を含む２つの型の適応免疫反応が存在する。液性免疫反応では、Ｂ細胞によって体液中に分泌される抗体は、病原体由来抗原に結合し、様々な機構、例えば、補体媒介性溶解による病原体の除去をもたらす。細胞性免疫反応では、他の細胞を破壊することができるＴ細胞が活性化される。例えば、疾患と関連するタンパク質が細胞中に存在する場合、それらは細胞内でペプチドにタンパク質分解的に断片化される。次いで、特定の細胞タンパク質は、この様式で形成された抗原またはペプチドにそれ自身で付着し、それらを細胞表面に輸送し、そこで、それらは身体のＴ細胞中の分子防衛機構に提示される。細胞傷害性Ｔ細胞は、これらの抗原を認識し、その抗原を有する細胞を殺傷する。

【０２３６】

用語「主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）」、「ＭＨＣ分子」、または「ＭＨＣタンパク質」とは、タンパク質抗原のタンパク質分解的切断の結果生じるペプチドおよび代表的な潜在的なＴ細胞エピトープに結合し、それらを細胞表面に輸送し、そこで、それらを、例えば、細胞傷害性Ｔリンパ球またはヘルパーＴ細胞中の特定の細胞に提示することができるタンパク質を指す。ヒトＭＨＣはまた、ＨＬＡ複合体とも呼ばれる。したがって、用語「ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）系」、「ＨＬＡ分子」または「ＨＬＡタンパク質」は、ヒトにおけるＭＨＣタンパク質をコードする遺伝子複合体を指す。用語ＭＨＣは、ネズミ種では「Ｈ－２」複合体と呼ばれる。当業者であれば、用語「主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）」、「ＭＨＣ分子」、「ＭＨＣタンパク質」および「ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）系」、

「ＨＬＡ分子」、「ＨＬＡタンパク質」が、本明細書では互換的に使用されることを認識するであろう。

【０２３７】

ＨＬＡタンパク質は、ＨＬＡクラスＩおよびＨＬＡクラスＩＩと呼ばれる、２つの型に分類される。２つのＨＬＡクラスのタンパク質の構造は、非常に類似しているが、それらは非常に異なる機能を有する。クラスＩ　ＨＬＡタンパク質は、ほとんどの腫瘍細胞を含む、身体のほぼ全ての細胞の表面上に存在する。クラスＩ　ＨＬＡタンパク質は、通常は内在性タンパク質または細胞の内部に存在する病原体を起源とする抗原をロードし、次いで、ナイーブな、または細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）に提示される。ＨＬＡクラスＩＩタンパク質は、限定されるものではないが、樹状細胞、Ｂ細胞、およびマクロファージを含む、抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に存在する。それらは主にペプチドを提示し、ペプチドは外部の抗原供給源、すなわち、細胞の外部から、ヘルパーＴ細胞にプロセシングされる。ＨＬＡクラスＩタンパク質によって結合されるペプチドのほとんどは、生物自体の健康な宿主細胞中で産生される細胞質タンパク質を起源とし、通常は免疫反応を刺激しない。

【０２３８】

クラスＩ　ＨＬＡ分子は、重鎖および軽鎖からなり、約７～１３アミノ酸（例えば、約８～１１アミノ酸、または９もしくは１０アミノ酸）のペプチドに結合することができ、このペプチドが好適な結合モチーフを有する場合、それを細胞傷害性Ｔリンパ球に提示することができる。クラスＩ　ＨＬＡ分子により結合されるペプチドは、内在性タンパク質抗原を起源とする。クラスＩのＨＬＡ分子の重鎖は、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＢまたはＨＬＡ－Ｃ単量体であってよく、軽鎖は、β－２ミクログロブリンである。クラスＩ　ＨＬＡは、３つのドメイン－α１、α２、およびα３から構成されるα鎖として存在する。この鎖は、クラスＩ重鎖と呼ばれることが多く、本明細書ではクラスＩアルファ鎖と呼ばれる。α１は、非ＨＬＡ分子β２ミクログロブリン（ヒト第１５染色体上にコードされる）のユニットにある。α３ドメインは膜貫通性であり、ＨＬＡクラスＩ分子を細胞膜に固定している。提示されるペプチドは、α１／α２ヘテロ二量体（２つの非同一サブユニットから構成される分子）の中央領域中の、ペプチド結合溝の床によって保持される。クラスＩ　ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＢまたはＨＬＡ－Ｃは、高度に多型性である。クラスＩｂ　ＨＬＡは、限定された多型性、発現パターンおよび提示抗原を示す。この群は、ＨＬＡ遺伝子座内にコードされる群、例えば、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、ならびに、例えば、ＵＬＢＰ、Ｒａｅ１およびＨ６０などのストレスリガンドではないものに細分される。これらの分子の多くに関する抗原／リガンドは、依然として不明であるが、それらはＣＤ８＋Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、およびＮＫ細胞のそれぞれと相互作用することができる。

【０２３９】

一部の実施形態では、本開示は、非古典的クラスＩ　ＨＬＡ－Ｅ対立遺伝子を使用する。ＨＬＡ－Ｅは、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞によって認識される非古典的クラスＩ分子の１つである。ＨＬＡ－Ｅは、肺、肝臓、皮膚および胎盤細胞を含むほぼ全ての組織中で発現される。ＨＬＡ－Ｅ発現はまた、固形腫瘍（例えば、骨肉腫およびメラノーマ）においても検出される。ＨＬＡ－Ｅは、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上に発現されるＴＣＲに結合し、Ｔ細胞活性化をもたらす。ＨＬＡ－Ｅはまた、ＮＫ細胞およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上に発現されるＣＤ９４／ＮＫＧ２受容体に結合することも知られている。ＣＤ９４は、ＮＫＧ２のいくつかの異なるアイソフォームと対形成して、細胞活性化を阻害する（ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ）か、または促進する（ＮＫＧ２Ｃ）可能性を有する受容体を形成することができる。ＨＬＡ－Ｅは、ほとんどのＨＬＡ－Ａ、－Ｂ、－Ｃ、および－Ｇ分子のリーダー配列のアミノ酸残基３～１１に由来するペプチドに結合することができるが、それ自身のリーダーペプチドに結合することはできない。ＨＬＡ－Ｅはまた、ＨＬＡ－Ａ、－Ｂ、および－Ｃ対立遺伝子と類似する内在性タンパク質に由来するペプチドを提示することが示されている。生理的条件下では、ＣＤ９４／ＮＫＧ２Ａと、ＨＬＡクラスＩリーダー配列に由来するペプチドをロードしたＨＬＡ－Ｅとの係合は通常、阻害的シ

グナルを誘導する。サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）は、ＨＬＡ－Ａリーダーを模倣する、ＵＬ４０糖タンパク質の発現によるＮＫ細胞免疫監視からの逃避のための機構を使用する。しかしながら、ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＣＭＶ　Ｔｏｌｅｄｏ株に由来するＵＬ４０ペプチドをロードしたＨＬＡ－Ｅを認識し、ＣＭＶに対する防衛における役割を果たすことができることも報告されている。いくつかの研究により、感染性疾患およびがんにおけるＨＬＡ－Ｅのいくつかの重要な機能が示された。

【０２４０】

ペプチド抗原は、小胞体内での競合的親和性結合によって、それ自身を、ＨＬＡクラスＩの分子に付着させた後、それらは細胞表面上に提示される。ここで、個々のペプチド抗原の親和性は、そのアミノ酸配列およびアミノ酸配列内の規定の位置における特異的結合モチーフの存在と直接関連する。そのようなペプチドの配列が既知である場合、例えば、ペプチドワクチンを使用して疾患細胞に対して免疫系を操作することができる。

【０２４１】

クラスＩＩ　ＨＬＡ分子は、それぞれの鎖が、ＨＬＡクラスＩＩ分子を細胞膜に固定している、それぞれ、膜貫通ドメインα２およびβ２を有する、それぞれ、２つのドメイン－α１およびα２ならびにβ１およびβ２を有する２つの鎖、αおよびβを有する。ペプチド結合溝は、α１およびβ１のヘテロ二量体から形成される。クラスＩＩのＨＬＡ分子によって結合されるペプチドは、通常、外因性タンパク質抗原の細胞外を起源とする。α鎖およびβ鎖はＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱおよびＨＬＡ－ＤＰ単量体中にある（図１Ｂ）。クラスＩＩ　ＨＬＡ分子は、６つのアイソタイプを有する。古典的分子は、ペプチドをＣＤ４＋リンパ球に提示する。細胞内機能を有する非古典的分子、アクセサリーは、細胞膜上には露出しないが、リソソーム中の内膜中にあり、通常は、抗原性ペプチドを古典的ＨＬＡクラスＩＩ分子上にロードする。

【０２４２】

ＨＬＡクラスＩＩでは、マクロファージおよび未熟樹状細胞などの食細胞は、ファゴソーム中へのファゴサイトーシスにより実体を取り込むが、Ｂ細胞は、酸性酵素が取り込まれたタンパク質を多くの異なるペプチドに切断するリソソームと融合するエンドソーム中でより一般的なエンドサイトーシスを示す。自食作用は、ＨＬＡクラスＩＩペプチドの別の供給源である。宿主のゲノム中にコードされる、宿主によって生まれたＨＬＡクラスＩＩバリアントとの分子相互作用における物理化学動態により、特定のペプチドは免疫優勢を示し、ＨＬＡクラスＩＩ分子上にロードする。これらは、細胞表面上に輸送され、外在化される。最も研究されたサブクラスＩＩ　ＨＬＡ遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＡ、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１である。

【０２４３】

ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞へのＨＬＡクラスＩＩ分子によるペプチドの提示は、外来抗原に対する免疫応答にとって必要である（RocheおよびFuruta、２０１５年）。一度活性化されたら、ＣＤ４＋Ｔ細胞は、Ｂ細胞分化および抗体産生、ならびにＣＤ８＋Ｔ細胞（ＣＴＬ）応答を促進する。ＣＤ４＋Ｔ細胞はまた、他の免疫細胞を活性化し、その分化を誘導するサイトカインおよびケモカインも分泌する。ＨＬＡクラスＩＩ分子は、クラスＩペプチド結合溝よりも開いたペプチド結合溝を形成するように相互作用するαおよびβ鎖のヘテロ二量体である（Unanueら、２０１６年）。ＨＬＡクラスＩＩ分子に結合したペプチドは、溝から突出するＮまたはＣ末端側上の隣接残基を含む９アミノ酸の結合コアを有すると考えられる（Jardetzkyら、１９９６年；Sternら、１９９４年）。これらのペプチドは、通常、１２～１６アミノ酸長であり、結合レジスターのＰ１、Ｐ４、Ｐ６／７およびＰ９位に３～４個のアンカー残基を含有することが多い（Rossjohnら、２０１５年）。

【０２４４】

ＨＬＡ対立遺伝子は、相互顕性様式で発現され、これは、両親から継承した対立遺伝子（バリアント）が同等に発現されることを意味する。例えば、それぞれの人は、３つのクラスＩ遺伝子（ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＢおよびＨＬＡ－Ｃ）のそれぞれの２つの対立遺伝

子を担持し、したがって、６つの異なる型のクラスＩＩ　ＨＬＡを発現することができる。クラスＩＩ　ＨＬＡ遺伝子座では、それぞれの人は、一対のＨＬＡ－ＤＰ遺伝子（αおよびβ鎖をコードする、ＤＰＡ１およびＤＰＢ１）、一組の遺伝子ＨＬＡ－ＤＱ（αおよびβ鎖について、ＤＱＡ１およびＤＱＢ１）、１つのＨＬＡ－ＤＲα遺伝子（ＤＲＡ１）、および１つまたは複数のＨＬＡ－ＤＲβ遺伝子（ＤＲＢ１およびＤＲＢ３、４または５）を継承する。それは、１人のヘテロ接合性個体が、それぞれの親から、６個または８個の機能的クラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子、３つまたはそれより多くを継承することができることを意味する。したがって、ＨＬＡ遺伝子は、高度に多型性である；多くの異なる対立遺伝子が、集団内の異なる個体中に存在する。ＨＬＡタンパク質をコードする遺伝子は、多くの可能な変化を有し、それぞれの人の免疫系が様々な外来侵入物に対して反応することを可能にしている。一部のＨＬＡ遺伝子は、それぞれ特定の番号を与えられる、数百の識別されたバージョン（対立遺伝子）を有する。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１、ＨＬＡ－Ｂ＊１４：０２、ＨＬＡ－Ａ＊２３：０１、ＨＬＡ－Ｅ＊０１：０１（非古典的）である。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊１５：０１、およびＨＬＡ－ＤＲＢ＊０７：０１である。

【０２４５】

対象特異的ＨＬＡ対立遺伝子または対象のＨＬＡ遺伝子型を、当技術分野で公知の任意の方法によって決定することができる。例示的な実施形態では、ＨＬＡ遺伝子型は、ＷＯ２０１５０８５１４７として２０１５年６月１１日に公開された国際特許出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６８７４６に記載された任意の方法によって決定される。簡単に述べると、方法は、配列決定データセットから抽出されたリードと、多型性遺伝子の対立遺伝子バリアントを含む遺伝子参照セットとのアラインメントを生成すること、アラインメントにおけるそれぞれの対立遺伝子バリアントに関する第１の事後確率または事後確率由来スコアを決定すること、最大の第１の事後確率または事後確率由来スコアを有する対立遺伝子バリアントを、第１の対立遺伝子バリアントと識別すること、第１の対立遺伝子バリアントおよび１つまたは複数の他の対立遺伝子バリアントとアラインされた１つまたは複数の重複するリードを識別すること、重み付け係数を使用して１つまたは複数の他の対立遺伝子バリアントに関する第２の事後確率または事後確率由来スコアを決定すること、最大の第２の事後確率または事後確率由来スコアを有する対立遺伝子バリアント、多型性遺伝子に関する遺伝子型を規定する第１および第２の対立遺伝子バリアントを選択することによって第２の対立遺伝子バリアントを識別すること、ならびに第１および第２の対立遺伝子バリアントのアウトプットを用意することを含んでよい、多型性遺伝子型を決定するステップを含む。

【０２４６】

本明細書に記載されるように、変異したエピトープが免疫応答を誘導するのに有効であること、および自発的な腫瘍退縮または長期生存の症例が変異したエピトープに対するＣＤ８＋Ｔ細胞応答と相関すること（BuckwalterおよびSrivastava PK、"It is the antigen(s), stupid" and other lessons from over a decade of vaccitherapy of human cancer. Seminars in immunology ２０巻：２９６～３００頁（２００８年）；Karanikasら、High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival、Cancer Res. ６１巻：３７１８～３７２４頁（２００１年）；Lennerzら、The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens、Proc Natl Acad Sci U S A.１０２巻：１６０１３頁（２００５年））および「免疫編集」を、マウスおよびヒトにおけるドミナント変異抗原の発現における変更に対して追跡することができる（Matsushitaら、Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting、Nature ４８２巻：４００頁

（２０１２年）；DuPageら、Expression of tumor-specific antigens underlies cancer immunoediting、Nature ４８２巻：４０５頁（２０１２年）；およびSampsonら、Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma、J Clin Oncol. ２８巻：４７２２～４７２９頁（２０１０年））という、動物およびヒトの両方における多数の証拠がある。

【０２４７】

配列決定技術は、それぞれの腫瘍が、遺伝子のタンパク質コード内容を変更する複数の患者特異的変異を含有することを示した。そのような変異は、単一のアミノ酸変化（ミスセンス変異により引き起こされる）から、フレームシフト、終止コドンのリードスルーまたはイントロン領域の翻訳（新規オープンリーディングフレーム変異；ｎｅｏＯＲＦ）に起因する新規アミノ酸配列の長い領域の付加までの、変更されたタンパク質を作出する。これらの変異したタンパク質は、天然のタンパク質と違って、それらが自己寛容性の免疫に対する打撃を受けないため、腫瘍に対する宿主の免疫応答のための価値ある標的である。したがって、変異したタンパク質は、患者の正常細胞と比較して、免疫原性である可能性がより高く、また、腫瘍細胞に対してより特異的である。

【０２４８】

用語「Ｔ細胞」は、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。用語Ｔ細胞はまた、１型ヘルパーＴ細胞および２型ヘルパーＴ細胞の両方を含む。本明細書で使用されるＴ細胞は、一般的には、抗原へのＴ細胞受容体結合も容易にする、機能および細胞表面抗原（クラスター分化抗原、またはＣＤ）によって、２つの主なクラス：ヘルパーＴ（T_H）細胞および細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）に分類される。

【０２４９】

成熟ヘルパーＴ（T_H）細胞は、表面タンパク質ＣＤ４を発現し、ＣＤ４＋Ｔ細胞と呼ばれる。Ｔ細胞発生の後、成熟したナイーブなＴ細胞は、胸腺を出発し、リンパ節を含む身体中に広がり始める。ナイーブなＴ細胞は、それらが応答するようにプログラムされた抗原に曝露されたことがないＴ細胞である。全てのＴ細胞と同様、それらはＴ細胞受容体－ＣＤ３複合体を発現する。Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）は、定常領域および可変領域の両方からなる。可変領域は、Ｔ細胞が応答することができる抗原を決定する。ＣＤ４＋Ｔ細胞は、クラスＩＩ　ＭＨＣに対する親和性を有するＴＣＲを有し、ＣＤ４は胸腺における成熟中のＭＨＣ親和性の決定に関与する。クラスＩＩ　ＭＨＣタンパク質は、一般的には、特殊な抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面上にのみ見出される。特殊な抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、主に樹状細胞、マクロファージおよびＢ細胞であるが、樹状細胞は、ＭＨＣクラスＩＩを構成的に（常に）発現する唯一の細胞群である。濾胞樹状細胞などの、一部のＡＰＣはまた、その表面上でナイーブな（またはプロセシングされていない）抗原に結合するが、プロセシングされていない抗原は、Ｔ細胞と相互作用せず、その活性化に関与しない。ＭＨＣクラスＩタンパク質に結合するペプチド抗原は、典型的には、ＭＨＣクラスＩＩタンパク質に結合するペプチド抗原よりも短い。

【０２５０】

細胞傷害性Ｔ細胞、細胞溶解性Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞、またはキラーＴ細胞としても知られる、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）とは、標的化された細胞においてアポトーシスを誘導するリンパ球を指す。ＣＴＬは、標的細胞表面上でのＴＣＲとプロセシングされた抗原（Ａｇ）との相互作用によって、標的細胞との抗原特異的コンジュゲートを形成し、標的化された細胞のアポトーシスをもたらす。アポトーシス体は、マクロファージによって除去される。用語「ＣＴＬ応答」は、ＣＴＬ細胞により媒介される一次免疫応答を指すために使用される。細胞傷害性Ｔリンパ球は、その表面上にＴ細胞受容体（ＴＣＲ）およびＣＤ８分子の両方を有する。Ｔ細胞受容体は、ＨＬＡクラスＩの分子と複合体化したペプチドを認識し、これに結合することができる。それぞれの細胞傷害性Ｔリンパ球は、特定のＭＨＣ／ペプチド複合体に結合することができるユニークなＴ細胞受容体を発現する。ほとんどの細胞傷害性Ｔ細胞は、特定の抗原を認識することができるＴ細胞受容体（

ＴＣＲ）を発現する。ＴＣＲがクラスＩ　ＭＨＣ分子に結合するためには、前者はクラスＩ　ＭＨＣ分子の定常部分に結合する、ＣＤ８と呼ばれる糖タンパク質を伴わなければならない。したがって、これらのＴ細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞と呼ばれる。ＣＤ８とＭＨＣ分子との親和性は、抗原特異的活性化の間にＴ細胞および標的細胞を一緒に密接に結合したままにする。ＣＤ８＋Ｔ細胞は、一度、それらが活性化されるようになったら、Ｔ細胞として認識され、一般的には、免疫系内で所定の細胞傷害的役割を有すると分類される。しかしながら、ＣＤ８＋Ｔ細胞はまた、一部のサイトカインを作る能力を有する。

【０２５１】

「Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）」は、抗原の提示に応答してＴ細胞の活性化に関与する細胞表面受容体である。ＴＣＲは、一般的には、集合してヘテロ二量体を形成し、ＣＤ３形質導入サブユニットと会合して、細胞表面上に存在するＴ細胞受容体複合体を形成する、２つの鎖、アルファおよびベータから作られる。ＴＣＲのそれぞれのアルファおよびベータ鎖は、免疫グロブリン様Ｎ末端可変（Ｖ）および定常（Ｃ）領域、疎水性膜貫通ドメイン、ならびに短い細胞質領域からなる。免疫グロブリン分子に関しては、アルファおよびベータ鎖の可変領域は、Ｔ細胞集団内で抗原特異性の大きな多様性を作出する、Ｖ（Ｄ）Ｊ組換えによって生成される。しかしながら、インタクトな抗原を認識する免疫グロブリンとは対照的に、Ｔ細胞は、ＭＨＣ分子と会合するプロセシングされたペプチド断片によって活性化され、ＭＨＣ制限として知られる、Ｔ細胞による抗原認識に追加の次元を導入する。Ｔ細胞受容体によるドナーとレシピエントとのＭＨＣの認識の格差は、Ｔ細胞増殖およびＧＶＨＤ発症の可能性をもたらす。ＴＣＲの正常な表面発現は、複合体の７種全部の成分の協調的な合成および集合に依存することが示された（AshwellおよびKlusner、１９９０年）。ＴＣＲαまたはＴＣＲβの不活化は、同種抗原の認識を防止するＴ細胞の表面からのＴＣＲの除去、したがって、ＧＶＨＤをもたらし得る。しかしながら、ＴＣＲの破壊は、一般的には、ＣＤ３シグナル伝達成分の除去をもたらし、さらなるＴ細胞拡大増殖の手段を変更する。

【０２５２】

用語「ＨＬＡペプチドーム」とは、特定のＨＬＡクラスと特異的に相互作用し、数千個の異なる配列を包含してもよい、ペプチドのプールを指す。ＨＬＡペプチドームは、細胞中で発現される正常タンパク質および異常タンパク質の両方に由来する多様なペプチドを含む。したがって、ＨＬＡペプチドームを、腫瘍免疫治療薬の開発のため、ならびにがん細胞内でのタンパク質合成および分解スキームに関する情報の供給源として、がん特異的ペプチドを識別するために研究することができる。一部の実施形態では、ＨＬＡペプチドームは、可溶性ＨＬＡ分子（ｓＨＬＡ）のプールである。一部の実施形態では、ＨＬＡペプチドームは、膜ＨＬＡ（ｍＨＬＡ）のプールである。

【０２５３】

用語「抗原提示細胞」または「ＡＰＣ」は、専門的な抗原提示細胞（例えば、Ｂリンパ球、マクロファージ、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞）、ならびに他の抗原提示細胞（例えば、ケラチノサイト、内皮細胞、星状細胞、線維芽細胞、乏突起膠細胞、胸腺上皮細胞、甲状腺上皮細胞、グリア細胞（脳）、膵臓ベータ細胞、および血管内皮細胞）を含む。「抗原提示細胞」または「ＡＰＣ」は、主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）分子を発現し、その表面上のＭＨＣと複合体化した外来抗原を展示することができる細胞である。

【０２５４】

ユニバーサルＩＰパイプライン：ユニバーサル一対立遺伝子ＨＬＡ－ペプチド複合体識別プラットフォーム

適応免疫応答は、部分的には、細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞が、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）クラスＩ分子に結合した疾患関連抗原を展示する細胞を識別および除去する能力に依拠する。ＨＬＡクラスＩタンパク質（ＨＬＡ－Ａ、ＢおよびＣ）は、ヒト体内のほぼ全ての有核細胞の表面上に発現され、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞受容体による検出のための短いペプチドの提示にとって必要である。ＨＬＡに結合したペプチドは、ＨＬＡクラスＩタンパク質によるローディングおよび展示の前にプロテアソームおよびＥＲペプチダーゼにより切断され

る内在性または外来タンパク質から生じる。ＨＬＡ遺伝子は、ヒト集団間で最も多型性の遺伝子であり、現在まで、１０，０００個を超えるＨＬＡクラスＩ対立遺伝子バリアントが識別されている（Robinsonら、２０１５年）。それぞれのＨＬＡ対立遺伝子は、約１，０００～１０，０００個のユニークなペプチド；ヒトタンパク質をコードする遺伝子に由来する約１０００万個の潜在的な９マーのペプチドの０．１％以下に結合し、Ｔ細胞に提示すると推定される（Bassani-Sternbergら、２０１５年；Huntら、１９９２年；Rammenseeら、１９９５年、１９９９年；Rockら、；Vitaら、２０１５年；Walzら、２０１５年）。

【０２５５】

クラスＩと違って、ＨＬＡクラスＩＩタンパク質（ＨＬＡ－ＤＲ、ＤＱおよびＤＰ）は、炎症シグナルに応答して抗原提示細胞（ＡＰＣ）ならびに上皮、血管および結合組織細胞の表面上でのみ発現される。外因性タンパク質に由来することが最も多いタンパク質の、ＨＬＡクラスＩＩ分子によるＣＤ４＋Ｔ細胞への提示は、外来抗原に対する免疫応答にとって必要である（RocheおよびFuruta、２０１５年）。一度活性化されたら、ＣＤ４＋Ｔ細胞は、Ｂ細胞分化および抗体産生、ならびにＣＤ８＋Ｔ細胞応答を促進する。ＣＤ４＋Ｔ細胞はまた、他の免疫細胞を活性化し、その分化を誘導するサイトカインおよびケモカインを分泌する。ＨＬＡクラスＩＩ分子は、クラスＩペプチド結合溝よりも開いたペプチド結合溝を形成するように相互作用するαおよびβ鎖のヘテロ二量体である（Unanueら、２０１６年）。ＨＬＡクラスＩＩ分子に結合したペプチドは、溝から突出するＮまたはＣ末端側の隣接する残基を含む９アミノ酸の結合コアを有すると考えられる（Jardetzkyら、１９９６年；Sternら、１９９４年）。これらのペプチドは、通常、１２～１６アミノ酸長であり、結合レジスターのＰ１、Ｐ４、Ｐ６／７およびＰ９位に３～４個のアンカー残基を含有することが多い（Rossjohnら、２０１５年）。αおよびβ鎖の対形成の不均一性、コア結合エピトープを明確に割り当てる能力を制限するデータの複雑性、および高分解能生化学分析にとって必要とされる免疫沈降グレードの対立遺伝子特異的抗体の欠如のため、ＨＬＡクラスＩＩ分子の対立遺伝子特異的ペプチド結合特徴に関してはあまり知られていない。

【０２５６】

ペプチド結合規則は、ＨＬＡ対立遺伝子のサブセットについて広範囲に研究されており（Vitaら、２０１５年）、結合を予測する進化したニューラルネットワークに基づくアルゴリズムにコードされている（Hoofら、２００９年；Lundegaardら、２００８年）。しかしながら、いくつかの因子が、ＨＬＡ対立遺伝子上に提示されるペプチドを予測する力を制限する。第１に、これらのアルゴリズムが訓練されるペプチドデータの起源は多様であり、ペプチドライブラリースクリーニングから、内在的にプロセシングされ、提示されたペプチドのエドマン分解および質量分析に基づく配列決定までの範囲である（Boenら、２０００年；Rammenseeら、１９９５年、１９９９年；Vitaら、２０１５年）。質量分析に基づくペプチド識別は、ＩＥＤＢにおける全識別の約３０％を占める。質量分析は、Donald F. Huntおよび同僚によるパイオニア研究（Cobboldら、２０１３年；Huntら、１９９２年；Meadowsら、１９９７年；Mohammedら、２００８年；Zarlingら、２０００年、２００６年）、ならびに過去２０年にわたって多くのグループによって示された機器の改良（Bassani-Sternbergら、２０１５年；Caronら、２０１５年；Mommenら、２０１４年）のため、ＨＬＡ会合ペプチド配列決定の望ましい方法になっている。第２に、多くの既存の予測アルゴリズムは、結合の予測に焦点を当ててきたが、結合の前にペプチドを生成し、輸送する内在性プロセスを完全には考慮に入れられていない（Larsenら、２００７年）。第３に、多くのＨＬＡ対立遺伝子に関する結合ペプチドの数が、信頼できる予測因子を開発するには小さすぎる。しかしながら、現在まで、高品質の資源データセットの生成は、法外に大量のインプット細胞材料を必要とする不十分なプロトコールおよびＨＬＡ－ペプチド配列決定のためのデータベース検索ツールの欠如によって阻害されてきた（Caronら、２０１５年；Hoofら、２００９年；Lundegaardら、２００８年；Vitaら、２０１５年）。

【０２５７】
生きた細胞および細胞溶解物からのペプチド－ＨＬＡクラスＩおよびＩＩ複合体のためのユニークな生化学的富化戦略が、本明細書で開示される。Ｎ末端またはＣ末端タグ配列（例えば、ＢＡＰまたはＨＡ）を含有するＨＬＡ分子を、細胞表面上で、または細胞溶解物中で標識することができる。例えば、Ｎ末端またはＣ末端ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）配列を含有するＨＬＡ分子を、細胞表面上で、または細胞溶解物中で、ビオチンで酵素的に標識することができる。例えば、Ｎ末端またはＣ末端ＨＡ配列を含有するＨＬＡ分子を、ＨＡ特異的抗体を使用して複雑な細胞混合物から富化することができる。例示的な実施形態では、ビオチン標識されたＨＬＡ－ペプチド複合体は、ストレプトアビジン／ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎビーズを使用して複雑な細胞混合物から富化され、富化されたＨＬＡ－ペプチド複合体は、分析されるか、または特徴付けられる。例示的な実施形態では、ＨＡ標識されたＨＬＡ－ペプチド複合体は、ＨＡ特異的抗体を使用して複雑な細胞混合物から富化され、富化されたＨＬＡ－ペプチド複合体は、分析されるか、または特徴付けられる。例えば、会合したペプチドを溶出させ、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって配列決定することができる。重要なことに、本明細書で開示される方法は、ＨＬＡ－ペプチド複合体を分析する、および特徴付けるためのユニバーサルプラットフォームを提供する。例えば、本明細書で開示される方法は、全ての可能なクラスＩまたはクラスＩＩ構築物を発現する細胞株からの内在的に提示されるペプチドの識別のためのユニバーサルプラットフォームを提供する。

【０２５８】
一義的なペプチド：対立遺伝子割り当てを可能にする単一のＨＬＡクラスＩおよびクラスＩＩ対立遺伝子を発現する細胞株が、本明細書で開示される（ShimizuおよびDeMars、１９８９年；Shimizuら、１９８６年）。ほとんどのＭＳに基づく研究は、親和性予測および時には、対立遺伝子割り当てのためのデコンボリューションを必要とする、複数のＨＬＡ－Ａ、ＢおよびＣ分子に結合したリガンドの乱雑な混合物を溶出し、配列決定することを含むため、これは現在のＨＬＡに結合したペプチドの検出方法に対する改良である（Bassani-SternbergおよびGfeller、２０１６年）。可溶性ＨＬＡをトランスフェクトされた細胞株を用いる研究は、単一のＨＬＡ対立遺伝子のためのペプチド結合エピトープを誘導することができたが、今までのほとんどの包括的実験は、２００個未満のユニークなペプチドしか識別できず、数桁規模でより多くの出発細胞材料を必要としてきた（Hawkinsら、２００８年）。ペプチド：ＨＬＡ割り当ての不確実性を取り除くことによって、本明細書で開示される方法は、以前の努力よりも少ない細胞材料を使用した、ＨＬＡ－ペプチドリガンドームならびにペプチド抗原のプロセシングおよび提示と関連する規則のより深く、より正確な評価を容易にする。

【０２５９】
本明細書に記載の方法および組成物は、例えば、エピトープマッピングの改良を可能にする、細胞によって提示されるクラスＩＩ　ＨＬＡヘテロ二量体間を区別するための化学的に標識された可変的β鎖（ビオチン化）を含む。ＮまたはＣ末端に、ビオチンアクセプターペプチド配列（ＢＡＰ）などのタグを含有するＨＬＡクラスＩおよびクラスＩＩ構築物を、本明細書に記載の方法において使用することができる。ＮおよびＣ末端親和性タグ付けは、内在性ＨＬＡを発現する細胞からのＨＬＡ－対立遺伝子選択的免疫精製を可能にする。Ｎ末端親和性タグ付けは、細胞表面上に提示された複合体のＨＬＡ－対立遺伝子選択的免疫精製を可能にする。例えば、トランスフェクションまたは形質導入の後、Ｎ末端ビオチン化は、細胞表面上に提示されたＨＬＡ複合体と、細胞溶解物中の全てのＨＬＡ－ペプチド複合体との区別を可能にする。例えば、インタクトな細胞表面（溶解なし）上でのＨＬＡ－ペプチド複合体のビオチン化は、内在的にプロセシングされ、提示されるペプチドの偏りのない質量分析（ＭＳ）配列決定法を可能にする。免疫沈降富化方法などの、本明細書に開示の富化方法は、細胞試料の高効率分析を可能にする。

【０２６０】
ＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付ける方法であって、細胞集団を用意するステップであ

って、細胞集団の１つまたは複数の細胞が親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含むポリ核酸を含み、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む、ステップ；細胞集団の１つまたは複数の細胞の少なくとも１個の細胞において親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現させ、これにより少なくとも１個の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；およびＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付けるステップを含む方法が本明細書で提供される。

【０２６１】

一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドを特徴付けることを含む。

【０２６２】

一部の実施形態では、方法は、２つまたはそれより多いクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のための方法のステップを実行することを含む。一部の実施形態では、２つまたはそれより多いクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０個のクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を含む。

【０２６３】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、排出されない。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、発現された場合、細胞膜中に組み込まれる。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体ではない。

【０２６４】

一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップをさらに含む。

【０２６５】

一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、単一の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。

【０２６６】

一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプターペプチドに作動可能に連結された異なるＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる異なる組換えポリペプチドを含む親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを含む１つまたは複数の細胞をそれぞれ含む細胞集団を用意するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；および富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部を特徴付けるステップを含む。

【０２６７】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数のペプチドを、細胞集団に導入するステップを含む。

【０２６８】

一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つもしくは複数のペプチドと接触させること、または細胞集団中で１つもしくは複数のペプチドを発現させることを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＤＮＡである。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＲＮＡであり

、必要に応じて、ＲＮＡはｍＲＮＡである。
【０２６９】
一部の実施形態では、富化するステップは、四量体試薬の使用を含まない。
【０２７０】
一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の配列を決定すること、必要に応じて、ペプチドまたはその一部が改変されるかどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析、質量分析、ＭＳ分析、ＭＳ／ＭＳ分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の結合親和性または安定性を評価することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部が１つまたは複数の変異を含有するかどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体中でのペプチドとＨＬＡ分子との会合を評価することを含む。
【０２７１】
一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団にペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。一部の実施形態では、疾患または状態は、がん、感染性因子による感染、または自己免疫反応である。一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞中に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－ペプチド複合体に由来する１つまたは複数のペプチドを特徴付けるステップを含み、必要に応じて、ペプチドは、感染性因子の１つまたは複数の標的タンパク質に由来する。一部の実施形態では、方法は、感染性因子の１つまたは複数の標的タンパク質に由来するペプチドの１つまたは複数の領域を特徴付けるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、感染性因子に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップを含む。
【０２７２】
一部の実施形態では、細胞集団は、疾患または状態を有する対象に由来する生体試料に由来する。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、初代細胞の集団である。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩＨＬＡ対立遺伝子を、疾患または状態を有する対象に一致させる。
【０２７３】
一部の実施形態では、方法は、薬物（例えば、バイオ医薬品）の過敏性についてスクリーニングするステップを含む。一部の実施形態では、方法は、投与されたバイオ医薬品（例えば、タンパク質、ペプチドまたは抗体薬）、投与されたバイオ医薬品の断片、またはプロセシングされたバイオ医薬品断片が、Ｔ細胞に提示されるかどうかを評価するステップを含む。これらのエピトープは、対象において有害な効果を引き起こすことがあり、したがって、投与されたバイオ医薬品が対象においてどのようにプロセシングされるかをモニタリングするべきである。例えば、ＨＩＶ薬（例えば、Ａｂａｃａｖｉｒ）は、ＨＬＡ分子に結合し、ある特定のＨＬＡ対立遺伝子（例えば、ＨＬＡ－Ｂ５７０１）に関するペプチド結合モチーフを変化させることができる。
【０２７４】
一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドは、抗原提示細胞によって提示された場合、対象に由来するＴ細胞を活性化する

ことができる。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、がん細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体を、非がん細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体と比較することを含む。

【０２７５】

一部の実施形態では、細胞集団は、それぞれの細胞集団が、異なる組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を発現する、複数の細胞集団を含む。一部の実施形態では、複数のうちのそれぞれの細胞集団は、同じか、または別々の容器中にある。

【０２７６】

一部の実施形態では、方法は、特徴付けるステップの前に、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドの末端から１つまたは複数のアミノ酸を除去するステップをさらに含む。

【０２７７】

一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。

【０２７８】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトおよび全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡクラスＩＩα鎖、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖、またはその組合せを含む。

【０２７９】

一部の実施形態では、それぞれの配列は、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、それぞれ、異なる親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、それぞれ、親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結される。

【０２８０】

一部の実施形態では、方法は、同じか、または異なる親和性アクセプターペプチドに作動可能に連結された異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む少なくとも第２のポリ核酸を投与するステップを含む。

【０２８１】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。

【０２８２】

一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞外で発現される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞内で発現される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。

【０２８３】

一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に細胞を溶解するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップをさらに含む。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチド結合分子を親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、親和性アクセプターペプチド結合分子は、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する。

【０２８４】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、またはその組合せを含むタグ配列を含み、必要に応じて、親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは親和性アクセプターペプチドに特

異的な抗体である。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性分子を親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、親和性分子は、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、親和性分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、固相表面は、ビーズである。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を用いて、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、コードされる組換えクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、富化するステップは、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。一部の実施形態では、富化するステップは、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。

【０２８５】

一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、トランスフェクトまたは形質導入することを含む。一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸を含むベクターと接触させることを含む。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ポリ核酸は、細胞集団のゲノム中に安定に組み込まれる。

【０２８６】

一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でβ２ミクログロブリンをコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。

【０２８７】

一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、第１の親和性アクセプターペプチドと異なり、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ

）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せからなる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【０２８８】

一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【０２８９】

一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析またはタンデム質量分析などの質量分析を実施することを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、ペプチドデータベースに由来する富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された１つまたは複数のペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに対応するペプチド配列を取得することを含み、得られた１つまたは複数の配列は、１つまたは複数のペプチドの配列を識別する。

【０２９０】

一部の実施形態では、細胞集団は、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｅｘｐｉ２９３、ＨｅＬａ、Ａ３７５、７２１．２２１、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、Ｊｕｒｋａｔ、ＨｅｐＧ２、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＣＡＣＯ－２、Ｕ９３７、Ｕ－２　ＯＳ、ＥｘｐｉＣＨＯ、ＣＨＯおよびＴＨＰ１から選択される細胞株である。一部の実施形態では、細胞株は、１つまたは複数のサイトカイン、チェックポイント阻害剤、エピジェネティック的に活性な薬物、ＩＦＮ－γ、抗原プロセシングを変更する薬剤（ペプチダーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、およびＴＡＰ阻害剤など）、またはその組合せを用いて処理される。

【０２９１】

一部の実施形態では、ペプチドデータベースは、改変データベースを含まない、または改変データベースを含むものなどの、非酵素特異性ペプチドデータベースである。一部の実施形態では、方法は、逆データベース検索戦略を使用してペプチドデータベースを検索するステップをさらに含む。

【０２９２】

一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^5個の細胞、少なくとも10^6個の細胞または少なくとも10^7個の細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、樹状細胞、マクロファージ、がん細胞またはＢ細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、腫瘍細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団を、１つまたは複数の細胞から前記ＨＬＡ－ペプチド複合体を単離する前に、薬剤と接触させる。一部の実施形態では、前

記薬剤は、炎症性サイトカイン、化学薬剤、アジュバント、治療剤または放射線である。
【０２９３】
一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、変異したＨＬＡ対立遺伝子である。
【０２９４】
一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、バーコード配列を含む。一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩＨＬＡ対立遺伝子の発現についてアッセイするステップをさらに含む。一部の実施形態では、アッセイするステップは、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩＨＬＡ対立遺伝子を配列決定すること、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子ＲＮＡを検出すること、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子タンパク質を検出すること、またはその組合せを含む。
【０２９５】
一部の実施形態では、方法は、異なるＨＬＡ対立遺伝子のための方法のステップを実行することを含む。一部の実施形態では、それぞれ異なるＨＬＡ対立遺伝子は、ユニークなバーコード配列を含む。一部の実施形態では、異なるＨＬＡ対立遺伝子をコードするそれぞれのポリ核酸は、ユニークなバーコード配列を含む。
【０２９６】
本明細書に記載の方法を実行することによって得られるＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベースが、本明細書で提供される。毎回、異なるＨＬＡ－対立遺伝子を使用して、本明細書に記載の方法を反復的に実行することによって得られる２つまたはそれより多いＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベースの組合せが、本明細書で提供される。本明細書に記載のペプチド配列データベースまたは本明細書に記載の組合せを用いてマシンを訓練するステップを含む、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための予測アルゴリズムを生成するための方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、マシンは、１つまたは複数の線形モデル、サポートベクターマシン、決定木およびニューラルネットワークを組み合わせる。一部の実施形態では、マシンを訓練するために使用される変数は、ペプチド配列、アミノ酸の物理特性、ペプチドの物理特性、細胞内のペプチドの供給源タンパク質の発現レベル、タンパク質安定性、タンパク質翻訳率、ユビキチン化部位、タンパク質分解率、リボソームプロファイリングからの翻訳効率、タンパク質切断性、タンパク質局在化、ＴＡＰ輸送を容易にする宿主タンパク質のモチーフ、自食作用を受ける宿主タンパク質、リボソーム失速を好むモチーフ、およびＮＭＤを好むタンパク質特性からなる群から選択される１つまたは複数の変数を含む。一部の実施形態では、リボソーム失速を好むモチーフは、ポリプロリンまたはポリリシン伸長物を含む。一部の実施形態では、ＮＭＤを好むタンパク質特性は、長い３’ＵＴＲ、最後のエクソン：エクソン接合部の５０ｎｔを超えて上流にある停止コドン、およびペプチド切断性からなる群から選択される。ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための方法であって、ＨＬＡ－対立遺伝子に関して本明細書に記載の方法を実行することによって得られるペプチド配列データベースを用いて訓練されたマシンを用いて、ペプチドの配列を分析するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、細胞内のペプチドの供給源タンパク質の発現レベルを決定するステップを含み、ここで、供給源タンパク質発現は、マシンによって使用される予測変数である。一部の実施形態では、発現レベルは、供給源タンパク質の量または前記供給源タンパク質をコードするＲＮＡの量を測定することによって決定される。
【０２９７】
親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをそれぞれコードする２つまたはそれより多い配列を含む組換えポリ核酸を含む組成物であって、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、（ａ）異なる組換えＨＬＡクラスＩα鎖対立遺伝子をコードする配列、（ｂ）親和性アクセプターペプチドをコードする配列、および必要に応じて、（ｃ）β２ミクログロブリンをコードする配列を含み、（ａ）および（ｂ）、ならびに必要に応じて（

ｃ）の配列が、作動可能に連結される、組成物が本明細書で提供される。

【０２９８】

親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列をそれぞれ含む２つまたはそれより多い配列を含む組換えポリ核酸を含む組成物であって、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、（ａ）組換えＨＬＡクラスＩＩα鎖対立遺伝子をコードする配列、（ｂ）親和性アクセプターペプチドをコードする配列、および必要に応じて、（ｃ）ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含み、（ａ）および（ｂ）、ならびに必要に応じて（ｃ）の配列が、作動可能に連結される、組成物が本明細書で提供される。一部の実施形態では、組換えポリ核酸は、単離される。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。

【０２９９】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプター分子をコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。

【０３００】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。

【０３０１】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、同じポリヌクレオチドから発現される。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、異なるポリヌクレオチドから発現される。

【０３０２】

一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。

【０３０３】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、２つまたはそれより多い親和性アクセプターペプチドを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする３つまたはそれより多い配列を含み、ここで、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする３つまたはそれより多い配列のうちの少なくとも２つは、同じ親和性アクセプターペプチドを含む。一部の実施形態では、２つまたはそれより多い親和性アクセプターペプチドは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列のそれぞれについてユニークである。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢ

Ｄ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せからなる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、親和性分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、組換えクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。

【０３０４】

一部の実施形態では、組換えポリ核酸の２つまたはそれより多くについて、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列は、細胞のゲノム中に安定に組み込まれる。

【０３０５】

一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、ＨＡタグを含む。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによって組換えＨＬＡおよび親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【０３０６】

本明細書に記載の組成物のポリ核酸によってコードされる２つまたはそれより多い単離されたポリペプチド分子を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物のポリ核酸によってコードされる２つまたはそれより多いポリペプチド分子を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物を含む１つまたは複数の細胞を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。

【０３０７】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性クラスＩまたはクラスＩＩＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される

。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。

一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。一部の実施形態では、組成物は、患者のＨＬＡ型に特異的なペプチドまたはペプチドをコードするポリ核酸を使用して製剤化される。

【０３０８】

細胞を作製する方法であって、２つまたはそれより多い細胞に、本明細書に記載の組成物の２つまたはそれより多いポリ核酸を形質導入するか、またはトランスフェクトするステップを含む方法が、本明細書で提供される。本明細書に記載の方法に従って識別されるペプチドが、本明細書で提供される。

【０３０９】

哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、細胞は、ＨＬＡ－ペプチド複合体としてペプチドを提示する。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【０３１０】

一部の実施形態では、免疫応答は、Ｔ細胞免疫応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、ＣＤ８　Ｔ細胞応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、ＣＤ４　Ｔ細胞応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、液性免疫応答である。

【０３１１】

疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【０３１２】

一部の実施形態では、疾患は、がんである。一部の実施形態では、疾患は、感染性因子

による感染である。一部の実施形態では、感染性因子は、病原体、必要に応じて、ウイルスまたは細菌、または寄生虫である。一部の実施形態では、ウイルスは、ＢＫウイルス（ＢＫＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３、ＤＥＮＶ－４、ＤＥＮＶ－５）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトＴ細胞リンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ－１）、インフルエンザウイルス、ＲＳＶ、ＨＰＶ、狂犬病、流行性耳下腺炎、風疹ウイルス、ポリオウイルス、黄熱、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ロタウイルス、水痘ウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、天然痘、帯状疱疹、およびその任意の組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、細菌は、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ ｗｈｉｐｐｌｅｉ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、腸チフス、肺炎球菌、髄膜炎菌、ヘモフィルスＢ、炭疽菌、破傷風トキソイド、Ｂ群髄膜炎菌、ｂｃｇ、コレラ、およびその任意の組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、寄生虫は、寄生蠕虫または原生動物である。一部の実施形態では、寄生虫は、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐｐ．、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｓｐｐ．、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ、Ａｓｃａｒｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ、Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ ｔｒｉｃｈｉｕｒａ、Ｎｅｃａｔｏｒ ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｓｐｐ．、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【０３１３】

免疫原性ペプチドを富化する方法であって、組換えＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる組換えＨＬＡに作動可能に連結された親和性アクセプターペプチドを含む親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現する１つまたは複数の細胞を含む細胞集団を用意するステップ；および親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを含むＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された免疫原性ペプチドの配列を決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、決定するステップは、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用することを含む。

【０３１４】

対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を含む細胞を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。

【０３１５】

ＨＬＡ－ペプチド複合体の富化

ＨＬＡクラスＩおよびクラスＩＩ糖タンパク質をコードする遺伝子は、ヒトゲノム中で最も多型性のコード配列である。しかしながら、いずれかのＨＬＡクラスＩ重鎖またはＨＬＡクラスＩＩαもしくはβ鎖を選択的に捕捉する抗体によって標的化され得るＨＬＡクラスＩ重鎖ならびにＨＬＡクラスＩＩαおよびβ鎖のそれぞれに関する比較的定常的な、または非可変性の領域が存在する。しかしながら、αおよびβ鎖は通常、ｉｎ ｖｉｖｏで互いに会合するため、インタクトな可溶性ＨＬＡのα鎖の免疫精製は、β鎖を同時に沈降させ得る、およびその逆である。ＨＬＡに会合したポリペプチドを富化するための抗ＨＬＡクラスＩＩ抗体は、αまたはβ鎖のいずれかに提示される保存されたエピトープを認識することができる。

【０３１６】

ＨＬＡ対立遺伝子特異的抗体を用いるか、または非ＨＬＡ特異的試薬を使用する富化方法は、当技術分野で周知である。例えば、ＨＬＡ－Ｃポリペプチドは、典型的には、ＨＬＡ－ＡおよびＨＬＡ－Ｂよりも低レベルで個体によって発現される。したがって、抗体を使用してＨＬＡ－Ｃの検出を増強するためには、他の精製方法に加えて、ＨＬＡ－Ｃ特異的抗体を使用するＨＬＡ－Ｃの特異的免疫精製を提供することが有利であり得る。個々のＨＬＡ鎖に特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体の多数の例が、商業的に入手可能である。

【０３１７】

１つまたは複数の単一の対立遺伝子ＨＬＡポリペプチド複合体を富化するためのユニバーサル免疫精製（ＩＰ）パイプラインが、本明細書で提供される。ＨＬＡ－会合ポリペプチドを富化するためのそのような方法の例は、免疫精製ステップを含む方法である。ユニバーサルＩＰパイプラインは、細胞トランスフェクションまたは形質導入により発現ベクターから発現される親和性タグ付きＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子をコードするＤＮＡ構築物からなるユニバーサルＩＰ構築物を含む。

【０３１８】

ユニバーサルＩＰ構築物をトランスフェクトまたは形質導入された細胞を、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ配列分析の前に、拡大増殖させるか、または選択した後、拡大増殖させた。トランスフェクションまたは形質導入のための好適な細胞集団としては、例えば、単一のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子が発現されるクラスＩ欠損細胞株、一対のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子が発現されるクラスＩＩ欠損細胞株、または単一のＨＬＡクラスＩおよび／もしくは一対のクラスＩＩ対立遺伝子が発現されるクラスＩおよびクラスＩＩ欠損細胞株が挙げられる。例示的な実施形態として、クラスＩ欠損Ｂ細胞株は、Ｂ７２１．２２１である。一部の実施形態では、細胞は、Ａ３７５、またはＨＥＫ２９３Ｔ、ＨｅＬａ、またはｅｘｐｉ２９３である。しかしながら、クラスＩおよび／またはクラスＩＩ欠損である他の細胞集団を生成することができることは、当業者には明らかである。クラスＩおよび／またはクラスＩＩ欠損細胞ならびにクラスＩおよび／またはクラスＩＩ欠損細胞株を生成するための方法は、当技術分野で公知であり、内在性クラスＩまたはクラスＩＩ遺伝子を欠失させる／不活化するための例示的方法は、例えば、ＴＨＰ－１細胞中での、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介性ゲノム編集を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、マクロファージ、Ｂ細胞、および樹状細胞などの専門的抗原提示細胞である。細胞は、Ｂ細胞または樹状細胞であってもよい。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞または腫瘍細胞株に由来する細胞である。一部の実施形態では、細胞は、患者から単離された細胞である。一部の実施形態では、細胞は、感染性因子またはその一部を含有する。

【０３１９】

一部の実施形態では、ユニバーサルＩＰ構築物は、親和性アクセプタータグおよび親和性分子を含むクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物を含む。一部の実施形態では、ユニバーサルＩＰ構築物は、少なくとも１つの特異的に結合する親和性アクセプタータグおよび親和性分子を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン

（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質に由来するＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、またはサルウイルス５（ＳＶ５）のパラミクソウイルスのＰおよびＶタンパク質上に見出される小エピトープ（Ｐｋ）に由来するＶ５タグである。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、タグ配列の複数の反復（例えば、３×ポリヒスチジンタグ、３×ＦＬＡＧタグ）を含んでもよい。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、タグ配列の複数の反復（例えば、３×ポリヒスチジンタグ、３×ＦＬＡＧタグ）を含んでもよい。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、認識可能なエピトープ（抗体結合部位）をＨＬＡ－タンパク質に付加して、対応する抗体の結合を提供し、これによりタグ付けされたタンパク質の識別または親和性精製を可能にするペプチドタグの型である「エピトープタグ」である。エピトープタグの非限定例は、ＩｇＧに結合するプロテインＡまたはプロテインＧである。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）またはヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）ペプチド配列を含む。多数の他のタグ部分が当業者には公知であり、当業者によって想定することができ、また、本明細書で企図される。ペプチドタグが親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のエレメントとして発現され得る限り、任意のペプチドタグを使用することができる。

【０３２０】

親和性タグを、ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端またはＣ末端上に置くことができる。Ｆ２Ａなどの切断配列、または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を、α鎖とβ２ミクログロブリン（クラスＩ）との間、またはα鎖とβ鎖（クラスＩＩ）との間に置くことができる。一部の実施形態では、単一のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１、ＨＬＡ－Ａ＊２３：０１およびＨＬＡ－Ｂ＊１４：０２、またはＨＬＡ－Ｅ＊０１：０１であり、クラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０２およびＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊１５：０１、またはＨＬＡ－ＤＲＢ＊０７：０１である。一部の実施形態では、切断配列は、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、Ｅ２Ａ、またはＦ２Ａ配列である。例えば、切断配列は、ＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（Ｔ２Ａ）、ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（Ｐ２Ａ）、ＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ（Ｅ２Ａ）、またはＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ（Ｆ２Ａ）であってよい。

【０３２１】

一部の実施形態では、ＨＬＡ－ペプチド複合体免疫精製は、ビオチンに基づくものである。一部の実施形態では、ＨＬＡ－ペプチド複合体免疫精製は、ストレプトアビジンまたはＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎに基づくものである。一部の実施形態では、ＨＬＡ－ペプチド複合体を、ＨＰＬＣなどのクロマトグラフィー技術によって生体試料から富化することもできる。一部の実施形態では、高存在量の血清タンパク質の枯渇を使用して、ＨＬＡ－ペプチド複合体を富化することができる。一部の実施形態では、豊富な血清タンパク質を除去するための方法は、色素リガンド（アルブミンのため）、プロテインＡおよびＧ（γ－グロブリンのため）または試料に由来するこれらの種に高い親和性で結合し、選択的に枯渇させる特異的抗体を含む（Govorukhina、Reijmersら、２００６年）。そのような戦略

は、単一の質量分析において識別されるＨＬＡ由来ペプチド配列の数を増加させる。
【０３２２】
生体試料からの特定のＨＬＡ配列の分解を最適化するのに望ましい富化の程度は、生体試料中のＨＬＡ配列の初期濃度、ならびに試料中の他の非ＨＬＡタンパク質の濃度および性質に依存するであろう。
【０３２３】
生体試料内のＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するために、古典的なタンパク質精製技術を、単独で、または本明細書に提供されるユニバーサルＩＰパイプライン方法と組み合わせて使用することができる。古典的なタンパク質分離（精製）技術は、サイズ差（限外濾過、ゲル濾過、またはサイズ排除クロマトグラフィー）；電荷差（ｐｉ）（アニオン／カチオン交換クロマトグラフィー、または疎水性相互作用クロマトグラフィー）；およびサイズ差と電荷差の組合せ（１Ｄまたは２Ｄ電気泳動）に基づく。免疫精製の選択肢は、ＨＬＡタンパク質に特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用を含む。他のタンパク質親和性精製の選択肢は、ＨＬＡに結合することが知られるタンパク質の使用を含み、これらとしては、全てのＨＬＡクラスＩタンパク質のα３ドメインに結合するＣＤ８；全てのＨＬＡクラスＩＩタンパク質に結合するＣＤ４；自己Ｔ細胞受容体；および高い親和性でＨＬＡに結合する抗原性ペプチド（ペプチド／ＨＬＡ結合特徴を予測するために、コンピューターモデリングアルゴリズムを使用することができる）が挙げられる。これらの高いＨＬＡ親和性タンパク質選択肢のいずれかを、不溶性の固相支持体上に固定して、液体生体試料に由来するＨＬＡを捕捉するために使用することができる親和性マトリックスを調製することができる。適切な溶出条件は、試料のＨＬＡ含量の濃度および精製（単離）をもたらすであろう。
【０３２４】
一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に細胞を溶解するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップをさらに含む。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含む。一部の例では、富化するステップは、四量体試薬の使用を含まない。
【０３２５】
疾患特異的抗原
一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原性ペプチド分子のサイズは、限定されるものではないが、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０、約３１、約３２、約３３、約３４、約３５、約３６、約３７、約３８、約３９、約４０、約４１、約４２、約４３、約４４、約４５、約４６、約４７、約４８、約４９、約５０、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００、約１１０、約１２０個またはそれより多いアミノ分子残基、およびその中で誘導される任意の範囲を含んでもよい。
【０３２６】
一部の実施形態では、抗原性ペプチド分子は、５０アミノ酸と等しい、または５０アミノ酸未満である。一部の実施形態では、抗原性ペプチド分子は、約２０～約３０アミノ酸に等しい。より長いペプチドを、いくつかの方法で設計することができる。例えば、ＨＬＡ結合領域が予測されるか、または公知である場合、より長いペプチドは、それぞれの対応する遺伝子産物のＮおよびＣ末端に向かう０～１０個のアミノ酸の伸長を含む個々の結合ペプチドのいずれからなってもよい。より長いペプチドはまた、それぞれについて伸長した配列を含む結合ペプチドの一部または全部の連結からなってもよい。別の場合、配列決定が、疾患組織中に存在する長い（１０残基を超える）エピトープ配列を示す場合（例

えば、新しいペプチド配列をもたらすフレームシフト、リードスルーまたはイントロン含有のため）、より長いペプチドは、新しい疾患特異的アミノ酸の全伸長物からなってもよい。両方の場合、より長いペプチドの使用は、樹状細胞などの専門的抗原提示細胞による内在性プロセシングを必要とし、より効果的な抗原提示およびＴ細胞応答の誘導をもたらすことができる。一部の実施形態では、伸長した配列を、ポリペプチドの生化学的特性（溶解度または安定性などの特性）を改善するため、またはペプチドの効率的なプロテアソームプロセシングの可能性を改善するために変化させる。

【０３２７】

抗原性ペプチドおよびポリペプチドは、ＨＬＡタンパク質に結合することができる。一部の実施形態では、抗原性ペプチドは、対応する天然／野生型のペプチドよりも高い親和性でＨＬＡタンパク質に結合することができる。抗原性ペプチドは、約１０００ｎＭ未満、約５００ｎＭ未満、約２５０ｎＭ未満、約２００ｎＭ未満、約１５０ｎＭ未満、約１００ｎＭ未満、または約５０ｎＭ未満のＩＣ５０を有してもよい。一部の実施形態では、抗原性ペプチドは、対象に投与した場合、自己免疫応答を誘導しない、および／または免疫寛容を誘発しない。

【０３２８】

本開示はまた、複数の抗原性ペプチドを含む組成物も提供する。抗原性ペプチドに対する参照は、対象の細胞中へのペプチドの導入をもたらすことができる任意の好適な送達モダリティ（例えば、核酸）を含む。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも３つまたはそれより多い抗原性ペプチドを含む。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも約３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、または５０個の異なるペプチドを含有する。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも２０個の異なるペプチドを含有する。一部の実施形態では、組成物は、最大で２０個の異なるペプチドを含有する。本開示によれば、異なるペプチドの２個またはそれより多くは、同じポリペプチドに由来してもよい。例えば、抗原性変異がポリペプチドをコードする場合、抗原性ペプチドの２つまたはそれより多くが、そのポリペプチドに由来してもよい。一実施形態では、ポリペプチドに由来する２つまたはそれより多い抗原性ペプチドは、ポリペプチドに広がるタイル状アレイを含んでもよい（例えば、抗原性ペプチドは、ポリペプチドの一部または全部に広がる一連の重複する抗原性ペプチドを含んでもよい）。抗原性ペプチドは、ヒトがんにおける変異または感染性因子もしくは自己免疫疾患に由来するものであってもよい。

【０３２９】

抗原性ペプチド、ポリペプチド、および類似体をさらに改変して、通常はタンパク質の一部ではない追加の化学的部分を含有させることができる。これらの誘導体化部分は、溶解度、生物学的半減期、タンパク質の吸収、または結合親和性を改善することができる。この部分はまた、タンパク質の任意の望ましい副作用などを低減させるか、または排除することができる。これらの部分の概説を、Remington's Pharmaceutical Sciences、第２０版、MackPublishing Co.、Easton、PA（２０００年）に見出すことができる。例えば、所望の活性を有する抗原性ペプチドおよびポリペプチドを必要に応じて改変して、所望のＭＨＣ分子に結合し、適切なＴ細胞を活性化する非改変ペプチドの生物活性を増加させるか、またはその実質的に全部を少なくとも保持しながら、ある特定の望ましい属性、例えば、改善された薬理学的特徴を提供することができる。例えば、抗原性ペプチドおよびポリペプチドは、保存的または非保存的な置換などの様々な変化を受けてもよく、そのような変化は、ＭＨＣ結合の改善などの、その使用におけるある特定の利点を提供することができる。そのような保存的置換は、あるアミノ酸残基を、生物学的および／または化学的に類似する別のアミノ酸残基と、例えば、ある疎水性残基を、別のものと、またはある極性残基を別のものと置き換えることを包含してもよい。単一のアミノ酸置換の効果を、Ｄ－アミノ酸を使用して精査することもできる。そのような改変を、例えば、Merrifield、Science ２３２巻：３４１～３４７頁（１９８６年）、BaranyおよびMerrifield、T

hePeptides、GrossおよびMeienhofer編(N.Y.、Academic Press)、１～２８４頁（１９７９年）；ならびにStewartおよびYoung、SolidPhase Peptide Synthesis(Rockford、III.、Pierce)、第２版（１９８４年）に記載されるような、周知のペプチド合成手順を使用して作製することができる。

【０３３０】

例えば、アミノ酸の付加または欠失により、化合物のアミノ酸配列を伸長するか、または減少させることにより、抗原性ペプチドを改変することもできる。抗原性ペプチド、ポリペプチド、または類似体を、ある特定の残基の順序または組成を変化させることによって改変することもできる。生物学的活性にとって必須のある特定のアミノ酸残基、例えば、重要な接触部位にあるもの、または保存された残基は、一般的には、生物学的活性に対する有害な効果なしには変化させることができないことが当業者には理解されるであろう。重要でないアミノ酸は、Ｌ－ａ－アミノ酸、またはそのＤ－異性体などの、タンパク質中に天然に存在するものに限定される必要はないが、β－γ－δ－アミノ酸などの非天然アミノ酸も、ならびにＬ－ａ－アミノ酸の多くの誘導体を含んでもよい。

【０３３１】

単一のアミノ酸置換を有する一連のペプチドを使用することによって抗原ペプチドを最適化して、ＭＨＣ結合に対する、帯電、疎水性などの効果を決定することができる。例えば、一連の正に荷電した（例えば、ＬｙｓもしくはＡｒｇ）または負に荷電した（例えば、Ｇｌｕ）アミノ酸置換を、様々なＭＨＣ分子およびＴ細胞受容体に対する様々なパターンの感受性を示すペプチドの長さに沿って作製することができる。さらに、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、または同様の残基などの小さく、相対的に中性の部分を使用する複数の置換を用いることができる。置換は、ホモ－オリゴマーまたはヘテロ－オリゴマーであってもよい。置換または付加される残基の数および型は、必須の接触点と、求められるある特定の機能的属性（例えば、疎水性対親水性）との間に必要な空間に依存する。親ペプチドの親和性と比較した、ＭＨＣ分子またはＴ細胞受容体に対する結合親和性の増加を、そのような置換によって達成することもできる。任意の事象において、そのような置換は、例えば、結合を破壊し得る立体および電荷干渉を回避するように選択されたアミノ酸残基または他の分子断片を用いるべきである。アミノ酸置換は、典型的には、単一の残基のものである。置換、欠失、挿入またはその任意の組合せを組み合わせて、最終的なペプチドに到達することができる。

【０３３２】

抗原性ペプチドを改変して、所望の属性を提供することができる。例えば、ＣＴＬ活性を誘導するペプチドの能力を、ヘルパーＴ細胞応答を誘導することができる少なくとも１つのエピトープを含有する配列への連結によって増強することができる。一部の実施形態では、免疫原性ペプチド／Ｔヘルパーコンジュゲートは、スペーサー分子によって連結される。一部の実施形態では、スペーサーは、生理的条件下で実質的に非荷電であるアミノ酸またはアミノ酸模倣物などの相対的に小さい中性分子を含む。スペーサーを、例えば、Ａｌａ、Ｇｌｙ、または非極性アミノ酸の他の中性スペーサーもしくは中性極性アミノ酸から選択することができる。必要に応じて、本スペーサーは、同じ残基を含む必要はなく、したがって、ヘテロまたはホモオリゴマーであってもよいことが理解されるであろう。抗原性ペプチドを、そのペプチドのアミノまたはカルボキシ末端で直接的に、またはスペーサーを介して、Ｔヘルパーペプチドに連結することができる。抗原性ペプチドまたはＴヘルパーペプチドのアミノ末端をアシル化することができる。例示的なＴヘルパーペプチドとしては、破傷風トキソイド８３０～８４３、インフルエンザ３０７～３１９、マラリアスポロゾイト周囲３８２～３９８および３７８～３８９が挙げられる。

【０３３３】

一対立遺伝子ＨＬＡ細胞株

単一のクラスＩ ＨＬＡ対立遺伝子、一対のクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子、または単一のクラスＩ ＨＬＡ対立遺伝子および一対のクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子のいずれかを発現する一対立遺伝子細胞株を、好適な細胞集団に、単一のＨＬＡ対立遺伝子をコード

するポリ核酸、例えば、ベクターを形質導入またはトランスフェクトすることによって生成することができる。好適な細胞集団としては、例えば、単一のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子が発現されるクラスＩ欠損細胞株、一対のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子が発現されるクラスＩＩ欠損細胞株、または単一のＨＬＡクラスＩおよび／もしくは一対のクラスＩＩ対立遺伝子が発現されるクラスＩおよびクラスＩＩ欠損細胞株が挙げられる。例示的な実施形態として、クラスＩ欠損Ｂ細胞株は、Ｂ７２１．２２１である。しかしながら、クラスＩおよび／またはクラスＩＩ欠損である他の細胞集団を生成することができることが、当業者には明らかである。内在性クラスＩまたはクラスＩＩ遺伝子を欠失させる／不活化するための例示的な方法は、例えば、ＴＨＰ－１細胞中でのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介性ゲノム編集を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、マクロファージ、Ｂ細胞、および樹状細胞などの専門的抗原提示細胞である。細胞は、Ｂ細胞または樹状細胞であってもよい。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞または腫瘍細胞株に由来する細胞である。一部の実施形態では、細胞は、患者から単離された細胞である。一部の実施形態では、細胞は、感染性因子またはその一部を含有する。一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^7個の細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも１個の遺伝子の発現および／または活性を増加または減少させることなどによって、さらに改変される。一部の実施形態では、遺伝子は、免疫プロテアソームのメンバーをコードする。免疫プロテアソームは、ＨＬＡクラスＩ結合ペプチドのプロセシングに関与することが知られており、ＬＭＰ２（β１ｉ）、ＭＥＣＬ－１（β２ｉ）、およびＬＭＰ７（β５ｉ）サブユニットを含む。また、免疫プロテアソームを、インターフェロン－ガンマによって誘導することもできる。したがって、一部の実施形態では、細胞集団を、１つまたは複数のサイトカイン、増殖因子、または他のタンパク質と接触させることができる。細胞を、インターフェロン－ガンマ、ＩＬ－１０、ＩＬ－６、および／またはＴＮＦ－αなどの炎症性サイトカインを用いて刺激することができる。細胞集団を、ストレス（熱ストレス、酸素欠乏、グルコース飢餓、ＤＮＡ損傷剤など）などの様々な環境条件にかけることもできる。一部の実施形態では、細胞を、化学療法薬、放射線、標的治療、免疫治療のうちの１つまたは複数と接触させる。したがって、本明細書に開示される方法を使用して、ＨＬＡペプチドプロセシングおよび提示に対する様々な遺伝子または条件の効果を研究することができる。一部の実施形態では、使用される条件は、ＨＬＡ－ペプチドの集団が識別される患者の状態と一致するように選択される。

【０３３４】

本開示の単一のＨＬＡ－対立遺伝子を、ウイルスに基づく系（例えば、アデノウイルス系、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、ポックスウイルス、またはレンチウイルス）を使用してコードさせ、発現させることができる。アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、およびレンチウイルス送達のために使用することができるプラスミドは、以前に記載されている（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第６，９５５，８０８号および第６，９４３，０１９号、ならびに米国特許出願第２００８０２５４００８号を参照されたい）。本開示の実施において使用することができるベクターのうち、細胞の宿主ゲノム中への組込みは、挿入された導入遺伝子の長期的発現をもたらすことが多い、レトロウイルス遺伝子導入法を用いて可能である。例示的な実施形態では、レトロウイルスはレンチウイルスである。さらに、高い形質導入効率が、多くの異なる細胞型および標的組織において観察されている。外来エンベロープタンパク質を組み込み、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大増殖させることによって、レトロウイルスの向性を変更することができる。また、ある特定の細胞型のみがレンチウイルスによって感染するように、レトロウイルスを操作して、挿入された導入遺伝子の条件的発現を可能にすることもできる。細胞型特異的プロモーターを使用して、特定の細胞型における発現を標的化することができる。レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである（したがって、レンチウイルスおよびレトロウイルスベクターは両方とも、本開示の実施において使用することができる）。さらに、レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入または感染し、典型的には、高いウイルス力価をもたらすことができる。ＨＬＡクラスＩおよびクラスＩＩ

を発現するように形質導入される安定な細胞株を生成するために使用することができる例示的なレンチウイルスベクターを、図３に示す。

【０３３５】

レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存してもよい。レトロウイルスベクターは、最大で６～１０ｋｂの外来配列に関するパッケージング能力を有するｃｉｓ作用性の長い末端反復を含む。ベクターの複製およびパッケージングのためには、最小限のｃｉｓ作用性ＬＴＲで十分であり、ベクターは次いで、永続的な発現を提供するために所望の核酸を標的細胞中に組み込むために使用される。本開示の実施において使用することができる広く使用されるレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、およびその組合せに基づくものが挙げられる（例えば、Buchscherら（１９９２年）、Ｊ．Virol．６６巻：２７３１～２７３９頁；Johannら（１９９２年）、Ｊ．Virol．６６巻：１６３５～１６４０頁；Sommnerfeltら（１９９０年）、Virol．１７６巻：５８～５９頁；Wilsonら（１９９８年）、Ｊ．Virol．６３巻：２３７４～２３７８頁；Millerら（１９９１年）、Ｊ．Virol．６５巻：２２２０～２２２４頁；ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５７００を参照されたい）。また、本開示の実施において有用なものは、ウマ感染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）に基づくレンチウイルスベクターなどの、最小の非霊長類レンチウイルスベクターである（例えば、Wiley InterScience DOI: 10.1002/jgm.845において２００５年１１月２１日にオンライン公開された、Balagaan（２００６年）、Ｊ Gene Med；８巻：２７５～２８５頁を参照されたい）。ベクターは、標的遺伝子の発現を駆動するサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターを有してもよい。したがって、本開示は、特に、本開示の実施において有用なベクター：レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを含むウイルスベクターを企図する。

【０３３６】

任意のＨＬＡ対立遺伝子を、細胞集団中で発現させることができる。例示的な実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、クラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ＨＬＡ－Ａ対立遺伝子またはＨＬＡ－Ｂ対立遺伝子である。一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、クラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。クラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の配列を、ＩＰＤ－ＩＭＧＴ／ＨＬＡデータベースに見出すことができる。例示的なＨＬＡ対立遺伝子としては、限定されるものではないが、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１、ＨＬＡ－Ｂ＊１４：０２、ＨＬＡ－Ａ＊２３：０１、ＨＬＡ－Ｅ＊０１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊１５：０１、およびＨＬＡ－ＤＲＢ＊０７：０１が挙げられる。

【０３３７】

一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、目的の遺伝子型に一致するように選択される。一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、変異したＨＬＡ対立遺伝子であり、罹患した患者における天然に存在しない対立遺伝子または天然に存在する対立遺伝子であってもよい。本明細書に開示される方法は、様々な障害と関連するＨＬＡ対立遺伝子ならびに低頻度で存在する対立遺伝子のためのＨＬＡ結合ペプチドを識別するさらなる利点を有する。したがって、一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、白人集団内などの集団内で１％未満の頻度で存在する。

【０３３８】

一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子をコードする核酸配列は、ＨＬＡ－タンパク質を免疫精製するために使用することができる親和性アクセプタータグをさらに含む。好適なタグは、当技術分野で周知である。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレ

プトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質に由来するＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、またはサルウイルス５（ＳＶ５）のパラミクソウイルスのＰおよびＶタンパク質上に見出される小エピトープ（Ｐｋ）に由来するＶ５タグである。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、認識可能なエピトープ（抗体結合部位）をＨＬＡ－タンパク質に付加して、対応する抗体の結合を提供し、これによりタグ付けされたタンパク質の識別または親和性精製を可能にするペプチドタグの型である「エピトープタグ」である。エピトープタグの非限定例は、ＩｇＧに結合するプロテインＡまたはプロテインＧである。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）またはヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）ペプチド配列を含む。多数の他のタグ部分が、当業者には公知であり、当業者によって想定することができ、また、本明細書で企図される。ペプチドタグが親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のエレメントとして発現され得る限り、任意のペプチドタグを使用することができる。

【０３３９】

本明細書で提供される方法は、ユニバーサルＩＰ　ＨＬＡ構築物をトランスフェクトまたは形質導入された細胞からＨＬＡ－ペプチド複合体を単離するステップを含む。一部の実施形態では、複合体を、商業的に入手可能な抗体を用いる当技術分野で公知の標準的な免疫沈降技術を使用して単離することができる。細胞を、最初に溶解することができる。ＨＬＡクラスＩ－ペプチド複合体を、Ｗ６／３２抗体などのＨＬＡクラスＩ特異的抗体を使用して単離することができるが、ＨＬＡクラスＩＩ－ペプチド複合体を、Ｍ５／１１４．１５．２モノクローナル抗体などのＨＬＡクラスＩＩ特異的抗体を使用して単離することができる。一部の実施形態では、単一（または一対）のＨＬＡ対立遺伝子は、ペプチドタグとの融合タンパク質として発現され、ＨＬＡ－ペプチド複合体は、ペプチドタグを認識する結合分子を使用して単離される。

【０３４０】

方法は、前記ＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップ、およびペプチドを配列決定するステップをさらに含む。ペプチドは、酸溶出などの、当業者には公知の任意の方法によって複合体から単離される。任意の配列決定法を使用することができるが、一部の実施形態では、液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ－ＭＳもしくはＬＣ－ＭＳ／ＭＳ、またはあるいは、ＨＰＬＣ－ＭＳもしくはＨＰＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）などの質量分析を用いる方法が使用される。これらの配列決定法は、当業者には周知であり、Medzihradszky KFおよびChalkley RJ. Mass Spectrom Rev. ２０１５年１月～２月；３４巻（１号）：４３～６３頁に概説されている。

【０３４１】
一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団または内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）などによって富化または選別された細胞を含む。一部の実施形態では、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を使用して、細胞集団を選別する。一部の実施形態では、細胞集団は、クラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡのいずれか、またはクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡの両方の細胞表面発現について予めＦＡＣＳで選別される。例えば、ＦＡＣＳを使用して、ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子、ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子、またはその組合せの細胞表面発現について細胞集団を選別することができる。

【０３４２】
親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ構築物のライブラリー
本明細書で使用される用語「ライブラリー」は、核酸分子（環状または線状）の集合を指す。一実施形態では、ライブラリーは、一般的な供給源生物、臓器、組織、または細胞に由来し得る、複数（すなわち、２つまたはそれより多い）核酸分子を含んでもよい。一部の実施形態では、ライブラリーは、生物の核酸含量の全部もしくは一部もしくは有意な部分の代表（「ゲノム」ライブラリー）、または細胞、組織、臓器もしくは生物中の発現される核酸分子の全部もしくは一部もしくは有意な部分を代表する核酸分子のセット（ｃＤＮＡライブラリーもしくはそれに由来するセグメント）である。ライブラリーはまた、ｄｅ　ｎｏｖｏ合成、１つまたは複数の配列の変異誘発などによって作製されるランダム配列を含んでもよい。そのようなライブラリーを、１つまたは複数のベクター中に含有させることができる。本明細書に提供される親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ構築物のライブラリーは、ＨＬＡ対立遺伝子のエレメント、親和性アクセプターペプチド、またはリンカーをコードするＤＮＡ配列を含む。適切な分子生物学的技術を、Sambrookら（Molecular Cloning；A Laboratory Manual、New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press、１９８９年）に見出すことができる。核酸セグメントのクローニングを容易にするためのいくつかの方法が、例えば、以下の参考文献：Ferguson, J.ら、Gene １６巻：１９１頁（１９８１年）およびHashimoto-Gotoh, T.ら、Gene ４１巻：１２５頁（１９８６年）に記載されている。本明細書で使用される、組換え核酸技術ならびに分子および細胞生物学の分野において使用される他の用語は、適用可能な業界における通常の知識を有する者によって一般的に理解されるであろう。

【０３４３】
組換えＨＬＡ対立遺伝子の様々なエレメントまたはドメインを、組換えＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端とＣ末端の間に任意の順序で配置することができる。別のエレメントまたはドメインよりも、組換えＨＬＡ対立遺伝子からコードされる組換えポリペプチドのＮ末端に近いエレメントまたはドメインは、他のエレメントまたはドメインの「Ｎ末端」であると言われる。同様に、別のエレメントまたはドメインよりも、組換えＨＬＡ対立遺伝子からコードされる組換えポリペプチドのＣ末端に近いエレメントまたはドメインは、他のエレメントまたはドメインの「Ｃ末端」であると言われる。別途明示的に記述されない限り、組換えＨＬＡ対立遺伝子からコードされる組換えポリペプチドの異なるエレメントまたはドメインは、隣接している必要はない（すなわち、１つまたは複数の介在エレメントもドメインも含まない）。一部の実施形態では、組換えＨＬＡ対立遺伝子からコードされる組換えポリペプチドの異なるエレメントまたはドメインは、隣接していてもよい。

【０３４４】
組換えＨＬＡ対立遺伝子からコードされる組換えポリペプチドは、１つまたは複数のリ

ンカー、ペプチドタグ（エピトープタグなど）、またはプロテアーゼ認識部位などの、１つまたは複数の任意選択のエレメントを含んでもよい。一部の実施形態では、ペプチドタグは、親和性アクセプターペプチドである。リンカーは、組換えタンパク質の他のエレメントまたはドメインを分離する比較的短い一連のアミノ酸である。一部の実施形態では、リンカーは、１～１００アミノ酸長；例えば、５～７５、１０～６０、１５～５０、１５～４０、または１～５０アミノ酸長である。

【０３４５】

異種発現系においてタンパク質を発現させる方法は、当技術分野で周知である。典型的には、目的のタンパク質（組換えＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ親和性アクセプタータグ付きペプチド）の全部または一部をコードする核酸分子を、本明細書に記載されるものなどの方法を使用して取得する。タンパク質をコードする核酸配列を、標準的な組換えＤＮＡ手順を使用して目的の特定の宿主細胞に適した発現ベクター中にクローニングする。発現ベクターとしては、（数あるエレメントの中でも特に）所望のタンパク質をコードする核酸分子に作動可能に連結して、宿主細胞中でのそのような核酸分子の発現を引き起こすことができる調節配列（例えば、プロモーター）が挙げられる。同時に、調節配列およびタンパク質をコードする核酸配列は、「発現カセット」である。発現ベクターは、複製起点、形質転換された細胞中での表現型選択を提供するマーカー遺伝子、１つまたは複数の他のプロモーター、および異種核酸配列の挿入のためのいくつかの制限部位を含有するポリリンカー領域を含んでもよい。

【０３４６】

多数の宿主細胞中での異種タンパク質の発現にとって有用な発現ベクターは、当技術分野で周知であり、一部の特定の例は、本明細書に提供される。特定の宿主細胞に適した任意の方法を使用して、宿主細胞に発現ベクターをトランスフェクトする（またはそれを含有するウイルスに感染させる）。そのようなトランスフェクション法も、当技術分野で周知であり、非限定的な例示的方法は、本明細書に記載される。トランスフェクトまたは形質導入された宿主細胞は、発現カセット中で対応する核酸配列によりコードされたタンパク質を発現することができる。

【０３４７】

一部の実施形態では、クラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物は、Ｎ末端またはＣ末端に、親和性アクセプタータグおよび親和性分子を含む。一部の実施形態では、クラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物は、少なくとも１つの特異的に結合する親和性アクセプタータグおよび親和性分子を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ

、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質に由来するＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、またはサルウイルス５（ＳＶ５）のパラミクソウイルスのＰおよびＶタンパク質上に見出される小エピトープ（Ｐｋ）に由来するＶ５タグである。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、タグ配列の複数の反復（例えば、３×ポリヒスチジンタグ、３×ＦＬＡＧタグ）を含んでもよい。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、タグ配列の複数の反復（例えば、３×ポリヒスチジンタグ、３×ＦＬＡＧタグ）を含んでもよい。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、ＨＬＡ－タンパク質に認識可能なエピトープ（抗体結合部位）を付加して、対応する抗体の結合を提供し、これによりタグ付けされたタンパク質の識別または親和性精製を可能にするペプチドタグの型である、「エピトープタグ」である。エピトープタグの非限定例は、ＩｇＧに結合するプロテインＡまたはプロテインＧである。

【０３４８】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）またはヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）ペプチド配列を含む。多数の他のタグ部分が当業者には公知であり、当業者によって想定することができ、また、本明細書で企図される。ペプチドタグが親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のエレメントとして発現され得る限り、任意のペプチドタグを使用することができる。

【０３４９】

親和性タグを、ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端またはＣ末端上に置くことができる。一部の実施形態では、親和性タグは、ＥＲに対する細胞表面へのＨＬＡ－ペプチドの局在化を可能にするためにＨＬＡ対立遺伝子のＣ末端に置かれる。一部の実施形態では、親和性タグは、複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する細胞株からの単一ＨＬＡの単離を可能にするためにＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端に置かれる。さらに別の実施形態では、親和性タグは、特定のクラスＩＩ　ＨＬＡヘテロ二量体を免疫精製するために可変β鎖に付加される。

【０３５０】

一部の実施形態では、Ｆ２Ａなどの切断配列、または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を、α鎖とβ２－ミクログロブリンの間（クラスＩ）またはα鎖とβ鎖の間（クラスＩＩ）に置くことができる。一部の実施形態では、単一のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１、ＨＬＡ－Ａ＊２３：０１およびＨＬＡ－Ｂ＊１４：０２、またはＨＬＡ－Ｅ＊０１：０１であり、クラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０２およびＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊１５：０１、またはＨＬＡ－ＤＲＢ＊０７：０１である。

【０３５１】

非限定的な例示的親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ構築物は、図２、図６Ｃおよび図７Ｃに示される。

【０３５２】

治療方法

腫瘍特異的ペプチドを使用する個別化された免疫治療が記載されている（Ottら、Hematol. Oncol. Clin. N. Am. ２８巻（２０１４年）、５５９～５６９頁）。どの特定のペプチドを免疫原として使用するかを効率的に選択することは、どの腫瘍特異的ペプチドが患者に存在するＨＬＡ対立遺伝子に効率的に結合するかを予測する能力を必要とする。治癒的および腫瘍特異的免疫治療を開発するための決定的な障壁の１つは、自己免疫を回避するための高度に特異的で限定された腫瘍抗原の同定および選択である。悪性細胞内での遺伝子変化（例えば、反転、転座、欠失、ミスセンス変異、スプライス部位変異など）の結果として生じる腫瘍ネオ抗原は、最も腫瘍特異的なクラスの抗原である。ネオ抗原は、それらの同定、最適化された抗原の選択、およびワクチンまたは免疫原性組成物における使用のためのネオ抗原の生成の技術的困難性のため、がんワクチンまたは免疫原性組

成物においてはめったに使用されてこなかった。これらの課題は、高い割合のがんを有する対象に由来する一致した生殖系列試料中ではなく、腫瘍中にＤＮＡレベルで存在する新生物／腫瘍中の変異を同定すること；新生物／腫瘍内で発現され、高い割合の患者ＨＬＡ対立遺伝子に結合する複数のネオ抗原Ｔ細胞エピトープを生成するための１つまたは複数のペプチド－ＭＨＣ結合予測アルゴリズムを用いて同定された変異を分析すること；および高い割合のがんを有する対象を処置するのに好適ながんワクチンまたは免疫原性組成物における使用のための、全てのネオ抗原ペプチドおよび予測される結合ペプチドのセットから選択される複数のネオ抗原性ペプチドを合成することによって解決することができる（図１８Ａおよび図１８Ｂ）。

【０３５３】

例えば、ペプチド配列決定情報の治療ワクチンへの翻訳は、高い割合の個体のＨＬＡ分子に結合することができる変異ペプチドの予測を含んでもよい。免疫原として利用するための特定の変異の効率的な選択には、どの変異ペプチドが高い割合の患者のＨＬＡ対立遺伝子に効率的に結合するかを予測する能力が必要である。最近、検証された結合および非結合ペプチドを用いたニューラルネットワークに基づく学習手法が、主なＨＬＡ－ＡおよびＢ対立遺伝子に関する予測アルゴリズムの精度を向上させてきた。しかしながら、ＨＬＡ－ペプチド結合規則をコードする向上したニューラルネットワークに基づくアルゴリズムを使用するとしても、いくつかの因子が、ＨＬＡ対立遺伝子上に提示されるペプチドを予測する力を制限する。

【０３５４】

例えば、ペプチド配列決定情報の治療ワクチンへの翻訳は、長いペプチドのマルチエピトープワクチンとして薬物を製剤化することを含んでもよい。多くの変異エピトープを、免疫系の大きな能力を実用的に利用するものとして標的化することは、免疫標的化遺伝子産物の下方調節による免疫回避のための機会を妨げ、エピトープ予測手法の公知の不正確性を相殺する。合成ペプチドは、複数の免疫原を効率的に調製し、変異エピトープの同定を有効なワクチンに迅速に翻訳するための有用な手段を提供する。ペプチドを、容易に化学的に合成し、汚染細菌または動物物質を含まない試薬を利用して容易に精製することができる。小さいサイズは、タンパク質の変異領域への明確な集中を可能にし、また、他の成分（非変異タンパク質またはウイルスベクター抗原）に由来する無関係の抗原性競合を低減させる。

【０３５５】

例えば、ペプチド配列決定情報の治療ワクチンへの翻訳は、強力なワクチンアジュバントとの組合せを含んでもよい。有効なワクチンには、免疫応答を開始させるための強力なアジュバントが必要である。例えば、ポリ－ＩＣＬＣ、ＴＬＲ３のアゴニストならびにＭＤＡ５およびＲＩＧ３のＲＮＡヘリカーゼドメインは、ワクチンアジュバントにとっていくつかの望ましい特性を示した。これらの特性は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの免疫細胞の局所および全身活性化の誘導、刺激ケモカインおよびサイトカインの産生、ならびにＤＣによる抗原提示の刺激を含む。さらに、ポリ－ＩＣＬＣは、ヒトにおいて持続的なＣＤ４＋およびＣＤ８＋応答を誘導することができる。重要なことに、転写およびシグナル伝達経路の上方調節における著しい類似性が、ポリ－ＩＣＬＣをワクチン接種された対象および高度に有効な複製可能黄熱病ワクチンを受けたことがあるボランティアにおいて見られた。さらに、ＮＹＥＳＯ－１ペプチドワクチン（モンタニドに加えて）と組み合わせたポリ－ＩＣＬＣで免疫された９０％を超える卵巣癌患者が、最近の第１相試験においてＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の誘導、ならびに該ペプチドに対する抗体応答を示した。同時に、ポリ－ＩＣＬＣは、現在まで２５を超える臨床試験において広範囲に試験されており、比較的良性の毒性プロファイルを示した。

【０３５６】

一部の実施形態では、免疫原性ペプチドを、疾患または状態を有する対象に由来する細胞から識別することができる。一部の実施形態では、免疫原性ペプチドは、疾患または状態を有する対象に特異的であってもよい。一部の実施形態では、免疫原性ペプチドは、疾

患または状態を有する対象のＨＬＡハプロタイプに一致するＨＬＡに結合することができる。

【０３５７】

一部の実施形態では、ペプチドのライブラリーを、細胞中で発現させることができる。一部の実施形態では、細胞は、識別されるか、または特徴付けられるペプチドを含む。一部の実施形態では、識別されるか、または特徴付けられるペプチドは、内在性ペプチドである。一部の実施形態では、ペプチドは、外因性ペプチドである。例えば、識別されるか、または特徴付けられるペプチドを、ペプチドのライブラリーをコードする複数の配列から発現させることができる。

【０３５８】

本明細書の開示の前は、ＨＬＡペプチドームのＬＣ－ＭＳ／ＭＳ研究の大多数は、元々存在するバイオインフォマティクス予測因子または「デコンボリューション」を使用して最大６個のクラスＩ対立遺伝子のうちの１つにペプチドを割り当てる必要がある、複数のＨＬＡ分子を発現する細胞を使用していた（Bassani-SternbergおよびGfeller、２０１６年）。したがって、公知のモチーフに厳密に一致しないペプチドを、所与のＨＬＡ対立遺伝子に対する結合剤として明確に報告することができなかった。

【０３５９】

個体のＨＬＡ分子に結合することができる、変異ペプチドなどのペプチドの予測方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、適用は、抗原を含むペプチドの所与のセットから、対象のための免疫原性組成物を調製するための最も好適なペプチドを識別する方法であって、前記ペプチドの所与のセットから対象のＨＬＡタンパク質に結合することができる複数のペプチドを選択するステップを含み、ＨＬＡタンパク質に結合する前記能力が、前記対象のＨＬＡ対立遺伝子のそれぞれについて特定のＨＬＡ結合ペプチドに対応するペプチド配列データベースを用いて訓練されたマシンを用いて、ペプチドの配列を分析することによって決定される、方法を提供する。抗原を含むペプチドの所与のセットから、対象のための免疫原性組成物を調製するための最も好適なペプチドを識別する方法であって、前記ペプチドの所与のセットから、対象のＨＬＡタンパク質に結合することができると決定された複数のペプチドを選択するステップを含み、ＨＬＡタンパク質に結合する能力が、本明細書の上記方法を実行することによって得られるペプチド配列データベースを用いて訓練されたマシンを用いて、ペプチドの配列を分析することによって決定される、方法が、本明細書で提供される。したがって、一部の実施形態では、本開示は、対象特異的免疫原性組成物を調製するための複数の対象特異的ペプチドを識別する方法であって、対象が腫瘍を有し、対象特異的ペプチドが対象および対象の腫瘍に特異的であり、前記方法が、対象の腫瘍の試料および対象の非腫瘍試料を配列決定するステップ；核酸配列決定に基づいて、対象のがん細胞のゲノム中に存在するが、対象の正常組織中には存在しない非サイレント変異、および対象のＨＬＡ遺伝子型を決定するステップ；ならびに識別された非サイレント変異から、それぞれ、対象の腫瘍に特異的なエピトープである異なる腫瘍エピトープを有し、それぞれ、本明細書に記載のＨＬＡ結合を予測するための方法において非サイレント変異に由来するペプチドの配列を分析することによって決定された場合、対象のＨＬＡタンパク質に結合することができると識別される、複数の対象特異的ペプチドを選択するステップを含む方法を提供する。

【０３６０】

一部の実施形態では、個体に特異的なＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付ける方法が、本明細書で開示される。

【０３６１】

一部の実施形態では、個体に特異的なＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付ける方法は、状態または疾患を有する対象などの、それを必要とする個体における免疫治療薬を開発するために使用される。

【０３６２】

哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、哺乳動物に、記載の方法に従っ

て識別されたペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載の方法に従って識別されたペプチドの配列を有するペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載の方法に従って識別されたペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載の方法に従って識別されたペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、細胞は、ＨＬＡ－ペプチド複合体としてペプチドを提示する。

【０３６３】

対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の方法に従って識別されたペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の方法に従って識別されたペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の方法に従って識別されたペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の方法に従って識別されたペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、疾患または障害は、がんである。一部の実施形態では、方法は、免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与するステップをさらに含む。

【０３６４】

一部の実施形態では、ＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付けることによって、それを必要とする個体のための免疫治療薬を開発する方法であって、ａ）それを必要とする個体に由来する細胞集団を用意するステップであって、細胞集団の１つまたは複数の細胞が、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含むポリ核酸を含み、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、ｉ）組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列、ｉｉ）それに作動可能に連結された、親和性アクセプターペプチドをコードする配列を含む、ステップ；ｂ）細胞集団の１つまたは複数の細胞の少なくとも１個の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現させ、これにより少なくとも１個の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成させるステップ；ｃ）親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；それを必要とする個体に特異的なＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付けるステップ；およびｄ）疾患または状態を有する、それを必要とする個体に特異的なＨＬＡ－ペプチド複合体に基づいて免疫治療薬を開発するステップを含む方法が、本明細書で開示される。

【０３６５】

一部の実施形態では、免疫治療薬は、核酸またはペプチド治療薬である。

【０３６６】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数のペプチドを、細胞集団に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団を１つもしくは複数のペプチドと接触させるステップ、または細胞集団中で１つもしくは複数のペプチドを発現させるステップを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸と接触させるステップを含む。

【０３６７】

一部の実施形態では、方法は、患者に特異的な１つまたは複数のＨＬＡを導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、患者に特異的な全てのＨＬＡを導入するステップを含む。一部の実施形態では、患者特異的ＨＬＡを、単一の対立遺伝子として導入す

ることができる。一部の実施形態では、複数の患者特異的ＨＬＡを導入することができる。一部の実施形態では、方法は、患者特異的ＨＬＡと関連して識別されたペプチドに基づいて免疫治療薬を開発するステップを含む。一部の実施形態では、細胞集団は、それを必要とする個体に由来する。

【０３６８】

一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成させるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団に、ペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成させるステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。一部の実施形態では、疾患または状態は、がんまたは感染性因子による感染または自己免疫疾患である。一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞中に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、それを必要とする個体に特異的なＨＬＡペプチド複合体に由来する１つまたは複数のペプチドを特徴付けるステップを含み、必要に応じて、ペプチドは、感染性因子または自己免疫疾患の１つまたは複数の標的タンパク質に由来する。一部の実施形態では、方法は、感染性因子または自己免疫疾患の１つまたは複数の標的タンパク質に由来するペプチドの１つまたは複数の領域を特徴付けるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、感染性因子または自己免疫疾患に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップを含む。

【０３６９】

一部の実施形態では、感染性因子は、病原体である。一部の実施形態では、病原体は、ウイルス、細菌、または寄生虫である。

【０３７０】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＢＫウイルス（ＢＫＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３、ＤＥＮＶ－４、ＤＥＮＶ－５）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトＴ細胞リンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ－１）、インフルエンザウイルス、ＲＳＶ、ＨＰＶ、狂犬病、流行性耳下腺炎、風疹ウイルス、ポリオウイルス、黄熱、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ロタウイルス、水痘ウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、天然痘、帯状疱疹、およびその組合せからなる群から選択される。

【０３７１】

一部の実施形態では、細菌は、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ ｗｈｉｐｐｌｅｉ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓからなる群から選択される。一部の実施形態では、細菌は、腸チフス、肺炎球菌、髄膜炎菌、ヘモフィルスＢ、炭疽菌、破傷風トキソイド、Ｂ群髄膜炎菌、ｂｃｇ、コレラ、およびその組合せからなる群から選択される。

【０３７２】

一部の実施形態では、寄生虫は、寄生蠕虫または原生動物である。一部の実施形態では、寄生虫は、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐｐ．（例えば、Ｌ．ｍａｊｏｒ、Ｌ．ｉｎｆａｎｔｕｍ、Ｌ．ｂｒａｚｉｌｉｅｎｓｉｓ、Ｌ．ｄｏｎｏｖａｎｉ、Ｌ．ｃｈａｇａｓｉ、Ｌ．ｍｅｘｉｃａｎａ）、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｓｐｐ．（例えば、Ｐ．ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ、Ｐ．ｖｉｖａｘ、Ｐ．ｏｖａｌｅ、Ｐ．ｍａｌａｒｉａｅ）、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ、Ａｓｃａｒｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ、Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ ｔｒｉｃｈｉｕｒａ、Ｎｅｃａｔｏｒ ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ、およびＳｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｓｐｐ．（Ｓ．ｍａｎｓｏｎｉ、Ｓ．ｈａｅｍａｔｏｂｉｕｍ、Ｓ．ｊａｐｏｎｉｃｕｍ）からなる群から選択される。

【０３７３】
一部の実施形態では、免疫治療薬は、操作された受容体である。一部の実施形態では、操作された受容体は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、またはＢ細胞受容体（ＢＣＲ）、養子Ｔ細胞治療（ＡＣＴ）、またはその誘導体である。他の態様では、操作した受容体は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。一部の態様では、ＣＡＲは、第１世代のＣＡＲである。他の態様では、ＣＡＲは、第２世代のＣＡＲである。また他の態様では、ＣＡＲは、第３世代のＣＡＲである。
【０３７４】
一部の態様では、ＣＡＲは、細胞外部分、膜貫通部分および細胞内部分を含む。一部の態様では、細胞内部分は、少なくとも１つのＴ細胞共刺激ドメインを含む。一部の態様では、Ｔ細胞共刺激ドメインは、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＴＮＦＲＳ９（４－１ＢＢ）、ＴＮＦＲＳＦ４（ＯＸ４０）、ＴＮＦＲＳＦ８（ＣＤ３０）、ＣＤ４０ＬＧ（ＣＤ４０Ｌ）、ＩＣＯＳ、ＩＴＧＢ２（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＫＬＲＣ２（ＮＫＧ２Ｃ）、ＴＮＦＲＳ１８（ＧＩＴＲ）、ＴＮＦＲＳＦ１４（ＨＶＥＭ）またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される。
【０３７５】
一部の態様では、操作された受容体は、標的に結合する。一部の態様では、結合は、疾患または状態に罹患している個体に特異的なＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付ける方法から識別されたペプチドに特異的である。
【０３７６】
一部の態様では、免疫治療薬は、本明細書で詳細に説明される細胞である。一部の態様では、免疫治療薬は、疾患または状態に罹患している個体に特異的なＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付ける方法から識別されたペプチドに特異的に結合する受容体を含む細胞である。一部の態様では、免疫治療薬は、本発明のペプチド／核酸と組み合わせて使用される細胞である。一部の実施形態では、細胞は、患者細胞である。一部の実施形態では、細胞は、Ｔ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍浸潤リンパ球である。
【０３７７】
一部の態様では、状態または疾患を有する対象は、対象のＴ細胞受容体レパートリに基づいて処置される。一部の実施形態では、抗原ワクチンは、対象のＴ細胞受容体レパートリに基づいて選択される。一部の実施形態では、対象は、本明細書に記載の方法を使用して識別された抗原またはペプチドに特異的なＴＣＲを発現するＴ細胞を用いて処置される。一部の実施形態では、対象は、ＴＣＲ、例えば、対象特異的ＴＣＲに特異的な本明細書に記載の方法を使用して識別された抗原またはペプチドを用いて処置される。一部の実施形態では、対象は、ＴＣＲ、例えば、対象特異的ＴＣＲを発現するＴ細胞に特異的な本明細書に記載の方法を使用して識別された抗原またはペプチドを用いて処置される。一部の実施形態では、対象は、対象特異的ＴＣＲに特異的な本明細書に記載の方法を使用して識別された抗原またはペプチドを用いて処置される。
【０３７８】
一部の実施形態では、免疫原性抗原組成物またはワクチンは、対象において識別されたＴＣＲに基づいて選択される。一実施形態では、Ｔ細胞レパートリーの識別および機能的アッセイにおける試験を使用して、状態または疾患を有する対象に投与される免疫原性組成物またはワクチンを決定する。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、抗原ワクチンである。一部の実施形態では、抗原ワクチンは、対象特異的抗原ペプチドを含む。一部の実施形態では、抗原ワクチンに含まれる抗原ペプチドは、抗原に結合する対象特異的ＴＣＲの定量に基づいて選択される。一部の実施形態では、抗原ペプチドは、ＴＣＲに対するペプチドの結合親和性に基づいて選択される。一部の実施形態では、選択は、量と結合親和性との両方の組合せに基づく。例えば、機能的アッセイにおいて抗原に強く結合するが、ＴＣＲレパートリー中に高度に表れないＴＣＲが、抗原ワクチンのための良好な候補であり得るが、これは、ＴＣＲを発現するＴ細胞が有利に増幅されるためである。
【０３７９】

一部の実施形態では、抗原は、ＴＣＲへの結合に基づいて対象に投与するために選択される。一部の実施形態では、疾患または状態を有する対象に由来するＴ細胞などのＴ細胞を拡大増殖させることができる。本明細書に記載の方法を使用して識別された免疫原性抗原ペプチドに特異的なＴＣＲを発現する拡大増殖したＴ細胞を、対象に投与して戻すことができる。一部の実施形態では、好適な細胞、例えば、ＰＢＭＣに、本明細書に記載の方法を使用して識別され、対象に投与される免疫原性抗原ペプチドに特異的なＴＣＲの発現のためのポリヌクレオチドを形質導入またはトランスフェクトする。本明細書に記載の方法を使用して識別される免疫原性抗原ペプチドに特異的なＴＣＲを発現するＴ細胞を拡大増殖させ、対象に投与して戻すことができる。一部の実施形態では、自己の疾患組織と共にインキュベートした場合に細胞溶解活性をもたらす本明細書に記載の方法を使用して識別される免疫原性抗原ペプチドに特異的なＴＣＲを発現するＴ細胞を拡大増殖させ、対象に投与することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して識別される免疫原性抗原ペプチドへの結合における機能的アッセイの結果において使用されるＴ細胞を拡大増殖させ、対象に投与することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して識別される対象特異的免疫原性抗原ペプチドに結合すると決定されたＴＣＲを、Ｔ細胞中で発現させ、対象に投与することができる。

【０３８０】

本明細書に記載の方法は、腫瘍または病原体と関連する抗原などの、選択された抗原に特異的な、Ｔ細胞などの免疫系の細胞の養子移入を含んでもよい。様々な戦略を使用して、例えば、本明細書に記載の方法を使用して識別される免疫原性抗原ペプチドに対する特異性を有する新しいＴＣＲαおよびβ鎖を導入することによって、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の特異性を変更することによってＴ細胞を遺伝的に改変することができる（例えば、米国特許第８，６９７，８５４号；ＰＣＴ特許公開：ＷＯ２００３０２０７６３、ＷＯ２００４０３３６８５、ＷＯ２００４０４４００４、ＷＯ２００５１１４２１５、ＷＯ２００６０００８３０、ＷＯ２００８０３８００２、ＷＯ２００８０３９８１８、ＷＯ２００４０７４３２２、ＷＯ２００５１１３５９５、ＷＯ２００６１２５９６２、ＷＯ２０１３１６６３２１、ＷＯ２０１３０３９８８９、ＷＯ２０１４０１８８６３、ＷＯ２０１４０８３１７３；米国特許第８，０８８，３７９号を参照されたい）。

【０３８１】

キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を使用して、様々な受容体キメラ構築物を用いて、本明細書に記載の方法を使用して識別される免疫原性抗原ペプチドなどの、選択された標的に特異的な、Ｔ細胞などの免疫応答性細胞を生成することができる（例えば、米国特許第５，８４３，７２８号；第５，８５１，８２８号；第５，９１２，１７０号；第６，００４，８１１号；第６，２８４，２４０号；第６，３９２，０１３号；第６，４１０，０１４号；第６，７５３，１６２号；第８，２１１，４２２号；およびＰＣＴ公開Ｗ０９２１５３２２を参照されたい）。代替的なＣＡＲ構築物を、後に続く世代に属するものと特徴付けることができる。第１世代のＣＡＲは、典型的には、例えば、可撓性リンカーにより、例えば、ＣＤ８ａヒンジドメインおよびＣＤ８ａ膜貫通ドメインにより、ＣＤ３ζまたはＦＣＲｙまたはｓｃＦｖ－ＦｃＲｙのいずれかの膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインに連結された、特異的抗体のＶＨに連結されたＶＬを含む、抗原に特異的な抗体の一本鎖可変断片からなる（例えば、米国特許第７，７４１，４６５号；米国特許第５，９１２，１７２号；米国特許第５，９０６，９３６号を参照されたい）。第２世代のＣＡＲは、エンドドメイン内に、ＣＤ２８、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、または４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）などの１つまたは複数の共刺激分子の細胞内ドメイン、例えば、ｓｃＦｖ－ＣＤ２８／ＯＸ４０／４－１ＢＢ－ＣＤ３を組み込む（例えば、米国特許第８，９１１，９９３号；第８，９１６，３８１号；第８，９７５，０７１号；第９，１０１，５８４号；第９，１０２，７６０号；第９，１０２，７６１号を参照されたい）。第３世代のＣＡＲは、ＣＤ３Ｃ鎖、ＣＤ９７、ＧＤＩ１ａ－ＣＤ１８、ＣＤ２、ＩＣＯＳ、ＣＤ２７、ＣＤ１５４、ＣＤＳ、ＯＸ４０、４－１ＢＢ、またはＣＤ２８シグナル伝達ドメインなどの共刺激エンドドメインの組合せ、例えば、ｓｃＦｖ－ＣＤ２８－４－１ＢＢ－ＣＤ３ＣまたはｓｃＦ

ｖ－ＣＤ２８－ＯＸ４０－ＣＤ３Ｑを含む（例えば、米国特許第８，９０６，６８２号；米国特許第８，３９９，６４５号；米国特許第５，６８６，２８１号；ＰＣＴ公開番号ＷＯ２０１４１３４１６５；ＰＣＴ公開番号ＷＯ２０１２０７９０００を参照されたい）。一部の実施形態では、例えば、共刺激を用いる、専門的抗原提示細胞上の抗原との相互作用の後に活性化および拡大増殖するように選択される、抗原特異的Ｔ細胞中でＣＡＲを発現させることによって、共刺激を協調させることができる。さらなる操作された受容体を、免疫応答性細胞上に提供して、例えば、Ｔ細胞攻撃の標的化を改善する、および／または副作用を最小化することができる。

【０３８２】

プロトプラスト融合、リポフェクション、トランスフェクションまたはエレクトロポレーションなどの、代替的な技術を使用して、標的免疫応答性細胞を形質転換することができる。レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、プラスミドまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポゾンなどのトランスポゾンなどの、様々なベクター（米国特許第６，４８９，４５８号；第７，１４８，２０３号；第７，１６０，６８２号；第７，９８５，７３９号；第８，２２７，４３２号を参照されたい）を使用して、例えば、ＣＤ３ζおよびＣＤ２８またはＣＤ１３７のいずれかによる第２世代の抗原特異的ＣＡＲシグナル伝達を使用してＣＡＲを導入することができる。ウイルスベクターは、例えば、ＨＩＶ、ＳＶ４０、ＥＢＶ、ＨＳＶまたはＢＰＶに基づくベクターを含んでもよい。

【０３８３】

形質転換のために標的化される細胞は、例えば、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、調節性Ｔ細胞、ヒト胚性幹細胞、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）またはリンパ系細胞を分化させることができる多能性幹細胞を含んでもよい。所望のＣＡＲを発現するＴ細胞を、例えば、がん抗原および共刺激分子を同時発現する、γ照射された活性化および増殖細胞（ＡＰＣ）との同時培養によって選択することができる。操作されたＣＡＲ　Ｔ細胞を、例えば、ＩＬ－２およびＩＬ－２１などの可溶性因子の存在下で、ＡＰＣ上での同時培養によって拡大増殖させることができる。この拡大増殖は、例えば、記憶ＣＡＲ　Ｔ細胞（例えば、非酵素的デジタルアレイおよび／またはマルチパネルフローサイトメトリーによりアッセイされる）を提供するように実行することができる。このように、抗原を担持する腫瘍に対する特異的細胞傷害活性（必要に応じて、インターフェロン－γなどの所望のケモカインの産生と共に）を有するＣＡＲ　Ｔ細胞を提供することができる。この種類のＣＡＲ　Ｔ細胞を例えば動物モデルにおいて使用して、例えば腫瘍異種移植物を処置することができる。

【０３８４】

前記のものなどの手法を、例えば、結合が、免疫応答性細胞を活性化する、選択された抗原に結合する抗原認識受容体を含む免疫応答性細胞の有効量を投与し、これにより疾患（新生物、病原体感染、自己免疫障害、または同種移植反応など）を処置または防止することによって、新生物または病原体感染などの疾患を有する対象を処置する、および／またはその生存を増加させる方法を提供するために適合させることができる。ＣＡＲ　Ｔ細胞治療における投与は、例えば、シクロホスファミドを用いる、リンパ球枯渇の過程を用いるか、または用いない、例えば、10^6～10^9個の細胞／ｋｇの投与を含んでもよい。

【０３８５】

あり得る有害反応に対して保護するために、操作された免疫応答性細胞に、細胞を特定のシグナルへの曝露に対して脆弱にする導入遺伝子の形態で、トランスジェニック安全性スイッチを装備させることができる。例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＴＫ）遺伝子を、例えば、幹細胞移植後にドナーリンパ球輸注として使用される同種Ｔリンパ球への導入によって、このように使用することができる。そのような細胞中では、ガンシクロビルまたはアシクロビルなどのヌクレオシドプロドラッグの投与は、細胞死を引き起こす。代替的な安全性スイッチ構築物としては、例えば、２つの非機能的ｉｃａｓｐ

９分子と一緒になって活性酵素を形成させる低分子二量体化剤の投与によって誘発される、誘導性カスパーゼ９が挙げられる。細胞増殖制御を実現するための様々な代替的な手法が記載されている（例えば、米国特許公開第２０１３００７１４１４号；ＰＣＴ特許公開ＷＯ２０１１１４６８６２；ＰＣＴ特許公開ＷＯ２０１４０１１９８７；ＰＣＴ特許公開ＷＯ２０１３０４０３７１を参照されたい）。養子治療のさらなる改良では、ゲノム編集を使用して、例えば、編集されたＣＡＲ　Ｔ細胞を提供する、代替的な実現のために免疫応答性細胞を調整することができる。

【０３８６】

細胞治療方法はまた、Ｔ細胞のｅｘ　ｖｉｖｏでの活性化および拡大増殖を含んでもよい。一部の実施形態では、Ｔ細胞を活性化した後、それを必要とする対象にそれらを投与することができる。これらの型の処置の例としては、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）細胞（米国特許第５，１２６，１３２号を参照されたい）、細胞傷害性Ｔ細胞（米国特許第６，２５５，０７３号；および米国特許第５，８４６，８２７号を参照されたい）、拡大増殖した腫瘍流入領域リンパ節細胞（米国特許第６，２５１，３８５号を参照されたい）、および様々な他のリンパ球調製物（米国特許第６，１９４，２０７号；米国特許第５，４４３，９８３号；米国特許第６，０４０，１７７号；および米国特許第５，７６６，９２０号を参照されたい）の使用が挙げられる。

【０３８７】

ｅｘ　ｖｉｖｏで活性化されたＴ細胞集団は、がん、感染性疾患、または他の疾患状態、例えば、自己免疫状態に対する免疫応答を最大限に指揮する状態にあってもよい。活性化のために、少なくとも２つのシグナルを、Ｔ細胞に送達することができる。第１のシグナルは通常、Ｔ細胞表面上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を介して送達される。ＴＣＲの第１のシグナルは通常、ＴＣＲと、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面上にＭＨＣ複合体と共に発現されるペプチド抗原との相互作用の際に誘発される。第２のシグナルは通常、Ｔ細胞の表面上の共刺激受容体を介して送達される。共刺激受容体は、一般的には、ＡＰＣの表面上に発現される対応するリガンドまたはサイトカインによって誘発される。

【０３８８】

本明細書に記載の方法を使用して識別された免疫原性抗原ペプチドに特異的なＴ細胞を取得し、疾患を処置または防止する方法において使用することができることが企図される。これに関して、本開示は、対象において疾患または状態を処置または防止する方法であって、対象に、本明細書に記載の方法を使用して識別された免疫原性抗原ペプチドに特異的な細胞を含む細胞集団を、対象における疾患を処置または防止するのに有効な量で投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、対象において疾患を処置または防止する方法は、疾患反応性Ｔ細胞について富化された細胞集団を対象に、哺乳動物においてがんを処置または防止するのに有効な量で投与するステップを含む。細胞は、対象にとって同種または自己である細胞であってもよい。

【０３８９】

本開示は、対象に、抗原性ペプチドまたはワクチンを投与することによって、対象において疾患特異的免疫応答を誘導する、疾患に対してワクチン接種する、対象において疾患の症状を処置する、および／または軽減する方法をさらに提供する。

【０３９０】

本開示のペプチドまたは組成物を、ＣＴＬ応答を誘導するのに十分な量で投与することができる。抗原性ペプチドまたはワクチン組成物を、単独で、または他の治療剤と組み合わせて投与することができる。例示的な治療剤としては、限定されるものではないが、化学療法剤または生物療法剤、放射線、または免疫治療が挙げられる。特定の疾患のための任意の好適な治療処置を投与することができる。化学療法剤および生物療法剤の例としては、限定されるものではないが、アルデスロイキン、アルトレタミン、アミホスチン、アスパラギナーゼ、ブレオマイシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クラドリビン、シサプリド、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラビン、デカルバジン（ＤＴＩＣ）、ダクチノマイシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、ドロナビノール、エ

ポエチンアルファ、エトポシド、フィルグラスチム、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、グラニセトロン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、インターフェロンアルファ、イリノテカン、ランソプラゾール、レバミソール、ロイコボリン、メゲストロール、メスナ、メトトレキサート、メトクロプラミド、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、オメプラゾール、オンダンセトロン、パクリタキセル（Ｔａｘｏｌ（登録商標））、ピロカルピン、プロクロロペラジン、リツキシマブ、タモキシフェン、タキソール、トポテカン塩酸塩、トラスツズマブ、ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビノレルビン酒石酸塩が挙げられる。さらに、対象に、抗免疫抑制剤または免疫刺激剤をさらに投与することができる。例えば、対象に、抗ＣＴＬＡ抗体または抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１をさらに投与することができる。

【０３９１】

当業者であれば、ワクチン組成物に含まれる各ペプチドの量および投薬レジメンを決定することができる。例えば、ペプチドまたはそのバリアントを、静脈内（ｉ．ｖ．）注射、皮下（ｓ．ｃ．）注射、皮内（ｉ．ｄ．）注射、腹腔内（ｉ．ｐ．）注射、筋肉内（ｉ．ｍ．）注射のために調製することができる。ペプチド注射の例示的方法としては、ｓ．ｃ．、ｉ．ｄ．、ｉ．ｐ．、ｉ．ｍ．、およびｉ．ｖ．が挙げられる。ＤＮＡ注射の例示的方法としては、ｉ．ｄ．、ｉ．ｍ．、ｓ．ｃ．、ｉ．ｐ．、およびｉ．ｖ．が挙げられる。ワクチン組成物の他の投与方法は、当業者には公知である。

【０３９２】

医薬組成物中に存在するペプチドの選択、数および／または量が疾患および／または患者特異的であるように、医薬組成物をコンパイルすることができる。例えば、副作用を回避するために、所与の組織中での親タンパク質の発現パターンによって、ペプチドの正確な選択を誘導することができる。選択は、特定の疾患型、疾患の状態、初期の処置レジメン、患者の免疫状態、および患者のＨＬＡハプロタイプに依存してもよい。さらに、本開示によるワクチンは、特定の患者の個人的必要性に応じて、個体に合わせた成分を含有してもよい。例としては、特定の患者における関連抗原の発現によるペプチドの量の変化、個人のアレルギーまたは他の処置に起因する望ましくない副作用、および処置の第１のラウンドまたはスキームの後の２回目の処置のための調整が挙げられる。

疾患特異的抗原の産生

【０３９３】

本開示は、少なくとも部分的には、１つまたは複数の疾患特異的抗原を含む患者の免疫系を提供する能力に基づくものである。当業者であれば、本開示および当技術分野における知識から、そのような疾患特異的抗原を生成する様々な方法が存在することを理解するであろう。一般に、そのような疾患特異的抗原を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで生成することができる。疾患特異的抗原を、ペプチドまたはポリペプチドとしてｉｎ　ｖｉｔｒｏで生成した後、ワクチンまたは免疫原性組成物に製剤化し、対象に投与することができる。本明細書でさらに詳細に説明されるように、そのようなｉｎ　ｖｉｔｒｏでの生成は、例えば、ペプチド合成または様々な細菌、真核、もしくはウイルス組換え発現系のいずれかにおけるＤＮＡもしくはＲＮＡ分子からのペプチド／ポリペプチドの発現、次いで、発現されたペプチド／ポリペプチドの精製などの、当業者には公知の様々な方法によって行うことができる。あるいは、疾患特異的抗原をコードする分子（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ウイルス発現系など）を対象中に導入することによってｉｎ　ｖｉｖｏで疾患特異的抗原を生成してもよく、その際、コードされた疾患特異的抗原が発現される。抗原のｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏでの生成の方法は、医薬組成物および療法の送達方法に関するため、それも本明細書にさらに記載される。

【０３９４】

一部の実施形態では、本開示は、改変された抗原性ペプチドを含む。改変は、抗原性ペプチド自体の一次アミノ酸配列を変化させない共有化学的改変を含んでもよい。改変は、所望の特性、例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏでの半減期の延長、安定性の増大、クリアランスの低下、免疫原性もしくはアレルゲン性の変化、特定の抗体、細胞標的化、抗原取込み、Ｍ

ＨＣ親和性、ＭＨＣ安定性、または抗原提示の上昇を可能にすることを有するペプチドを生成することができる。実行することができる抗原性ペプチドに対する変化としては、限定されるものではないが、担体タンパク質へのコンジュゲーション、リガンドへのコンジュゲーション、抗体へのコンジュゲーション、ＰＥＧ化、ポリシアル化、ＨＥＳ化、組換えＰＥＧ模倣物、Ｆｃ融合、アルブミン融合、ナノ粒子付着、ナノ粒子封入、コレステロール融合、鉄融合、アシル化、アミド化、グリコシル化、側鎖酸化、リン酸化、ビオチン化、界面活性物質の添加、アミノ酸模倣物の添加、または非天然アミノ酸の添加が挙げられる。

【０３９５】

短い血漿半減期またはプロテアーゼ分解に対する感受性と関連する問題を、様々な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンのいずれかへのポリペプチド配列のコンジュゲーションまたは連結（例えば、典型的には、タンパク質と、非タンパク質性ポリマー、例えば、ＰＥＧの両方に共有結合する連結部分を介する）を含む、様々な改変によって克服することができる。そのようなＰＥＧにコンジュゲートした生体分子は、より良好な物理的および温度安定性、酵素的分解に対する感受性に対する保護、可溶性の増大、より長いｉｎｖｉｖｏでの循環半減期およびクリアランスの低下、免疫原性および抗原性の低下、ならびに毒性の低減などの、臨床的に有用な特性を有することが示されている。

【０３９６】

ポリペプチド配列へのコンジュゲーションにとって好適なＰＥＧは、一般的には室温で水溶性であり、一般式Ｒ（Ｏ－ＣＨ２－ＣＨ２）$_n$Ｏ－Ｒ（式中、Ｒは水素またはアルキルもしくはアルカノール基などの保護基であり、ｎは１～１０００の整数である）を有する。Ｒが保護基である場合、それは一般的には１～８個の炭素を有する。ポリペプチド配列にコンジュゲートされるＰＥＧは、線状または分枝状であってもよい。分枝状ＰＥＧ誘導体、「スター－ＰＥＧ」およびマルチアームＰＥＧが、本開示によって企図される。

【０３９７】

本開示はまた、ＰＥＧが異なるｎ値を有し、したがって、様々な異なるＰＥＧが特定の比率で存在する、コンジュゲートの組成物も企図する。例えば、一部の組成物は、ｎ＝１、２、３および４であるコンジュゲートの混合物を含む。一部の組成物では、ｎ＝１であるコンジュゲートの百分率は１８～２５％であり、ｎ＝２であるコンジュゲートの百分率は５０～６６％であり、ｎ＝３であるコンジュゲートの百分率は１２～１６％であり、ｎ＝４であるコンジュゲートの百分率は最大で５％である。そのような組成物を、当技術分野で公知の反応条件および精製方法によって生成することができる。例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーを使用して、コンジュゲートを分離した後、例えば、所望の数のＰＥＧが付着した、非改変タンパク質配列を含まない精製された、他の数のＰＥＧが付着したコンジュゲートに由来するコンジュゲートを含有する画分を同定することができる。

【０３９８】

末端反応基（「スペーサー」）を介して、本発明のポリペプチドにＰＥＧを結合することができる。スペーサーは、例えば、１つまたは複数のポリペプチド配列の遊離アミノ基またはカルボキシル基と、ポリエチレングリコールとの間の結合を媒介する末端反応基である。遊離アミノ基に結合することができるスペーサーを有するＰＥＧは、ポリエチレングリコールのコハク酸エステルを、Ｎ－ヒドロキシスクシニルイミドで活性化することによって調製することができるＮ－ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコールを含む。遊離アミノ基に結合することができる別の活性化ポリエチレングリコールは、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルを、シアヌル酸クロリドと反応させることによって調製することができる２，４－ビス（Ｏ－メトキシポリエチレングリコール）－６－クロロ－ｓ－トリアジンである。遊離カルボキシル基に結合される活性化ポリエチレングリコールは、ポリオキシエチレンジアミンを含む。

【０３９９】

スペーサーを有するＰＥＧへの、１つまたは複数の本開示のポリペプチド配列のコンジ

ュゲーションを、様々な従来の方法によって実行することができる。例えば、コンジュゲーション反応を、５～１０のｐＨの溶液中、４℃～室温の温度で、３０分～２０時間にわたって、４：１～３０：１の試薬：タンパク質のモル比を利用して実行することができる。反応条件を、主として所望の置換度をもたらす反応を方向付けるように選択することができる。一般に、低温、低ｐＨ（例えば、ｐＨ＝５）、および短い反応時間は、付着するＰＥＧの数を減少させる傾向があるが、高温、中性から高いｐＨ（例えば、ｐＨ＞７）、およびより長い反応時間は、付着するＰＥＧの数を増加させる傾向がある。当技術分野で公知の様々な手段を使用して、反応を終結させることができる。一部の実施形態では、反応は、反応混合物を酸性化し、例えば、－２０℃で凍結することによって終結する。

【０４００】

本開示はまた、ＰＥＧ模倣物の使用も企図する。いくつかの追加の有利な特性を提供しながら、ＰＥＧの属性（例えば、血清半減期の増強）を保持する組換えＰＥＧ模倣物が開発されている。例えば、目的のペプチドまたはタンパク質薬物（例えば、Ａｍｕｎｉｘ’ＸＴＥＮ技術；Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ、ＣＡ）に組換え的に既に融合した、ＰＥＧと類似する伸長したコンフォメーションを形成することができる単純なポリペプチド鎖（例えば、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、ＳｅｒおよびＴｈｒを含む）を生成することができる。これにより、製造プロセス中の追加のコンジュゲーションステップの必要性がなくなる。さらに、確立された分子生物学的技術により、ポリペプチド鎖の側鎖組成の制御が可能になり、免疫原性および製造特性の最適化が可能となる。

【０４０１】

グリコシル化は、タンパク質の物理特性に影響し、タンパク質の安定性、分泌、および細胞内局在化において重要でもある。適切なグリコシル化は、生物学的活性にとって重要であり得る。事実、真核生物に由来する一部の遺伝子は、タンパク質をグリコシル化するための細胞プロセスを欠く細菌（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）中で発現された場合、そのグリコシル化の欠如のため、回収されるタンパク質に活性がほとんどないか、または全くない。グリコシル化部位の付加を、アミノ酸配列を変化させることによって遂行することができる。ポリペプチドに対する変化を、例えば、１つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基（Ｏ－連結グリコシル化部位に関する）またはアスパラギン残基（Ｎ－連結グリコシル化部位に関する）の付加、またはそれによる置換によって作製することができる。Ｎ－連結およびＯ－連結オリゴ糖の構造および各型において見出される糖残基は異なっていてもよい。一般に両方の型において見出される糖の１つの型は、Ｎ－アセチルノイラミン酸である（以下、シアル酸と呼ぶ）。シアル酸は、通常、Ｎ－連結とＯ－連結オリゴ糖の両方の末端残基であり、その負電荷のため、糖タンパク質に対して酸性の特性を付与することができる。本開示の実施形態は、Ｎ－グリコシル化バリアントの生成および使用を含む。

【０４０２】

任意選択で、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生成されるように予め選択された塩基でポリペプチドをコードするＤＮＡを変異させることにより、ＤＮＡレベルでの変化によって、本開示のポリペプチド配列を変化させることができる。ポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的または酵素的連結によるものである。炭水化物の除去を、化学的もしくは酵素的に、またはグリコシル化されるアミノ酸残基をコードするコドンの置換により遂行することができる。化学的脱グリコシル化技術は公知であり、ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は様々なエンドおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成することができる。

【０４０３】

コンジュゲーションのための追加の好適な成分および分子としては、例えば、リンパ系を標的化するための分子、サイログロブリン；ヒト血清アルブミン（ＨＡＳ）などのアルブミン；破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリ（Ｄ－リシン：Ｄ－グルタミン酸）などのポリアミノ酸；ロタウイルスのＶＰ６ポリペプチド；インフルエンザウイルスヘマグルチニン、インフルエンザウイルス核タンパク質；キーホールリンペットヘモシア

ニン（ＫＬＨ）；ならびにＢ型肝炎ウイルスコアタンパク質および表面抗原；または前記の任意の組合せが挙げられる。

【０４０４】

ＨＳＡをコードするＤＮＡ、またはその断片が、１つまたは複数のポリペプチド配列をコードするＤＮＡに接合されるように、本開示の１つまたは複数のポリペプチドへのアルブミンの融合を、例えば、遺伝子操作によって達成することができる。その後、好適な宿主を、例えば、好適なプラスミドの形態の融合されたヌクレオチド配列を用いて形質転換またはトランスフェクトして、融合ポリペプチドを発現させることができる。発現を、例えば、原核もしくは真核細胞からｉｎ　ｖｉｔｒｏで、または例えば、トランスジェニック生物からｉｎ　ｖｉｖｏで行うことができる。本開示の一部の実施形態では、融合タンパク質の発現は、哺乳動物細胞株、例えば、ＣＨＯ細胞株中で行われる。形質転換は、その周囲からの外因性遺伝物質（外因性ＤＮＡ）の直接的な取込み、組み込みおよび発現ならびに細胞膜を介する取込みの結果である細胞の遺伝子変化を指すために本明細書で広く使用される。形質転換は、一部の細菌種において自然に起こるが、それを他の細胞中で人工的な手段によって行うこともできる。さらに、アルブミン自体を改変して、その循環半減期を延長することができる。改変されたアルブミンの１つまたは複数のポリペプチドへの融合を、上記の遺伝子操作技術により、または化学的コンジュゲーションにより実現することができる；得られる融合分子は、非改変型アルブミンとの融合物のものを超える半減期を有する（ＷＯ２０１１／０５１４８９を参照されたい）。コンジュゲートした脂肪酸鎖（アシル化）を介するアルブミン結合などの、いくつかのアルブミン結合戦略が、直接的融合の代替物として開発されている。血清アルブミンは脂肪酸の輸送タンパク質であるため、アルブミン結合活性を有するこれらの天然リガンドが、低分子タンパク質治療薬の半減期の延長のために使用されている。例えば、糖尿病のための認可された製品であるインスリンデテミル（ＬＥＶＥＭＩＲ）は、遺伝的に改変されたインスリンにコンジュゲートされたミリスチル鎖を含み、長期作用型インスリン類似体が得られる。

【０４０５】

別の型の改変は、別のタンパク質（例えば、対象タンパク質とは異種のアミノ酸配列を有するタンパク質）などの、ポリペプチド配列のＮおよび／もしくはＣ末端で１つもしくは複数の追加の成分もしくは分子、または担体分子をコンジュゲートする（例えば、連結する）ことである。したがって、例示的なポリペプチド配列を、別の成分または分子とのコンジュゲートとして提供することができる。

【０４０６】

コンジュゲート改変は、第２の分子の追加の、または相補的な機能または活性と共に活性を保持するポリペプチド配列をもたらし得る。例えば、ポリペプチド配列を分子にコンジュゲートさせて、例えば、溶解、保存、ｉｎ　ｖｉｖｏもしくは貯蔵半減期または安定性、免疫原性の低下、ｉｎ　ｖｉｖｏでの遅延もしくは制御放出などを容易にすることができる。他の機能または活性は、非コンジュゲート化ポリペプチド配列と比較して毒性が低いコンジュゲート、非コンジュゲート化ポリペプチド配列よりも効率的に細胞もしくは臓器の型を標的化するコンジュゲート、または本明細書に記載される障害もしくは疾患（例えば、糖尿病）と関連する原因もしくは効果にさらに対抗する薬物を含む。

【０４０７】

また、ポリペプチドを、タンパク質などの大きく、ゆっくりと代謝される大分子；セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズなどの多糖；ポリグルタミン酸、ポリリシンなどのポリマーアミノ酸；アミノ酸コポリマー；不活化ウイルス粒子；ジフテリア、破傷風、コレラ、白血球毒素分子に由来するトキソイドなどの不活化細菌毒素；不活化細菌；および樹状細胞にコンジュゲートすることもできる。

【０４０８】

コンジュゲーションのための追加の候補成分および分子としては、単離または精製にとって好適なものが挙げられる。特定の非限定例として、ビオチン（ビオチン－アビジン特異的結合対）、抗体、受容体、リガンド、レクチン、または例えば、プラスチックもしく

はポリスチレンビーズ、プレートもしくはビーズ、磁気ビーズ、試験紙、および膜などの固相支持体を含む分子などの結合分子が挙げられる。陽イオン交換クロマトグラフィーなどの精製方法を使用して、電荷差によってコンジュゲートを分離し、コンジュゲートをその様々な分子量に効率的に分離することができる。陽イオン交換クロマトグラフィーにより得られる画分の含量を、従来の方法、例えば、質量分析、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、または分子量によって分子実体を分離するための他の公知の方法を使用して分子量によって同定することができる。

【０４０９】

一部の実施形態では、本開示のポリペプチド配列のアミノまたはカルボキシル末端を、免疫グロブリンのＦｃ領域（例えば、ヒトＦｃ）と融合して、融合コンジュゲート（または融合分子）を形成することができる。Ｆｃ融合コンジュゲートは、バイオ医薬品の全身半減期を増加させることが示されており、したがって、バイオ医薬品は、より低頻度の投与を必要とし得る。

【０４１０】

Ｆｃは、血管に並ぶ内皮細胞中の新生Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に結合し、結合時に、Ｆｃ融合分子は分解から保護され、循環中に再放出され、分子を循環中により長く維持する。このＦｃ結合は、内在性ＩｇＧがその長い血漿半減期を保持する機構であると考えられる。より最近のＦｃ融合技術は、単一コピーのバイオ医薬品を、抗体のＦｃ領域に連結して、伝統的なＦｃ融合コンジュゲートと比較して、バイオ医薬品の薬物動態特性および薬力学的特性を最適化する。

【０４１１】

本開示は、１つまたは複数の特性を改善するための、ポリペプチドの、現在公知の、または将来開発される、他の改変の使用を企図する。本開示のポリペプチドの循環半減期を延長する、安定性を増大させる、クリアランスを低下させる、または免疫原性もしくはアレルゲン性を変化させるための１つのそのような方法は、分子の特徴を改変するために他の分子に連結されたヒドロキシエチルスターチ誘導体を利用するＨＥＳ化によるポリペプチド配列の改変を含む。ＨＥＳ化の様々な態様は、例えば、米国特許出願第２００７／０１３４１９７号および第２００６／０２５８６０７号に記載されている。

Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏペプチド／ポリペプチド合成

【０４１２】

タンパク質またはペプチドを、標準的な分子生物学的技術によるタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの発現、天然の供給源からのタンパク質もしくはペプチドの単離、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの翻訳、またはタンパク質もしくはペプチドの化学的合成を含む、当業者には公知の任意の技術によって作製することができる。

【０４１３】

ペプチドを、汚染細菌または動物物質を含まない試薬を利用して容易に化学合成することができる（Merrifield RB: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of atetrapeptide. J. Am. Chem. Soc.８５巻：２１４９～５４頁、１９６３年）。一部の実施形態では、抗原性ペプチドは、（１）均一な合成および切断条件を使用するマルチチャネル機器上での平行固相合成；（２）カラムストリッピングを用いるＲＰ－ＨＰＬＣカラム上での精製；ペプチド間での置き換えではなく再洗浄；次いで、（３）最も有益なアッセイの限定されたセットを用いる分析によって調製される。製造管理および品質管理に関する基準（ＧＭＰ）フットプリントを、個々の患者に関してペプチドのセットの周囲で定義することができ、したがって、異なる患者についてペプチドの合成間でのみ一式変更手順を要する。

【０４１４】

あるいは、本発明の抗原性ペプチドをコードする核酸（例えば、ポリヌクレオチド）を使用して、抗原性ペプチドをｉｎ　ｖｉｔｒｏで生成することができる。ポリヌクレオチドは、例えば、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＰＮＡ、ＣＮＡ、ＲＮＡ、一本鎖および／もしくは二本鎖、または天然型もしくは安定化型のポリヌクレオチド、例えば、ホスホロチエート骨

格を有するポリヌクレオチド、またはその組合せであってもよく、それがペプチドをコードする限り、イントロンを含有することができる。一実施形態では、ペプチドを生成するためにｉｎ ｖｉｔｒｏでの翻訳が使用される。ポリペプチドを発現することができる発現ベクターを調製することもできる。当業者が使用することができる多くの例示的な系が存在する（例えば、Ｒｅｔｉｃ Ｌｙｓａｔｅ ＩＶＴ Ｋｉｔ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）。異なる細胞型のための発現ベクターが当技術分野で周知であり、過度の実験なく選択することができる。一般に、ＤＮＡを、発現のための適切な向きに、かつ正確なリーディングフレームでプラスミドなどの発現ベクター中に挿入する。必要に応じて、ＤＮＡを、所望の宿主（例えば、細菌）によって認識される適切な転写および翻訳調節性制御ヌクレオチド配列に連結することができるが、そのような制御は、一般的には、発現ベクター中で利用可能である。次いで、ベクターを、標準的な技術を使用してクローニングのための宿主細菌中に導入する（例えば、Sambrookら（１９８９年）、Molecular Cloning, ALaboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.を参照されたい）。

【０４１５】

単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター、ならびに発現ベクターを含有する宿主細胞も企図される。抗原性ペプチドを、所望の抗原性ペプチドをコードするＲＮＡまたはｃＤＮＡ分子の形態で提供することができる。本開示の１つまたは複数の抗原性ペプチドを、単一の発現ベクターによってコードさせることができる。

【０４１６】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、宿主細胞からのポリペプチドの発現および／または分泌を助けるポリヌクレオチド（例えば、細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列）に同じリーディングフレームで融合された疾患特異的抗原性ペプチドのコード配列を含んでもよい。リーダー配列を有するポリペプチドは、プレタンパク質であり、宿主細胞によって切断されて成熟形態のポリペプチドを形成するリーダー配列を有してもよい。

【０４１７】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、コードされたポリペプチドの精製を可能にし、次いで、個別化された疾患ワクチンまたは免疫原性組成物中に組み込むことができるマーカー配列に同じリーディングフレームで融合された疾患特異的抗原性ペプチドのコード配列を含んでもよい。例えば、マーカー配列は、細菌宿主の場合、マーカーに融合された成熟ポリペプチドの精製を提供するｐＱＥ－９ベクターによって供給されるヘキサ－ヒスチジンタグであってもよく、またはマーカー配列は、哺乳動物宿主（例えば、ＣＯＳ－７細胞）が使用される場合、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するヘマグルチニン（ＨＡ）タグであってもよい。追加のタグとしては、限定されるものではないが、カルモジュリンタグ、ＦＬＡＧタグ、Ｍｙｃタグ、Ｓタグ、ＳＢＰタグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、Ｖ５タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ビオチンカルボキシル担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、ＧＳＴタグ、蛍光タンパク質タグ（例えば、緑色蛍光タンパク質タグ）、マルトース結合タンパク質タグ、Ｎｕｓタグ、Ｓｔｒｅｐタグ、チオレドキシンタグ、ＴＣタグ、Ｔｙタグなどが挙げられる。

【０４１８】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、複数の抗原性ペプチドを生成することができる単一のコンカテマー化した抗原性ペプチド構築物を作製するために同じリーディングフレームで融合された１つまたは複数の疾患特異的抗原性ペプチドのコード配列を含んでもよい。

【０４１９】

一部の実施形態では、本発明の疾患特異的抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも６０％同一、少なくとも６５％同一、少なくとも７０％同一、少なくとも７５％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、少

なくとも９５％同一、または少なくとも９６％、９７％、９８％もしくは９９％同一であるヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子を提供することができる。

【０４２０】

本明細書に記載される単離された疾患特異的抗原性ペプチドを、当技術分野で公知の任意の好適な方法によってｉｎ　ｖｉｔｒｏで（例えば、実験室で）生成することができる。そのような方法は、直接的なタンパク質合成方法から、単離されたポリペプチド配列をコードするＤＮＡ配列の構築および好適な形質転換宿主中でのこれらの配列の発現までの範囲である。一部の実施形態では、目的の野生型タンパク質をコードするＤＮＡ配列を単離または合成することにより、組換え技術を使用してＤＮＡ配列を構築する。任意選択で、部位特異的変異誘発によって配列を変異させて、その機能的類似体を提供することができる。例えば、Zoellerら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA ８１巻：５６６２～５０６６
頁（１９８４年）および米国特許第４，５８８，５８５号を参照されたい。

【０４２１】

一部の実施形態では、目的のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列を、オリゴヌクレオチド合成装置を使用する化学合成によって構築することができる。そのようなオリゴヌクレオチドを、所望のポリペプチドのアミノ酸配列および目的の組換えポリペプチドが生成される宿主細胞における好ましいコドンの選択に基づいて設計することができる。標準的な方法を適用して、目的の単離されたポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を使用して、復帰翻訳される遺伝子を構築することができる。さらに、特定の単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有するＤＮＡオリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの一部をコードするいくつかの小さいオリゴヌクレオチドを合成した後、ライゲートすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、典型的には、相補的集合のための５’または３’突出部を含有する。

【０４２２】

一度集合したら（例えば、合成、部位特異的変異誘発、または別の方法により）、目的の特定の単離されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現ベクター中に挿入し、任意選択で、所望の宿主中でのタンパク質の発現にとって適切な発現制御配列に作動可能に連結する。適切な集合を、ヌクレオチド配列決定、制限マッピング、および好適な宿主中での生物学的活性ポリペプチドの発現によって確認することができる。当技術分野では周知のように、宿主中でのトランスフェクトされた遺伝子の高い発現レベルを得るために、遺伝子を、選択された発現宿主において機能的である転写および翻訳発現制御配列に作動可能に連結することができる。

【０４２３】

組換え発現ベクターを使用して、疾患特異的抗原性ペプチドをコードするＤＮＡを増幅し、発現させることができる。組換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫遺伝子に由来する好適な転写または翻訳調節エレメントに作動可能に連結した、疾患特異的抗原性ペプチドまたは生物等価類似体をコードする合成またはｃＤＮＡ由来ＤＮＡ断片を有する複製可能なＤＮＡ構築物である。転写単位は一般に、本明細書に詳述されるような、（１）遺伝子エレメントまたは遺伝子発現において調節的な役割を有するエレメント、例えば、転写プロモーターまたはエンハンサー、（２）ｍＲＮＡに転写され、タンパク質に翻訳される構造またはコード配列、ならびに（３）適切な転写および翻訳開始および終結配列の集合を含む。そのような調節エレメントは、転写を制御するためのオペレーター配列を含んでもよい。通常、複製起点によって提供される、宿主中で複製する能力、および形質転換体の認識を容易にするための選択遺伝子を追加で組み込むことができる。ＤＮＡ領域は、それらが互いに機能的に関連する場合、作動可能に連結する。例えば、シグナルペプチド（分泌リーダー）のためのＤＮＡは、それがポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現される場合、ポリペプチドのためのＤＮＡに作動可能に連結する；プロモーターは、それが配列の転写を制御する場合、コード配列に作動可能に連結する

；またはリボソーム結合部位は、それが翻訳を可能にするように配置される場合、コード配列に作動可能に連結する。一般に、作動可能に連結するとは、連続的であることを意味し、分泌リーダーの場合、連続的であり、リーディングフレームにあることを意味する。酵母発現系における使用を意図される構造エレメントは、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。あるいは、リーダーまたは輸送配列を含まない組換えタンパク質が発現される場合、それはＮ末端メチオニン残基を含んでもよい。次いで、任意選択で、この残基を発現された組換えタンパク質から切断して、最終産物を提供することができる。

【０４２４】

真核宿主、特に、哺乳動物またはヒトのための有用な発現ベクターとしては、例えば、ＳＶ４０、ウシパピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルスに由来する発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主のための有用な発現ベクターとしては、ｐＣＲ１、ｐＢＲ３２２、ｐＭＢ９およびその誘導体などのＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉに由来するプラスミド、Ｍ１３および線維性一本鎖ＤＮＡファージなどの、より広い宿主範囲のプラスミドなどの、公知の細菌プラスミドが挙げられる。

【０４２５】

ポリペプチドの発現のための好適な宿主細胞としては、適切なプロモーターの制御下にある原核生物、酵母、昆虫または高等真核細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉまたは桿菌が挙げられる。高等真核細胞としては、哺乳動物起源の確立された細胞株が挙げられる。無細胞翻訳系を用いることもできる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主と共に使用するための適切なクローニングおよび発現ベクターは、当技術分野で周知である（Pouwelsら、Cloning Vectors: A LaboratoryManual、Elsevier、N.Y.、１９８５年を参照されたい）。

【０４２６】

様々な哺乳動物または昆虫細胞培養系も、組換えタンパク質を発現させるために有利に用いられる。そのようなタンパク質は一般的には正確に折り畳まれ、適切に改変され、完全に機能的であるため、哺乳動物細胞中での組換えタンパク質の発現を行うことができる。好適な哺乳動物宿主細胞株の例としては、Gluzman（Cell ２３巻：１７５頁、１９８１年）により記載された、サル腎臓細胞のＣＯＳ－７株、および例えば、Ｌ細胞、Ｃ１２７、３Ｔ３、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）、２９３、ＨｅＬａおよびＢＨＫ細胞株などの、適切なベクターを発現することができる他の細胞株が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、発現される遺伝子に連結された好適なプロモーターおよびエンハンサー、および他の５’または３’隣接非転写配列などの非転写エレメント、ならびに必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、および転写終結配列などの５’または３’非翻訳配列を含んでもよい。昆虫細胞中での異種タンパク質の生成のためのバキュロウイルス系が、LuckowおよびSummers、Bio/Technology６巻：４７頁（１９８８年）によって概説されている。

【０４２７】

形質転換された宿主により生成されるタンパク質を、任意の好適な方法に従って精製することができる。そのような標準的な方法としては、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティーおよびサイズカラムクロマトグラフィーなど）、遠心分離、示差溶解度、またはタンパク質精製のための他の標準的な技術によるものが挙げられる。ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼなどの親和性タグを、タンパク質に付着させ、適切なアフィニティーカラムの通過による容易な精製を可能にすることができる。単離されたタンパク質を、タンパク質分解、核磁気共鳴およびｘ線結晶解析などの技術を使用して物理的に特徴付けることもできる。例えば、培養培地中に組換えタンパク質を分泌する系に由来する上清を、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば、ＡｍｉｃｏｎまたはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ限外濾過ユニットを使用して最初に濃縮することができる。濃縮ステップの後、濃縮物を好適な精製マトリックスに加えることができる。あるいは

、陰イオン交換樹脂、例えば、ペンダントジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）基を有するマトリックスまたは基質を用いることができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製において一般的に用いられる他の型であってもよい。あるいは、陽イオン交換ステップを用いることができる。好適な陽イオン交換体は、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスを含む。最後に、疎水性ＲＰ－ＨＰＬＣ媒体、例えば、ペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを用いる１つまたは複数の逆相高速液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ）ステップを用いて、がん幹細胞タンパク質－Ｆｃ組成物をさらに精製することができる。様々な組合せでは、前記精製ステップの一部または全部を用いて、均一な組換えタンパク質を提供することもできる。

【０４２８】

細菌培養物中で生成される組換えタンパク質を、例えば、細胞ペレットからの初期抽出、次いで、１または複数の濃縮、塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーステップにより単離することができる。高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を、最終的な精製ステップのために用いることができる。組換えタンパク質の発現において用いられる微生物細胞を、凍結－解凍サイクリング、超音波、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用などの任意の従来の方法によって破壊することができる。

Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏペプチド／ポリペプチド合成

【０４２９】

本開示はまた、ｉｎ　ｖｉｖｏで、例えば、ＤＮＡ／ＲＮＡワクチンの形態で、抗原性ペプチド／ポリペプチドを、それを必要とする対象に送達するためのビヒクルとしての核酸分子の使用も企図する（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１２／１５９６４３およびＷＯ２０１２／１５９７５４を参照されたい）。

【０４３０】

一部の実施形態では、プラスミドの使用により、抗原を、それを必要とする患者に投与することができる。これらのものは、通常は、目的の遺伝子（または相補的ＤＮＡ）のｉｎ　ｖｉｖｏでの転写および翻訳を駆動する強力なウイルスプロモーターからなるプラスミドである（Morら（１９９５年）、The Journal of Immunology １５５巻（４号）：２０３９～２０４６頁）。時には、イントロンＡを、ｍＲＮＡ安定性を改善し、従って、タンパク質発現を増加させるために含有させることもできる（Leitnerら（１９９７年）、The Journal of Immunology １５９巻（１２号）：６１１２～６１１９頁）。プラスミドはまた、ウシ成長ホルモンまたはウサギベーターグロブリンポリアデニル化配列などの、強力なポリアデニル化／転写終結シグナルを含む（Alarconら（１９９９年）、Adv. Parasitol. Advances inParasitology ４２巻：３４３～４１０頁；Robinsonら（２０００年）、Adv. Virus Res. Advances in Virus Research ５５巻：１～７４頁；Bohmetら（１９９６年）、Journal of ImmunologicalMethods １９３巻（１号）：２９～４０頁）。１つより多い免疫原を発現させるため、または免疫原および免疫賦活性タンパク質を発現させるために、時には、マルチシストロンベクターが構築されることもある（Lewisら（１９９９年）、Advances in Virus Research(Academic Press) ５４巻：１２９～８８頁）。

【０４３１】

プラスミドを、いくつかの異なる方法によって動物組織中に導入することができる。２つの最も一般的な手法は、標準的な皮下注射針、および遺伝子銃送達を使用する、生理食塩水中でのＤＮＡの注射である。ＤＮＡワクチンプラスミドの構築およびこれらの２つの方法による宿主へのその後の送達の概略図は、Scientific American (Weinerら（１９９９年）、ScientificAmerican ２８１巻（１号）：３４～４１頁）に例示されている。生理食塩水中での注射は、通常、骨格筋において筋肉内に（ＩＭ）、または皮内に（ＩＤ）、細胞外空間に送達されるＤＮＡを用いて行われる。これを、ブピバカインなどの筋毒素

で筋線維を一時的に損傷することによるエレクトロポレーションにより；または生理食塩水もしくはスクロースの高張溶液を使用することにより補助することができる（Alarconら（１９９９年）、Adv. Parasitol. Advances inParasitology ４２巻：３４３～４１０頁）。この送達方法に対する免疫応答は、針の型、針の整列、注入速度、注入容量、筋肉の型、ならびに注射される動物の年齢、性別および生理的条件などの多くの因子によって影響され得る（Alarconら（１９９９年）、Adv. Parasitol. Advances inParasitology ４２巻：３４３～４１０頁）。

【０４３２】

他の一般的に使用される送達方法である遺伝子銃送達は、促進剤として圧縮ヘリウムを使用して、金またはタングステン微粒子上に吸着されたプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）を標的細胞中に弾道的に加速する（Alarconら（１９９９年）、Adv. Parasitol. Advances inParasitology ４２巻：３４３～４１０頁；Lewisら（１９９９年）、Advances in Virus Research (Academic Press) ５４巻：１２９～８８頁）。

【０４３３】

代替的な送達方法は、鼻および肺の粘膜などの、粘膜表面上へのネイキッドＤＮＡのエアロゾル滴下（Lewisら（１９９９年）、Advances in Virus Research(Academic Press) ５４巻：１２９～８８頁）ならびに眼および膣の粘膜へのｐＤＮＡの局所投与（Lewisら（１９９９年）、Advances in Virus Research (Academic Press) ５４巻：１２９～８８頁）を含んでもよい。粘膜表面送達はまた、陽イオン性リポソーム－ＤＮＡ調製物、生分解性ミクロスフェア、腸粘膜への経口投与のための弱毒化ＳｈｉｇｅｌｌａまたはＬｉｓｔｅｒｉａベクター、および組換えアデノウイルスベクターを使用して達成されている。また、ＤＮＡまたはＲＮＡを、細胞を一時的に透過性にする、細胞膜の軽度の機械的破壊後に細胞に送達することもできる。膜のそのような軽度の機械的破壊を、小さい開口部を介して細胞に穏やかに力を加えることによって遂行することができる（Ex Vivo Cytosolic Delivery of Functional Macromolecules to ImmuneCells、Shareiら、PLOS ONE |DOI:10.1371/journal.pone.0118803、２０１５年４月１３日）。

【０４３４】

一部の実施形態では、疾患特異的ワクチンまたは免疫原性組成物は、例えば、本開示に従って同定された１つまたは複数の抗原性ペプチド／ポリペプチドをコードする別々のＤＮＡプラスミドを含んでもよい。本明細書で考察されるように、発現ベクターの正確な選択は、発現させるペプチド／ポリペプチドに依存してもよく、当業者の技術の範囲内にある。ＤＮＡ構築物の予想される持続性（例えば、筋肉細胞中でのエピソーム、非複製、非組み込み型における）は、保護の持続期間の増大を提供すると予想される。

【０４３５】

本開示の１つまたは複数の抗原性ペプチドを、ウイルスに基づく系（例えば、アデノウイルス系、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、ポックスウイルス、またはレンチウイルス）を使用して、ｉｎ ｖｉｖｏでコードさせ、発現させることができる。一実施形態では、疾患ワクチンまたは免疫原性組成物は、例えば、アデノウイルスなどの、それを必要とするヒト患者における使用のためのウイルスに基づくベクターを含んでもよい（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Badenら、First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). J Infect Dis.２０１３年１月１５日；２０７巻（２号）：２４０～７頁を参照されたい）。アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、およびレンチウイルス送達のために使用することができるプラスミドは以前に記載されている（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第６，９５５，８０８号および第６，９４３，０１９号、ならびに米国特許出願第２００８０２５４００８号を参照されたい）。

【０４３６】

本開示のペプチドおよびポリペプチドを、ベクター、例えば、本明細書で考察される核

酸分子、例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡプラスミド、ポックスウイルス、例えば、オルトポックスウイルス、アビポックスウイルス、またはアデノウイルス、ＡＡＶまたはレンチウイルスなどのウイルスベクターによって発現させることもできる。この手法は、本開示のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させるためのベクターの使用を含む。急性もしくは慢性感染宿主または非感染宿主への導入時に、ベクターは、免疫原性ペプチドを発現し、それによって、宿主のＣＴＬ応答を誘発する。

【０４３７】

本開示の実施において使用することができるベクターのうち、細胞の宿主ゲノム中への組み込みは、レトロウイルス遺伝子移入法を用いて可能であり、挿入される導入遺伝子の長期的発現が得られることが多い。一部の実施形態では、レトロウイルスは、レンチウイルスである。追加で、高い形質導入効率が、多くの異なる細胞型および標的組織において観察されている。外来エンベロープタンパク質を組み込み、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大増殖させることによって、レトロウイルスの指向性を変化させることができる。また、レトロウイルスを操作して、挿入される導入遺伝子の条件的発現を可能にし、ある特定の細胞型のみがレンチウイルスによって感染するようにすることができる。細胞型特異的プロモーターを使用して、特定の細胞型における発現を標的化することができる。レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである（従って、レンチウイルスベクターとレトロウイルスベクターの両方を、本開示の実施において使用することができる）。さらに、レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入するか、または感染し、典型的には、高いウイルス力価を生成することができる。レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、したがって、標的組織に依存し得る。レトロウイルスベクターは、最大で６～１０ｋｂの外来配列のパッケージング能力を有するｃｉｓ作用性の長い末端反復を含む。最小のｃｉｓ作用性ＬＴＲは、ベクターの複製およびパッケージングにとって十分であり、次いで、これを使用して、所望の核酸を標的細胞中に組み込み、持続的な発現を提供する。本開示の実施において使用することができる広く使用されるレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、およびその組合せに基づくものが挙げられる（例えば、Buchscherら（１９９２年）、J. Virol. ６６巻：２７３１～２７３９頁；Johannら（１９９２年）、J. Virol.６６巻：１６３５～１６４０頁；Sommnerfeltら（１９９０年）、Virol.１７６巻：５８～５９頁；Wilsonら（１９９８年）、J. Virol.６３巻：２３７４～２３７８頁；Millerら（１９９１年）、J. Virol.６５巻：２２２０～２２２４頁；ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５７００を参照されたい）。

【０４３８】

また、ウマ感染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）に基づくレンチウイルスベクターなどの、最小の非霊長類レンチウイルスベクターも、本開示の実施において有用である（例えば、Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jgm.845において２００５年１１月２１日にオンライン公開された、Balagaan（２００６年）、J Gene Med；８巻：２７５～２８５頁を参照されたい）。このベクターは、標的遺伝子の発現を駆動するサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターを有してもよい。したがって、本開示は、特に、本開示の実施において有用なベクター：レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを含むウイルスベクターを企図する。

【０４３９】

レンチウイルスベクターは、パーキンソン病のための処置において開示されており、例えば、米国特許公開第２０１２０２９５９６０号および米国特許第７３０３９１０号および第７３５１５８５号を参照されたい。レンチウイルスベクターはまた、脳への送達についても開示されており、例えば、米国特許公開第２０１１０２９３５７１号；第２００４００１３６４８号、第２００７００２５９７０号、第２００９０１１１１０６号および米国特許第７２５９０１５号を参照されたい。別の実施形態では、レンチウイルスベクターは、疾患について処置される者の脳にベクターを送達するために使用される。本開示の実

施において有用なレンチウイルスベクター系に関しては、米国特許第６４２８９５３号、第６１６５７８２号、第６０１３５１６号、第５９９４１３６号、第６３１２６８２号、および第７１９８７８４号、ならびにそこに引用される文献に言及されている。本明細書における実施形態では、送達は、レンチウイルスによるものである。Ｚｏｕらは、髄腔内カテーテルにより１×１０^{9}形質導入単位（ＴＵ）／ｍｌの力価を有する約１０μＬの組換えレンチウイルスを投与した。これらの種類の投与量を、本開示におけるレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターの使用に適合させるか、または外挿することができる。脳などの組織における形質導入のためには、非常に少量を使用する必要があり、したがって、ウイルス調製物は、超遠心分離によって濃縮される。限外濾過またはマトリックスへの結合およびそれからの溶出などの他の濃縮方法を使用することができる。他の実施形態では、投与されるレンチウイルスの量は、平均７５ｋｇのヒトについて、または対象の体重およびサイズおよび種について調整して、合計単回投与量として、１×１０^{5}もしくは約１×１０^{5}プラーク形成単位（ＰＦＵ）、５×１０^{5}もしくは約５×１０^{5}ＰＦＵ、１×１０^{6}もしくは約１×１０^{6}ＰＦＵ、５×１０^{6}もしくは約５×１０^{6}ＰＦＵ、１×１０^{7}もしくは約１×１０^{7}ＰＦＵ、５×１０^{7}もしくは約５×１０^{7}ＰＦＵ、１×１０^{8}もしくは約１×１０^{8}ＰＦＵ、５×１０^{8}もしくは約５×１０^{8}ＰＦＵ、１×１０^{9}もしくは約１×１０^{9}ＰＦＵ、５×１０^{9}もしくは約５×１０^{9}ＰＦＵ、１×１０^{10}もしくは約１×１０^{10}ＰＦＵまたは５×１０^{10}もしくは約５×１０^{10}ＰＦＵであってもよい。当業者であれば、好適な投与量を決定することができる。ウイルスに関する好適な投与量を、経験的に決定することができる。

【０４４０】

また、本開示の実施において有用なものは、アデノウイルスベクターである。１つの利点は、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏで様々な哺乳動物細胞および組織中に組換え遺伝子を効率的に移入し、発現する組換えアデノウイルスの能力であり、移入された核酸の高い発現が得られる。さらに、休止細胞に生産的に感染する能力は、組換えアデノウイルスベクターの有用性を拡大する。さらに、高い発現レベルは、核酸の生成物が、免疫応答を生成するのに十分なレベルで発現されることを確保する（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，０２９，８４８号を参照されたい）。本開示の実施において有用なアデノウイルスベクターに関して、米国特許第６，９５５，８０８号に記載されている。使用されるアデノウイルスベクターを、Ａｄ５、Ａｄ３５、Ａｄ１１、Ｃ６、およびＣ７ベクターからなる群から選択することができる。アデノウイルス５（「Ａｄ５」）ゲノムの配列が公開されている（Chroboczek, J.、Bieber, F.、およびJacrot, B.（１９９２年）、The Sequence of the Genomeof Adenovirus Type 5 and Its Comparison with the Genome of Adenovirus Type 2、Virology １８６巻、２８０～２８５頁；この内容は参照により本明細書に組み込まれる）。Ａｄ３５ベクターは、米国特許第６，９７４，６９５号、第６，９１３，９２２号、および第６，８６９，７９４号に記載されている。Ａｄ１１ベクターは、米国特許第６，９１３，９２２号に記載されている。Ｃ６アデノウイルスベクターは、米国特許第６，７８０，４０７号；第６，５３７，５９４号；第６，３０９，６４７号；第６，２６５，１８９号；第６，１５６，５６７号；第６，０９０，３９３号；第５，９４２，２３５号；および第５，８３３，９７５号に記載されている。Ｃ７ベクターは、米国特許第６，２７７，５５８号に記載されている。Ｅ１欠損性もしくは欠失性、Ｅ３欠損性もしくは欠失性、および／またはＥ４欠損性もしくは欠失性であるアデノウイルスベクターを使用することもできる。Ｅ１領域中に変異を有するある特定のアデノウイルスは、Ｅ１欠損性アデノウイルス変異体が非許容細胞中で複製欠損であるか、または、少なくとも、高度に弱毒化されているため、改善された安全域を有する。Ｅ３領域中に変異を有するアデノウイルスは、アデノウイルスがＭＨＣクラスＩ分子を下方調節する機構を破壊することによって免疫原性を増強してもよい。Ｅ４変異を有するアデノウイルスは、後期遺伝子発現の抑制のため、アデノウイルスベクターの免疫原性を低下させていてもよい。そのようなベクターは、同じベクターを利用する反復的ワクチン再接種が所望される場合に特に有用であり得る。Ｅ１、Ｅ３、Ｅ

４、Ｅ１およびＥ３、ならびにＥ１およびＥ４に欠失または変異があるアデノウイルスベクターを、本開示に従って使用することができる。さらに、全てのウイルス遺伝子が欠失している「ガットレス」アデノウイルスベクターを、本開示に従って使用することもできる。そのようなベクターは、その複製のためにヘルパーウイルスを必要とし、自然環境には存在しない条件である、Ｅ１ａとＣｒｅの両方を発現する特殊なヒト２９３細胞株を必要とする。そのような「ガットレス」ベクターは、非免疫原性であり、したがって、そのベクターをワクチン再接種のために複数回接種することができる。「ガットレス」アデノウイルスベクターを、本開示の導入遺伝子などの異種挿入物／遺伝子の挿入のために使用し、さらに、多数の異種挿入物／遺伝子の同時送達のために使用することができる。一部の実施形態では、送達は、単回追加用量にあってもよい、アデノウイルスによるものである。一部の実施形態では、アデノウイルスは、複数用量によって送達される。ｉｎ ｖｉｖｏでの送達に関して、ＡＡＶは、宿主ゲノム中に組み込まれないため、低毒性であり、挿入変異を引き起こす可能性が低いため、他のウイルスベクターよりも有利である。ＡＡＶは、４．５または４．７５Ｋｂのパッケージング限界を有する。４．５または４．７５Ｋｂよりも大きい構築物は、ウイルス産生の有意な低下をもたらす。核酸分子発現を駆動するために使用することができる多くのプロモーターが存在する。ＡＡＶ ＩＴＲは、プロモーターとして働くことができ、追加のプロモーターエレメントの必要性を排除するのに有利である。遍在的発現のために、以下のプロモーターを使用することができる：ＣＭＶ、ＣＡＧ、ＣＢｈ、ＰＧＫ、ＳＶ４０、フェリチン重鎖または軽鎖など。脳での発現のために、以下のプロモーターを使用することができる：全ニューロンのためのシナプシンＩ、興奮ニューロンのためのＣａＭＫＩＩアルファ、ＧＡＢＡ生成ニューロンのためのＧＡＤ６７またはＧＡＤ６５またはＶＧＡＴなど。ＲＮＡ合成を駆動するために使用されるプロモーターとしては、Ｕ６またはＨ１などのＰｏｌ ＩＩＩプロモーターが挙げられる。Ｐｏｌ ＩＩプロモーターおよびイントロンカセットを使用して、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を発現させることができる。本開示の実施において有用なＡＡＶベクターに関して、米国特許第５６５８７８５号、第７１１５３９１号、第７１７２８９３号、第６９５３６９０号、第６９３６４６６号、第６９２４１２８号、第６８９３８６５号、第６７９３９２６号、第６５３７５４０号、第６４７５７６９号、および第６２５８５９５号、ならびにそこで引用される文献に記載されている。ＡＡＶに関して、ＡＡＶはＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはその任意の組合せであってもよい。当業者であれば、標的化される細胞に関してＡＡＶを選択することができる；例えば、当業者であれば、脳または神経細胞を標的化するために、ＡＡＶ血清型１、２、５またはハイブリッドキャプシドＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはその任意の組合せを選択することができる；また、当業者であれば、心臓組織を標的化するために、ＡＡＶ４を選択することができる。ＡＡＶ８は、肝臓への送達にとって有用である。一部の実施形態では、送達は、ＡＡＶを介するものである。任意の副作用に対して治療利益を平衡化するために投与量を調整することができる。

【０４４１】

一部の実施形態では、疾患ワクチンまたは免疫原性組成物に対する細胞性免疫応答の効率的な活性化を、非病原性微生物中でワクチンまたは免疫原性組成物中の関連抗原を発現させることによって達成することができる。そのような微生物の周知の例は、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｂｏｖｉｓ ＢＣＧ、ＳａｌｍｏｎｅｌｌａおよびＰｓｅｕｄｏｍｏｎａである（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第６，９９１，７９７号を参照されたい）。

【０４４２】

一部の実施形態では、ポックスウイルスが、疾患ワクチンまたは免疫原性組成物中で使用される。これらのものとしては、オルトポックスウイルス、アビポックス、ワクシニア、ＭＶＡ、ＮＹＶＡＣ、カナリア痘、ＡＬＶＡＣ、鶏痘、ＴＲＯＶＡＣなどが挙げられる（例えば、Verardietら、Hum Vaccin Immunother. ２０１２年７月；８巻（７号）：９６１～７０頁；およびMoss、Vaccine. ２０１３年；３１巻（３９号）：４２２０～４

２２２頁を参照されたい）。ポックスウイルス発現ベクターは、１９８２年に記載されており、急速にワクチン開発ならびに多くの分野における研究に広く使用されるようになった。このベクターの利点としては、単純な構築、大量の外来ＤＮＡを収容する能力および高い発現レベルが挙げられる。Ｃｈｏｒｄｏｐｏｘｖｉｒｉｎａｅ亜科のポックスウイルス（脊椎動物のポックスウイルス）、例えば、オルトポックスウイルスおよびアビポックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルス（例えば、Ｗｙｅｔｈ株、ＷＲ株（例えば、ＡＴＣＣ（登録商標）ＶＲ－１３５４）、Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ株、ＮＹＶＡＣ、ＮＹＶＡＣ．１、ＮＹＶＡＣ．２、ＭＶＡ、ＭＶＡ－ＢＮ）、カナリア痘ウイルス（例えば、Ｗｈｅａｔｌｅｙ　Ｃ９３株、ＡＬＶＡＣ）、鶏痘ウイルス（例えば、ＦＰ９株、Ｗｅｂｓｔｅｒ株、ＴＲＯＶＡＣ）、ハトポックス、鳩痘、ウズラ痘、およびアライグマ痘、特に、その合成または非天然組換え体などの、本開示の実施において使用することができるポックスウイルスに関する情報、その使用、ならびにそのような組換え体を作製および使用する方法を、科学文献および特許文献に見出すことができる。

【０４４３】

一部の実施形態では、ワクシニアウイルスが、抗原を発現するために疾患ワクチンまたは免疫原性組成物において使用される（Rolphら、Recombinant viruses as vaccines andimmunological tools. Curr Opin Immunol ９巻：５１７～５２４頁、１９９７年）。組換えワクシニアウイルスは、感染した宿主細胞の細胞質内で複製することができ、したがって、目的のポリペプチドは、免疫応答を誘導することができる。さらに、ポックスウイルスは、免疫細胞、特に抗原提示細胞に直接感染することによって主要組織適合性複合体クラスＩ経路によるプロセシングのためにコードされた抗原を標的化するその能力のためだけでなく、自己アジュバント化するその能力のため、ワクチンまたは免疫原性組成物ベクターとして広く使用されてきた。

【０４４４】

一部の実施形態では、ＡＬＶＡＣが、疾患ワクチンまたは免疫原性組成物においてベクターとして使用される。ＡＬＶＡＣは、外来導入遺伝子を発現するように改変することができ、原核抗原と真核抗原の両方に対するワクチン接種のための方法として使用されてきたカナリア痘ウイルスである（Horig H、Lee DS、ConkrightWら、Phase I clinical trial of a recombinantcanarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen andthe B7.1 co-stimulatory molecule. Cancer Immunol Immunother ２０００年；４９巻：５０４～１４頁；von Mehren M、Arlen P、Tsang KYら、Pilot study of a dual generecombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) andB7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. ClinCancer Res ２０００年；６巻：２２１９～２８頁；Musey L、Ding Y、Elizaga Mら、HIV-1vaccination administered intramuscularly can induce both systemic and mucosal Tcell immunity in HIV-1-uninfected individuals. J Immunol ２００３年；１７１巻：１０９４～１０１頁；Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: anupdate. Proc Natl Acad Sci U S A １９９６年；９３巻：１１３４９～５３頁；米国特許第７，２５５，８６２号）。第Ｉ相臨床試験では、腫瘍抗原ＣＥＡを発現するＡＬＶＡＣウイルスは、優れた安全性プロファイルを示し、選択された患者においてＣＥＡ特異的Ｔ細胞応答の増加をもたらした；しかしながら、客観的な臨床応答は観察されなかった（Marshall JL、Hawkins MJ、Tsang KYら、Phase I study in cancer patientsof a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses humancarcinoembryonic antigen. J Clin Oncol １９９９年；１７巻：３３２～７頁）。

【０４４５】

一部の実施形態では、改変ワクシニアアンカラ（ＭＶＡ）ウイルスを、抗原ワクチンまたは免疫原性組成物のためのウイルスベクターとして使用することができる。ＭＶＡは、オルトポックスウイルス科の一員であり、ワクシニアウイルスのアンカラ株（ＣＶＡ）の

ニワトリ胚線維芽細胞上での約５７０回の連続継代によって生成された（概説については、Mayr, A.ら、Infection ３巻、６～１４頁、１９７５年を参照されたい）。これらの継代の結果として、得られるＭＶＡウイルスは、ＣＶＡと比較して３１キロベース少ないゲノム情報を含有し、宿主細胞が高度に制限されている（Meyer, H.ら、J. Gen. Virol. ７２巻、１０３１～１０３８頁、１９９１年）。ＭＶＡは、その極端な弱毒性、すなわち、減少したビルレンスまたは感染能力を特徴とするが、依然として優れた免疫原性を保つ。様々な動物モデルにおいて試験した場合、ＭＶＡは、免疫抑制された個体においてさえ、無毒性であることが分かった。さらに、ＭＶＡ－ＢＮ（登録商標）－ＨＥＲ２は、ＨＥＲ－２陽性乳がんの処置のために設計された候補免疫治療であり、現在、臨床試験中である（Mandlら、Cancer Immunol Immunother.２０１２年１月；６１巻（１号）：１９～２９
頁）。組換えＭＶＡを作製および使用するための方法が記載されている（例えば、その全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，３０９，０９８号および第５，１８５，１４６号を参照されたい）。

【０４４６】

一部の実施形態では、ワクチンまたは免疫原性組成物の組換えウイルス粒子は、それを必要とする患者に投与される。

【０４４７】

疾患または状態を有する対象のための治療薬を開発する方法であって、疾患または状態を有する対象に由来する細胞集団を用意するステップ、親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む配列をコードするポリ核酸を、１つまたは複数の細胞中に導入することによって、細胞集団の１つまたは複数の細胞中で、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子を発現させ、これにより１つまたは複数の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化し、特徴付けるステップ；および必要に応じて、特徴付けに基づいて治療薬を開発するステップを含む方法が本明細書で提供される。

【０４４８】

少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原を識別し、少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原を含む対象特異的免疫原性組成物を調製する方法であって、対象が疾患を有し、少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原が対象および対象の疾患に特異的であり、前記方法が、疾患または状態を有する対象に由来する細胞集団を用意するステップ；親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む配列をコードするポリ核酸を、１つまたは複数の細胞中に導入することによって、対象に由来する細胞集団の１つまたは複数の細胞中で、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ ＨＬＡ対立遺伝子を発現させ、これにより１つまたは複数の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；１つまたは複数の細胞から親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；対象および対象の疾患に特異的である富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から免疫原性ペプチドを識別するステップ；ならびに識別された対象特異的免疫原性ペプチドの１つまたは複数に基づいて対象特異的免疫原性組成物を製剤化するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【０４４９】

一部の実施形態では、治療薬または対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドまたは富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【０４５０】

一部の実施形態では、治療薬または対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現するＴ細胞を含む。一部の実施形態では、対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドに特異的に結合する受容体を発現するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、方法は、別の治療剤、必要に応じて、免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、アジュバント、必要に応じて、ポリ－ＩＣＬＣを対象に投与するステップをさらに含む。

【０４５１】

一部の実施形態では、疾患または障害は、がんである。一部の実施形態では、疾患または障害は、自己免疫疾患である。一部の実施形態では、疾患または障害は、感染である。一部の実施形態では、感染は、感染性因子による感染である。一部の実施形態では、感染性因子は、病原体、ウイルス、細菌、または寄生虫である。一部の実施形態では、ウイルスは、ＢＫウイルス（ＢＫＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３、ＤＥＮＶ－４、ＤＥＮＶ－５）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトＴ細胞リンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ－１）、インフルエンザウイルス、ＲＳＶ、ＨＰＶ、狂犬病、流行性耳下腺炎、風疹ウイルス、ポリオウイルス、黄熱、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ロタウイルス、水痘ウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、天然痘、帯状疱疹、およびその任意の組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、細菌は、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ ｗｈｉｐｐｌｅｉ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、腸チフス、肺炎球菌、髄膜炎菌、ヘモフィルスＢ、炭疽菌、破傷風トキソイド、Ｂ群髄膜炎菌、ｂｃｇ、コレラ、およびその組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、寄生虫は、寄生蠕虫または原生動物である。一部の実施形態では、寄生虫は、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐｐ．、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｓｐｐ．、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ、Ａｓｃａｒｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ、Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ ｔｒｉｃｈｉｕｒａ、Ｎｅｃａｔｏｒ ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｓｐｐ．、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【０４５２】

疾患または状態を有する対象のための治療薬を開発する方法であって、細胞集団を用意するステップであって、細胞集団の１つまたは複数の細胞が少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含むポリ核酸を含み、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列が第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された第１のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む第１の組換え配列、および第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む第２の組換え配列を含む、ステップ；少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを、細胞集団の１つまたは複数の細胞の少なくとも１つの細胞中で発現させ、これにより少なくとも１つの細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；および富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップ；ならびに識別されたペプチドの１つまたは複数に基づいて免疫原性組成物を製剤化するステップであって、第１および第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子が、対象のＨＬＡハプロタイプに一致する、ステップを含む方法が本明細書で提供される。

【０４５３】

一部の実施形態では、対象は、疾患または状態を有する。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子と異なる。一部の実施形態では、第１の親和性アクセプターペプチドは、第２の親和性アクセプターペプチドと同じである。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドを特徴付けるステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０個のクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、排出されない。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、発現された場合、細胞膜に組み込まれる。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体ではない。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の外因性ペプチドを、細胞集団に導入するステップを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つもしくは複数の外因性ペプチドと接触させること、または細胞集団中で１つもしくは複数の外因性ペプチドを発現させることを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つまたは複数の外因性ペプチドをコードする１つまたは複数の核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＤＮＡである。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＲＮＡであり、必要に応じて、ＲＮＡは、ｍＲＮＡである。一部の実施形態では、富化するステップは、四量体試薬の使用を含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の配列を決定するステップを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析、質量分析、ＭＳ分析、ＭＳ／ＭＳ分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の結合親和性または安定性を評価するステップを含む。

【０４５４】

一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部が、１つまたは複数の変異を含有するかどうかを決定するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体中でのペプチドと、ＨＬＡ分子との会合を評価するステップを含む。

【０４５５】

一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団に、ペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。一部の実施形態では、疾患または状態は、がんまたは感染性因子による感染である。

【０４５６】

一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞中に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体に由来する１つまたは複数のペプチドを特徴付けるステップを含み、必要に応じて、ペプチドは、感染性因子の１つまたは複数の標的タンパク質に由来する。一部の実施形態では、方法は、感染性因子の１つまたは複数の標的タンパク質に由来するペプチドの１つまたは複数の領域を特徴付けるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、感染性因子に由来する第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップを含む。

【０４５７】

一部の実施形態では、細胞集団は、疾患または状態を有する対象に由来する生体試料に由来する。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、初代細胞の集団である。

【０４５８】

一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドは、抗原提示細胞によって提示された場合、対象に由来するＴ細胞を活性化することができる。一部の実施形態では、方法は、疾患細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体を、非疾患細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体と比較するステップを含む。

【０４５９】

一部の実施形態では、方法は、識別するステップの前に、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップをさらに含む。

【０４６０】

一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。

【０４６１】

一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトおよび全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。

【０４６２】

一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－

ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡクラスＩＩα鎖、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。

【０４６３】

一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、それぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、異なるポリヌクレオチド分子上に含まれる。

【０４６４】

一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および／または第２のコードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞外で発現される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。

【０４６５】

一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、細胞内で発現される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。

【０４６６】

一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に細胞を溶解するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップをさらに含む。

【０４６７】

一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチド結合分子を、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、ここで、親和性アクセプターペプチド結合分子は、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクト

ース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、またはその組合せを含むタグ配列を含み、必要に応じて、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは第１および／もしくは第２の親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。

【０４６８】

一部の実施形態では、富化するステップは、親和性分子を、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、ここで、親和性分子は、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、親和性分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、固相表面は、ビーズである。

【０４６９】

一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を用いて、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、コードされる第１および／または第２のクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。

【０４７０】

一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、トランスフェクトまたは形質導入することを含む。一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸を含むベクターと接触させることを含む。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ポリ核酸は、細胞集団のゲノム中に安定に組み込まれる。

【０４７１】

一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のＨＬＡクラスＩα鎖であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のＨＬＡクラスＩα鎖である。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でβ２ミクログロブリンをコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では

、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、リンカーによって第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第３の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドと異なる。

【０４７２】

一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖および／またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、第１のＨＬＡクラスＩＩα鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、第１のＨＬＡクラスＩＩα鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、第１のＨＬＡクラスＩＩβ鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、第１のＨＬＡクラスＩＩβ鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖またはＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列は、第３の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドと異なる。

【０４７３】

一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１の親和性アクセプターペプチドと異なり、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、Ｓｔｒｅｐタグ ＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せから

なる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【０４７４】

一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【０４７５】

一部の実施形態では、方法は、生化学分析またはタンデム質量分析などの質量分析を実施するステップを含む。

【０４７６】

一部の実施形態では、方法は、ペプチドデータベースに由来する富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された１つまたは複数のペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに対応するペプチド配列を取得するステップを含み、ここで、得られた１つまたは複数の配列は、１つまたは複数のペプチドの配列を識別する。

【０４７７】

一部の実施形態では、細胞集団は、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｅｘｐｉ２９３、ＨｅＬａ、Ａ３７５、７２１．２２１、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、Ｊｕｒｋａｔ、ＨｅｐＧ２、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＣＡＣＯ－２、Ｕ９３７、Ｕ－２ＯＳ、ＥｘｐｉＣＨＯ、ＣＨＯおよびＴＨＰ１から選択される細胞株である。

【０４７８】

一部の実施形態では、細胞株は、１つまたは複数のサイトカイン、チェックポイント阻害剤、エピジェネティック的に活性な薬物、ＩＦＮ－γ、またはその組合せを用いて処理される。

【０４７９】

一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^5個の細胞、少なくとも10^6個の細胞または少なくとも10^7個の細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、樹状細胞、マクロファージ、がん細胞またはＢ細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、腫瘍細胞を含む。

【０４８０】

一部の実施形態では、細胞集団を、１つまたは複数の細胞から第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体を単離する前に、薬剤と接触させる。一部の実施形態では、薬剤は、炎症性サイトカイン、化学薬剤、アジュバント、治療剤または放射線である。

【０４８１】

一部の実施形態では、第１および／または第２のＨＬＡ対立遺伝子は、変異したＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、第１および／または第２のＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、バーコード配列を含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の発現についてアッセイするステップをさらに含む。一部の実施形態では、アッセイするステップは、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を配列決定すること、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子ＲＮＡをコードするＲＮＡを検出すること、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子タンパク質を検出すること、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、第１および第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ユニークなバーコード配列を含む。一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、ユニークなバーコード配列を含む。

【実施例】
【０４８２】
以下に提供される実施例は、例示目的に過ぎず、本明細書に提供される特許請求の範囲を限定するものではない。
【０４８３】
（実施例１）
ユニバーサルＩＰパイプライン：ユニバーサル単一対立遺伝子ＨＬＡ－ペプチド複合体識別プラットフォーム
本明細書で開示されるユニバーサル免疫精製（ＩＰ）構築物は、細胞トランスフェクションまたは形質導入により哺乳動物発現ベクターから発現される親和性タグ付きＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ対立遺伝子をコードするＤＮＡ構築物からなる（図１Ａおよび図１Ｂ）。非限定的な例示的クラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物を、図２に示す。非限定的な例示的親和性タグとしては、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）またはヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）ペプチド配列が挙げられる。親和性タグを、ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端またはＣ末端に置くことができる。図２に示されるＦ２Ａなどの切断配列、または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を、α鎖とβ２－ミクログロブリンとの間（クラスＩ）またはα鎖とβ鎖との間（クラスＩＩ）に置くことができる。非限定的な例示的ベクターとしては、図３に示されるレンチウイルスベクターが挙げられる。ピューロマイシン耐性（Ｐｕｒｏ）などの抗体耐性遺伝子を構築物中に組み込んで、トランスフェクションまたは形質導入後の選択を可能にする。ユニバーサルＩＰ構築物をトランスフェクトまたは形質導入された細胞を、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析の前に、拡大増殖させる（図４Ａ）か、または選択した後、拡大増殖させる（図４Ｂ）。クラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡのためのユニバーサル免疫精製プラットフォームの図を、図５に示す。
【０４８４】
（実施例２）
細胞培養ならびにＨＬＡ－ペプチドの免疫精製および配列決定
以前に記載されたように（Rechéら、２００６年）、Ｂ７２１．２２１、Ａ３７５、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、Ｊｕｒｋａｔ、またはＨＥＫ２９３Ｔ、ＨｅＬａ、またはｅｘｐｉ２９３細胞に、単一のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子（例えば、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１、ＨＬＡ－Ａ＊２３：０１およびＨＬＡ－Ｂ＊１４：０２、もしくはＨＬＡ－Ｅ＊０１：０１）またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子（例えば、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ＊０１：０２およびＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１、もしくはＨＬＡ－ＤＲＢ＊１５：０１、もしくはＨＬＡ－ＤＲＢ＊０７：０１）をコードするレトロウイルスベクターを形質導入することによって、一対立遺伝子ＨＬＡ細胞を生成した。細胞株のクラスＩまたはＩＩ　ＨＬＡ型を、標準的な分子タイピングによって確認した。細胞を培養し、ＨＬＡ－ペプチド免疫精製を実施した。
【０４８５】
クラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子（図６Ｃ）のＨＥＫ２９３Ｔ細胞への概念実証形質導入を、図６Ａ～６Ｃに示す。ビオチン化に基づくユニバーサル免疫精製のためのＨＬＡ－Ａ＊０２：０１構築物によるモック、ＧＦＰ、および空のプラスミドの形質導入を実施し、ウェスタンブロットにおいてビオチン化を確認した（図６Ａ）。Ｐｏｎｃｅａｕ染色されたゲルを、ウェスタンブロット分析のためのローディング対照として使用した（図６Ｂ）。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞によって発現されるクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ－ＢＡＰ対立遺伝子のトランスフェクションおよびビオチン化の最適化（図７Ｃ）を、図７Ａ～７Ｃに示す。ビオチン化の時間経過実験により、ＣおよびＮ末端標識されたＨＬＡ－ＢＡＰビオチン化が、クラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ－ＢＡＰ発現細胞の両方について１０分で完了することが示された（図７Ａおよび図７Ｂ）。
【０４８６】
本明細書で開示されるユニバーサルＩＰパイプラインを、複数の細胞型において試験した（図８Ａ～８Ｄ）。クラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡの両方に関するユニバーサルＩ

Ｐ構築物を、ＨＥＫ２９３Ｔ（ヒト胚性腎臓）（図８Ａ）、ＨｅＬａ（ヒト子宮頸がん）（図８Ｂ）、Ａ３７５（ヒト悪性メラノーマ）（図８Ｃ）、およびＥｘｐｉ２９３（高密度培養およびタンパク質発現のために遺伝子操作されたヒト胚性腎臓）細胞（図８Ｄ）中にトランスフェクトした。ＢＡＰ標識については抗ストレプトアビジンおよびＨＡ標識については抗ＨＡを使用してウェスタンブロットを実施し、Ｐｏｎｃｅａｕ染色されたゲルを、ウェスタンブロットのためのローディング対照として使用した。ウェスタンブロットにより、クラスＩおよびクラスＩＩ構築物の両方の発現が試験した全ての細胞型において確認された（図８Ａ～８Ｄ）。

【０４８７】

以下は、本実施例において使用される材料および方法を記載する。

【０４８８】

クラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のユニバーサルＩＰ（ビオチン）

標準的な方法に従って、細胞をトランスフェクトまたは形質導入して、ユニバーサルＩＰ構築物を発現させた。形質導入後、細胞を培地中に再懸濁し、５０ｍｌのファルコン管に移した。管を１５００ｒｐｍで５分間スピンし、培地を除去した。次いで、細胞を１．５ｍｌの冷ＰＢＳ中に再懸濁し、１．５ｍＬのＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管に移した。次いで、管を５分間遠心分離した（４℃、５５０×ｇで）。ＰＢＳを除去した後、細胞を１．２ｍｌの溶解緩衝液中に再懸濁した。細胞を緩衝液中に再懸濁した後、ベンゾナーゼを添加した。管を、時折混合しながら氷上でインキュベートした。氷上で１５分間インキュベートした後、管を２０分間遠心分離した（４℃、１５，０００×ｇで）。ビオチン化のために、上清（５００μＬ）を別の１．５ｍＬの管（予め洗浄された）に移した。細胞溶解物のビオチン化を、ビオチン、ＡＴＰ、およびＢｉｒＡの各試料への添加によって達成した。次いで、試料を室温で１０分間インキュベートした後、免疫沈降の前に氷上に置いた。

【０４８９】

ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎまたはストレプトアビジンビーズを用いる免疫沈降を、予め洗浄されたストレプトアビジンまたはＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎアガロース樹脂スラリーの、ビオチン化された溶解物への添加によって行った。次いで、試料を、管ロティサリー上に置き、４℃で３０分間インキュベートする。３０分のインキュベーション後、遠心分離（１５００×ｇ、１分、４℃）によってビーズをペレット化し、上清を除去し、廃棄する。次いで、ビーズを１ｍｌの洗浄緩衝液中に再懸濁した。次いで、遠心分離（１，５００×ｇ、１分、４℃）によってビーズをペレット化し、洗浄緩衝液を除去し、廃棄した。このステップを繰り返して、洗浄緩衝液中での合計４回の洗浄を得た。ペレット化したビーズを、１ｍｌのＴｒｉｓ緩衝液中に再懸濁し、遠心分離（１，５００×ｇ、１分、４℃）によってペレット化し、Ｔｒｉｓ緩衝液を除去した。このステップを繰り返して、Ｔｒｉｓ緩衝液中での合計４回の洗浄を得た。１ｍｌの質量分析グレードの水にビーズを再懸濁し、遠心分離（１，５００×ｇ、１分、４℃）してビーズをペレット化することによって、ＭＳグレードの水の中で最後の洗浄を行った。上清を除去し、ビーズを－８０℃で保存したか、またはすぐにＨＬＡ－ペプチドの溶出および脱塩にかけた。

【０４９０】

クラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の連続ユニバーサルＩＰ（ＨＡおよびビオチンタグ付け）

標準的なプロトコールに従って、細胞をトランスフェクトまたは形質導入して、ユニバーサルＩＰ構築物を発現させた。形質導入後、細胞を培地中に再懸濁し、５０ｍｌのファルコン管に移した。管を１５００ｒｐｍで５分間スピンし、培地を除去した。次いで、細胞を１．５ｍｌの冷ＰＢＳ中に再懸濁し、１．５ｍＬのＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管に移した。次いで、管を５分間遠心分離した（４℃、５５０×ｇで）。ＰＢＳを除去した後、細胞を１．２ｍｌの溶解緩衝液中に再懸濁した。細胞を緩衝液中に再懸濁した後、ベンゾナーゼを添加した。管を、時折混合しながら氷上でインキュベートした。氷上で１５分間インキュベートした後、管を２０分間遠心分離した（４℃、１５，０００×ｇで）。ビオチン化のために、上清を別の１．５ｍｌの管（予め洗浄された）に移した。細胞溶解物のビオチ

ン化を、ビオチン、ＡＴＰ、およびＢｉｒＡの各試料への添加によって達成した。次いで、試料を室温で１０分間インキュベートした後、免疫沈降の前に氷上に置いた。

【０４９１】

ＨＡタグ付きクラスＩＩ対立遺伝子の免疫沈降を、抗ＨＡ抗体に予め結合させた、予め洗浄されたプロテインＧアガロース樹脂の添加によって実行した。次いで、試料を、管ロティサリー上、４℃で６０分間インキュベートした。６０分のインキュベーション後、ビーズを遠心分離（１５００×ｇ、１分、４℃）によりペレット化し、上清を除去し、廃棄した。ビーズを溶解緩衝液で２回洗浄し、遊離ＨＡペプチドを含有する溶解緩衝液中に再懸濁し、管ロティサリー上、４℃で１５分間インキュベートした。次いで、遠心分離（１５００×ｇ、１分、４℃）によりビーズをペレット化し、上清を、２００μｌの予め洗浄されたＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎまたはストレプトアビジンアガロースビーズを含有する１．５ｍｌのＥｐｐｅｎｄｏｒｆに移した。次いで、試料を管ロティサリー上に置き、４℃で３０分間インキュベートした。３０分のインキュベーション後、ビーズを遠心分離（１５００×ｇ、１分、４℃）によりペレット化し、上清を除去し、廃棄した。次いで、ビーズを１ｍｌの洗浄緩衝液中に再懸濁した。次いで、ビーズを遠心分離（１，５００×ｇ、１分、４℃）によりペレット化し、洗浄緩衝液を除去し、廃棄した。このステップを繰り返して、洗浄緩衝液中での合計４回の洗浄を得た。ペレット化したビーズを、１ｍｌのＴｒｉｓ緩衝液中に再懸濁し、遠心分離（１，５００×ｇ、１分、４℃）によりペレット化し、洗浄緩衝液を除去した。このステップを繰り返して、Ｔｒｉｓ緩衝液中での合計４回の洗浄を得た。１ｍｌの質量分析グレードの水にビーズを再懸濁し、遠心分離（１，５００×ｇ、１分、４℃）して、ビーズをペレット化することによって、ＭＳグレードの水の中で最後の洗浄を行った。上清を除去し、ビーズを－８０℃で保存したか、またはすぐにＨＬＡ－ペプチドの溶出および脱塩にかけた。

【０４９２】

ＨＬＡ－ペプチドの溶出および脱塩

ペプチドを、ＨＬＡ複合体から溶出させ、社内で構築されたＥｍｐｏｒｅ　Ｃ１８　ＳｔａｇｅＴｉｐｓ（３Ｍ、２３１５）（Rappsilberら、２００７年）上で脱塩した。試料のローディング、洗浄、および溶出を、最大速度１，５００～３，０００×ｇの卓上遠心機上で実施した。ＳｔａｇｅＴｉｐｓを、２つのメタノール洗浄液、２つのアセトニトリル／ギ酸洗浄液、および２つのギ酸洗浄液を用いて平衡化させた。管中で、ＨＬＡ会合ペプチドＩＰに由来する乾燥ビーズを４℃で解凍し、ＡＣＮ／ギ酸混合物中で再構成させ、ＳｔａｇｅＴｉｐｓ上にロードした。ビーズをギ酸で洗浄し、２回の１０％酢酸中での５分のインキュベーションを使用して、ペプチドをさらに溶出した。合わせた洗浄容量および溶出容量を合わせ、ＳｔａｇｅＴｉｐｓ上にロードした。ＩＰビーズを含有する管をギ酸で再度洗浄し、この容量もＳｔａｇｅＴｉｐｓ上にロードした。ペプチドをＳｔａｇｅＴｉｐｓまたは脱塩カートリッジ上で、ギ酸を用いて２回洗浄した。ＡＣＮおよびギ酸の混合物の段階勾配を使用してペプチドを溶出させた。段階溶出液を合わせ、完全に乾燥させた。

【０４９３】

（実施例３）

ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるクラスＩおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ会合ペプチドの配列決定

全てのナノＬＣ－ＥＳＩ－ＭＳ／ＭＳ分析は、以下に記載される同じＬＣ分離条件を用いた。Ｃ１８　Ｒｅｐｒｏｓｉｌビーズ（１．９μｍ粒径、２００Å孔径、Ｄｒ．Ｍａｉｓｃｈ　ＧｍＢＨ）を圧力下で約２０ｃｍまで充填し、分離中に５０℃で加熱した、１０μｍエミッターを有するＰｉｃｏＦｒｉｔ　７５μｍ内径キャピラリーを装着したＰｒｏｘｅｏｎ　Ｅａｓｙ　ＮａｎｏＬＣ　１０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＣＡ）を使用して試料をクロマトグラフィー分離した。

【０４９４】

試料をＣＡＮ中にロードし、ギ酸混合物およびペプチドを、８２分にわたる７～３０％の緩衝液Ｂ（０．１％ＦＡまたは０．５％ＡｃＯＨおよび８０％または９０％ＡＣＮ）、

６分にわたる３０～９０％の緩衝液Ｂの線形勾配を用いて溶出した後、２００ｎＬ／分で１５分にわたって９０％の緩衝液Ｂで保持して（緩衝液Ａ、０．１％ＦＡおよび３％ＡＣＮ）、約１３（ＦＡ）ｓｅｃのピーク幅を得た。データ依存的獲得中に、溶出したペプチドを、２．２ｋＶのナノ電子スプレー源を備えたＯｒｂｉｔｒａｐ Ｆｕｓｉｏｎ Ｌｕｍｏｓ Ｔｒｉｂｒｉｄ質量分析計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中に導入した。フルスキャンＭＳを、３００～１，８００ｍ／ｚで３０，０００の解像度で獲得した。それぞれのフルスキャンの後、０．７ｍ／ｚの単離幅を使用して、解像度１５，０００で上位１０のデータ依存的ＭＳ２スキャンを行った。

【０４９５】

ユニバーサルＩＰパイプラインにおいて使用した親和性タグ付きクラスＩおよびクラスＩＩ ＨＬＡ構築物を発現する複数の細胞型から識別されたユニークなＨＬＡ会合ペプチドの総数を、図９Ａに示す。クラスＩ ＨＬＡ一対立遺伝子ペプチドプロファイリングに由来するユニークなペプチドの数を、図９Ｂに示す。クラスＩＩ ＨＬＡ一対立遺伝子ペプチドプロファイリングに由来するユニークなペプチドの数を、図９Ｃに示す。ＨＬＡ会合ペプチドのＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析により、クラスＩおよびクラスＩＩ ＨＬＡ会合ペプチドの特徴が示された（図１０Ａおよび１０Ｂ）。単離および配列決定されたクラスＩ ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１会合ペプチドおよびクラスＩＩ ＨＬＡ－ＤＲβ＊１１：０１会合ペプチドの配列ロゴ表示を、図１０Ａに示す。クラスＩ ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１会合ペプチド（赤色）およびクラスＩＩ ＨＬＡ－ＤＲβ＊１１：０１会合ペプチド（青色）の両方の長さ分布の比較により、クラスＩおよびクラスＩＩ ＨＬＡ会合ペプチドが両方とも予想される傾向に従うことが示された（図１０Ｂ）。

【０４９６】

７０個のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および４７個のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を、本明細書に記載の一対立遺伝子手法について評価した。親和性タグを含む７０個のユニークなＨＬＡクラスＩ対立遺伝子（表１Ａ）および親和性タグを含む４７個のユニークなＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子（表２Ａ）を生成した。表１Ｂは、７０個のユニークなＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を使用する９６のユニークな実験の詳細を示す（一部の場合、同じ対立遺伝子を複数の細胞株に入れた）。表２Ｂは、４７個のユニークなＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を使用して実施された５４のユニークな実験の詳細を示す（一部の場合、同じ対立遺伝子を複数の細胞株に入れた）。

【表１Ａ】

表 1A: 70 のユニークな HLA クラス I 対立遺伝子

#	ユニークなクラス I 対立遺伝子	#	ユニークなクラス I 対立遺伝子
1	A*0201	36	B*3802
2	A*0202	37	B*3901
3	A*0203	38	B*3906
4	A*0206	39	B*4001
5	A*0207	40	B*4002
6	A*1101	41	B*4006
7	A*2301	42	B*4101
8	A*2501	43	B*4201
9	A*2601	44	B*4501
10	A*3001	45	B*4601
11	A*3002	46	B*4801
12	A*3101	47	B*4901
13	A*3201	48	B*5001
14	A*3301	49	B*5201
15	A*3303	50	B*5301
16	A*3402	51	B*5401
17	A*3601	52	B*5501
18	A*6801	53	B*5703
19	A*7401	54	B*5801
20	B*0702	55	B*5802
21	B*0801	56	B*8101
22	B*1302	57	C*0102
23	B*1401	58	C*0202
24	B*1402	59	C*0303
25	B*1501	60	C*0401
26	B*1502	61	C*0602
27	B*1503	62	C*0701
28	B*1509	63	C*0702
29	B*1510	64	C*0704
30	B*1801	65	C*1203
31	B*270502	66	C*1701
32	B*3502	67	C*1801
33	B*3503	68	F*0101
34	B*3701	69	G*0101
35	B*3801	70	E*0101

【表１Ｂ－１】

表 1B: HLA クラスＩ対立遺伝子のためのライブラリーおよび細胞株

#ユニークな実験							
#	ライブラリーのウェーブ	クラスＩ対立遺伝子	細胞株	#	ライブラリーのウェーブ	クラスＩ対立遺伝子	細胞株
1	W1	A0201	Hek293	49	W2	B4101	expi293
2	W1	A0201	HeLa	50	W2	B4201	expi293
3	W1	A0201	A375	51	W2	B4501	expi293
4	W1	A0201	expi293	52	W2	B4601	expi293
5	W1	A1101	expi293	53	W2	B4801	expi293
6	W1	A1101	HeLa	54	W2	B4901	expi293
7	W1	A2301	Hek293	55	W2	B5001	expi293
8	W1	A2301	A375	56	W2	B5201	expi293
9	W1	A2301	expi293	57	W2	B5301	expi293
10	W1	A2601	A375	58	W2	B5501	expi293
11	W1	A2601	HeLa	59	W2	B5501	A375
12	W1	A2601	expi293	60	W2	B5703	expi293
13	W1	A3201	A375	61	W2	B5801	expi293
14	W1	A3201	HeLa	62	W2	B5801	A375
15	W1	A3201	expi293	63	W2	B5802	expi293
16	W1	A3601	expi293	64	W2	B8101	expi293
17	W1	B0702	expi293	65	W2	C0401	expi293
18	W1	B0702	HeLa	66	W2	C0401	A375
19	W1	B0801	expi293	67	W2	C0602	expi293
20	W1	B0801	HeLa	68	W2	C0602	A375
21	W1	B0801	A375	69	W2	C0701	expi293
22	W1	B1402	Hek293	70	W2	C0701	A375
23	W1	B1402	A375	71	W2	C0702	expi293
24	W1	B1402	expi293	72	W2	C0702	A375
25	W1	B1402	HeLa	73	W3	A3301	expi293
26	W1	B1501	expi293	74	W3	A0206	expi293
27	W1	B1509	HeLa	75	W3	A0202	expi293
28	W1	B1509	expi293	76	W3	A3402	expi293
29	W1	B1801	HeLa	77	W3	A0207	expi293
30	W1	B1801	expi293	78	W3	A0203	expi293
31	W1	B270502	HeLa	79	W3	B3502	expi293
32	W1	B270502	expi293	80	W3	B1401	expi293
33	W1	B4001	HeLa	81	W3	B3906	expi293
34	W1	B4001	expi293	82	W3	B1510	expi293
35	W2	A2501	expi293	83	W3	B4006	expi293
36	W2	A3001	expi293	84	W3	B1502	expi293
37	W2	A3002	expi293	85	W3	B3802	expi293
38	W2	A3101	expi293	86	W3	B5401	expi293
39	W2	A3303	expi293	87	W3	C0303	expi293
40	W2	A6801	expi293	88	W3	C0202	expi293
41	W2	A7401	expi293	89	W3	C1203	expi293
42	W2	B1302	expi293	90	W3	C0102	expi293

【表１Ｂ－２】

43	W2	B1503	expi293	91	W3	C1701	expi293
44	W2	B3503	expi293	92	W3	C0704	expi293
45	W2	B3701	expi293	93	W3	C1801	expi293
46	W2	B3801	expi293	94	W2	E0101	expi293
47	W2	B3901	expi293	95	W3	F0101	expi293
48	W2	B4002	expi293	96	W3	G0101	expi293

【表２Ａ】

表 2A: 47 のユニークな HLA クラス II 対立遺伝子

#	ユニークなクラス II 対立遺伝子	#	ユニークなクラス II 対立遺伝子
1	DPB1*0101	25	DRB1*0901
2	DPB1*0101 DPA*01:03	26	DRB1*1001
3	DPB1*0201 DPA*01:03	27	DRB1*1101
4	DPB1*0401 DPA*01:03	28	DRB1*1102
5	DPB1*0402 DPA*01:03	29	DRB1*1104
6	DQ2*B0201*A0501	30	DRB1*1201
7	DQ2*B0202*A0201	31	DRB1*1202
8	DQ6*B0602*A0102	32	DRB1*1301
9	DQ6*B1*0602	33	DRB1*1302
10	DRB1*0101	34	DRB1*1303
11	DRB1*0102	35	DRB1*1401
12	DRB1*0301	36	DRB1*1501
13	DRB1*0302	37	DRB1*1502
14	DRB1*0401	38	DRB1*1503
15	DRB1*0402	39	DRB1*1601
16	DRB1*0403	40	DRB3*0101
17	DRB1*0404	41	DRB3*0202
18	DRB1*0405	42	DRB3*0301
19	DRB1*0407	43	DRB4*0103
20	DRB1*0701	44	DRB5*0101
21	DRB1*0801	45	HLA DM 親和性タグなし
22	DRB1*0802	46	HLA-DM 親和性タグあり
23	DRB1*0803	47	HLA-DO
24	DRB1*0804		

【表２Ｂ】

表 2B: HLA クラス II 対立遺伝子のためのライブラリーおよび細胞株

#ユニークな実験							
#	ライブラリーのウェーブ	クラス II 対立遺伝子	細胞株	#	ライブラリーのウェーブ	クラス II 対立遺伝子	細胞株
1	W1	DRB1_0101	Hek293	28	W2	DRB1_1303	expi293
2	W1	DRB1_0101	expi293	29	W2	DRB1_1401	expi293
3	W1	DRB1_0102	Hek293	30	W2	DRB1_1502	expi293
4	W1	DRB1_0102	expi293	31	W2	DRB1_1503	expi293
5	W1	DRB1_0701	Hek293	32	W2	DRB1_1601	expi293
6	W1	DRB1_0701	expi293	33	W2	DRB4_0103	expi293
7	W1	DRB1_1101	Hek293	34	W2	DPB1_0101	expi293
8	W1	DRB1_1101	HeLa	35	W2	DPB1_0201	expi293
9	W1	DRB1_1101	A375	36	W2	DPB1_0401	expi293
10	W1	DRB1_1101	expi293	37	W2	DPB1_0402	expi293
11	W1	DRB1_1501	Hek293	38	W2	DQ2_B0201_A0501	expi293
12	W1	DRB1_1501	expi293	39	W2	DQ2_B0202_A0201	expi293
13	W2	DRB1_0301	expi293	40	W2	DQ6_B0602_A0102	expi293
14	W2	DRB1_0302	expi293	41	W2	HLA DM タグなし	expi293
15	W2	DRB1_0401	expi293	42	W3	DRB1*0402	expi293
16	W2	DRB1_0404	expi293	43	W3	DRB1*0403	expi293
17	W2	DRB1_0405	expi293	44	W3	DRB1*1102	expi293
18	W2	DRB1_0407	expi293	45	W3	DRB1*1202	expi293
19	W2	DRB1_0801	expi293	46	W3	DRB1*0803	expi293
20	W2	DRB1_0802	expi293	47	W3	DRB3*0101	expi293
21	W2	DRB1_0804	expi293	48	W3	DRB3*0202	expi293
22	W2	DRB1_0901	expi293	49	W3	DRB5*0101	expi293
23	W2	DRB1_1001	expi293	50	W3	DRB3*0301	expi293
24	W2	DRB1_1104	expi293	51	W3	HLA-DO	expi293
25	W2	DRB1_1201	expi293	52	W3	DPB1 0101	expi293
26	W2	DRB1_1301	expi293	53	W3	DQ6 B1 0602	expi293
27	W2	DRB1_1302	expi293	54	W3	HLA-DM タグ付き	expi293

【０４９７】

（実施例４）

複数の親和性タグを含むクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体のタンデムユニバーサルＩＰ

クラスＩＩ　ＨＬＡ複合体を、それぞれ、異なる親和性タグでタグ付けすることができる、α鎖とβ鎖との対形成によって形成させる。両方の親和性タグを使用する連続的ＩＰは、α鎖とβ鎖との対形成のデコンボリューションおよびクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体への明確なペプチド結合割り当てを可能にする。ユニバーサルＩＰパイプラインの異なる細胞型による発現のために操作されたクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物の略図を、図１１Ａに示す。内在性クラスＩＩ　ＨＬＡα鎖およびβ鎖サブユニットを発現する細胞株中での図１１Ａの構築物の発現時に形成することができる可能なクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体の略図を、図１１Ｂに示す。

【０４９８】

α鎖とβ鎖の対形成のデコンボリューションおよび特定のクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体への明確なペプチド結合割り当てのために使用することができる連続的ユニバーサルＩＰ戦略の図を、図１２Ａに示す。二重親和性タグ付きクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物を発現する細胞を溶解し、ビオチン化し、抗ＨＡ抗体にカップリングさせたビーズと共にインキュベートした。ＨＡタグ付きサブユニットを有するクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体を単離し、洗浄し

、ＨＡペプチド（ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ）を使用して溶出した。次いで、溶出液を、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎまたはストレプトアビジンのいずれかとカップリングさせたビーズと共にインキュベートして、ＨＡタグ付きおよびビオチンタグ付きクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体を単離した。次いで、二重タグ付きクラスＩＩ　ＨＬＡ複合体に結合したペプチドを溶出させ、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳにより配列決定する。ウェスタンブロットおよびローディング対照（Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ染色ゲル）により、連続的ユニバーサルＩＰパイプラインの特異性が示された。ウェスタンブロットにより、二重タグ付きＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１構築物を発現するＨＥＫ２９３Ｔにおける連続的ユニバーサルＩＰ戦略が検証された（図１２Ｂ）。抗ＨＡ抗体を使用して、連続富化プロセスを行った。Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ染色ゲルを、ウェスタンブロットのローディング対照として使用した。二重親和性タグ付きクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物ＨＬＡ－ＤＲＢ＊１１：０１を発現する細胞を溶解し、ビオチン化せずに抗ＨＡ抗体にカップリングさせたビーズと共にインキュベートした陰性対照実験のウェスタンブロットを、図１２Ｃに示す。図１２Ｃに示されるように、ビオチン化ステップを連続的ユニバーサルＩＰプロトコールから除去した場合、富化は観察されなかった。

【０４９９】

（実施例５）

ビオチン親和性タグを実装する一対立遺伝子ＨＬＡ－ペプチドームプロファイリング手法

ビオチン親和性タグを実装する一対立遺伝子ＨＬＡ－ペプチドームプロファイリング手法の略図を、図１４Ａおよび図１４Ｂに示す。本開示の例示的実施形態は、ＢｉｒＡ酵素によってリシン（Ｋ）残基上でビオチン化されるビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）を利用する。ＢＡＰペプチド配列は、ＢｉｒＡ酵素、ビオチン、およびＡＴＰの添加時にビオチン化されるリシン残基を含有する。ビオチン化された産物は、ストレプトアビジン／ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎに対する高い親和性を示す。ストレプトアビジン／ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎビーズを使用して、ビオチン化されたＢＡＰペプチド配列を富化することができる。

【０５００】

（実施例６）

標的化されたエピトープ発見プラットフォーム

目的の細胞株（例えば、２ＨＥＫ２９３Ｔ、ｅｘｐｉ２９３、ＨｅＬａ、Ａ３７５、７２１．２２１、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、Ｊｕｒｋａｔ、ＨｅｐＧ２、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＣＡＣＯ－２、Ｕ９３７、Ｕ－２ＯＳ、ＥｘｐｉＣＨＯ、ＣＨＯもしくはＴＨＰ１）または初代細胞（例えば、疾患もしくは状態を有する対象に由来する細胞）に、ＨＬＡ発現細胞を富化するための選択を用いて、または用いずに、ＮまたはＣ末端上にタグ（例えば、ＢＡＰ配列）を含有するクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ構築物をトランスフェクト／形質導入することができる（図１５）。次いで、その細胞に、タグで標識されたＨＬＡ分子上で発現させ、提示することができるエピトープ断片またはエピトープの鎖を含有する第２のプラスミドをトランスフェクトまたは形質導入することができる。あるいは、ＨＬＡ対立遺伝子プラスミドおよびエピトーププラスミドの両方を細胞中に同時に送達した後、拡大増殖および／または選択することができる。次いで、これらの操作された細胞を溶解し、ビオチン化し、ＨＬＡ分子を溶解物から富化する（例えば、ストレプトアビジンビーズを使用して）。ペプチドをＨＬＡ分子から溶出させ、例えば、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって分析する。この方法は、どのようにエピトープがプロセシングされ、異なる対立遺伝子によって提示されるかの分析を可能にする。この方法を使用して、エピトープの送達および設計を改善することもできる。

【０５０１】

（実施例７）

対立遺伝子多重化

１つまたは複数のタグを含有する複数のクラスＩ重鎖または複数のクラスＩＩ＜または（登録商標）鎖を発現するようにＤＮＡ構築物を設計することができる（図１６）。それ

ぞれのＨＬＡ構築物を、リボソームスキッピング配列（Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａなど）またはＩＲＥＳエレメントを含む同じ遺伝子構築物から発現させることができる。所望の細胞株に、このプラスミドを形質導入またはトランスフェクトして、タグ付けされた後、富化される複数のＨＬＡ対立遺伝子の発現を誘導することができる。あるいは、細胞株に、それぞれ、単一のＨＬＡ対立遺伝子を含有する複数のプラスミドを形質導入またはトランスフェクトすることができる。次いで、ＨＬＡ対立遺伝子に結合したペプチドを、例えば、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって分析することができる。このプラットフォームは、複数の対立遺伝子を含む細胞株の生成を可能にする。これを使用して、例えば、患者のＨＬＡ型と一致させることができる。これは、異なる対立遺伝子の組合せに関するペプチドエピトープパターンの生成を可能にするであろう。

【０５０２】

（実施例８）

プロセシングおよび対立遺伝子特異的結合の改善された予測

ＮｅｔＭＨＣは、それぞれの対立遺伝子の結合データセットについて別々の予測因子を訓練する対立遺伝子特異的方法であり、ＮｅｔＭＨＣｐａｎは、インプットが特定のＭＨＣ分子のペプチドおよびサブ配列の両方をコードするベクターである汎用対立遺伝子方法である。従来の常識は、ＮｅｔＭＨＣは多くのアッセイされたリガンドを含む対立遺伝子上でより良好に機能するが、ＮｅｔＭＨＣｐａｎはあまりよく特徴付けられていない対立遺伝子についてより良好に機能するということである。しかしながら、ＮｅｔＭＨＣｐａｎは、関連データが訓練セットに含まれていなかった場合は正確ではないことが示された。

【０５０３】

本明細書に記載の一対立遺伝子手法（図２１）は、ＮｅｔＭＨＣｐａｎによってはスコアが低かったが、強力な結合剤として生化学的に検証されたＨＬＡ結合ペプチドを明らかにした。図２０Ａは、本発明で記載される一対立遺伝子手法を使用して明らかにされた、Ａ＊０１：０１、Ｂ＊５１：０１、Ａ＊２９：０２、およびＢ＊５４：０１対立遺伝子に関する例示的なＨＬＡ結合ペプチドを示す。図２０Ｂは、１００のシミュレートされたデコンボリューションにおける不正確な割り当ての比率を示す。無作為な６つの対立遺伝子患者ＨＬＡ遺伝子型（ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＢおよびＨＬＡ－Ｃのそれぞれの２つの対立遺伝子、ＵＳ対立遺伝子頻度でサンプリング）を生成した。それぞれの対立遺伝子について、関連する一対立遺伝子実験に由来する５００のペプチドをサンプリングし、組み合わせて、モック３０００ペプチド多対立遺伝子データセットを作出した。それぞれのペプチドを、最良のＮｅｔＭＨＣｐａｎ％順位スコアをもたらす対立遺伝子に割り当てて、ＮｅｔＭＨＣｐａｎにより不正確に割り当てられたペプチドのパーセンテージを決定した。このプロセスを１００回繰り返した。図２２に示されるように、プロセシングおよび対立遺伝子特異的結合予測の両方が有意に改善された。

【０５０４】

本開示の段落

ＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付ける方法であって、細胞集団を用意するステップであって、細胞集団の１つまたは複数の細胞が親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含むポリ核酸を含み、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む、ステップ；細胞集団の１つまたは複数の細胞の少なくとも１個の細胞において親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現させ、これにより少なくとも１個の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；およびＨＬＡ－ペプチド複合体を特徴付けるステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子で

ある。

【０５０５】

一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドを特徴付けることを含む。一部の実施形態では、方法は、２つまたはそれより多いクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のための方法のステップを実行することを含む。一部の実施形態では、２つまたはそれより多いクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０個のクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、分泌されない。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、発現された場合、細胞膜に組み込まれる。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体である。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体ではない。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップをさらに含む。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、単一の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。

【０５０６】

一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプターペプチドに作動可能に連結された異なるＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる異なる組換えポリペプチドを含む親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを含む１つまたは複数の細胞をそれぞれ含む細胞集団を用意するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；および富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部を特徴付けるステップを含む。

【０５０７】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数のペプチドを、細胞集団に導入するステップを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つもしくは複数のペプチドと接触させること、または細胞集団中で１つもしくは複数のペプチドを発現させることを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＤＮＡである。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＲＮＡであり、必要に応じて、ＲＮＡはｍＲＮＡである。一部の実施形態では、富化するステップは、四量体試薬の使用を含まない。

【０５０８】

一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の配列を決定すること、必要に応じて、ペプチドまたはその一部が改変されるかどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析、質量分析、ＭＳ分析、ＭＳ／ＭＳ分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の結合親和性または安定性を評価することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、富化するステップに由来する親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部が１つまたは複数の変異を含有するかどうかを決定することを含む。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体中

でのペプチドとＨＬＡ分子との会合を評価することを含む。

【０５０９】

一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団にペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、バイオ医薬品（例えば、抗体薬）などのポリペプチド薬に由来するペプチドのライブラリーを含む。

【０５１０】

一部の実施形態では、疾患または状態は、がん、感染性因子による感染、または自己免疫反応である。一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、バイオ医薬品（例えば、抗体薬）などのポリペプチド薬またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－ペプチド複合体に由来する１つまたは複数のペプチドを特徴付けるステップを含み、必要に応じて、ペプチドは、感染性因子またはポリペプチド薬の１つまたは複数の標的タンパク質に由来する。一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはポリペプチド薬の１つまたは複数の標的タンパク質に由来するペプチドの１つまたは複数の領域を特徴付けるステップを含む。

【０５１１】

一部の実施形態では、方法は、感染性因子に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップを含む。一部の実施形態では、細胞集団は、疾患または状態を有する対象に由来する生体試料に由来する。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、初代細胞の集団である。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を、疾患または状態を有する対象に一致させる。

【０５１２】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドは、抗原提示細胞によって提示された場合、対象に由来するＴ細胞を活性化することができる。一部の実施形態では、特徴付けるステップは、がん細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体を、非がん細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体と比較することを含む。一部の実施形態では、細胞集団は、それぞれの細胞集団が、異なる組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を発現する、複数の細胞集団を含む。一部の実施形態では、複数のうちのそれぞれの細胞集団は、同じか、または別々の容器中にある。

【０５１３】

一部の実施形態では、方法は、特徴付けるステップの前に、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、ＨＬＡ－ペプチド複合体は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まないＨＬＡ－ペプチド複合体は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、細胞培養の培地から単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。例えば、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）などのＨＬＡを、抗ＨＬＡ抗体を含有するビーズまたはカラムを使用して単離することができる。一部の実施形態では、ペプチドは、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、抗ＨＬＡ抗体を使用して単離される。一部の場合、親和性タグを含む、または含まない可溶性ＨＬＡ（ｓＨＬＡ）は、抗ＨＬＡ抗体を含有するカラムを使用して単離される。一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプタータ

グ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドの末端から１つまたは複数のアミノ酸を除去するステップをさらに含む。

【０５１４】

一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトおよび全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡクラスＩＩα鎖、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、それぞれの配列は、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする。

【０５１５】

一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、異なる親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の１つまたは複数は、第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結され、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の１つまたは複数は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、異なる親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のそれぞれは、異なる親和性アクセプターペプチドをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、少なくとも２つの異なるクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、親和性タグをコードする配列にそれぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、方法は、同じか、または異なる親和性アクセプターペプチドに作動可能に連結された異なる組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む少なくとも第２のポリ核酸を投与するステップを含む。

【０５１６】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞外で発現される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部位上に位置する。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞内で発現される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、可撓性ループ配列などの、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列の内部配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に細胞を溶解するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップをさらに含む。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチド結合分子を親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、親和性アクセプターペプチド結合分子は、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する。

【０５１７】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、ソルターゼタグ、ビーズに対して共有ペプチド結合を形成するタグ、またはその組合せを含むタグ配列を含み、必要に応じて、親和性アクセプターペプチドは、タグ

配列の２つまたはそれより多い反復を含む。
【０５１８】
一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性分子を親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、親和性分子は、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。
【０５１９】
一部の実施形態では、親和性分子は、ビオチンに結合する分子を含む。例えば、親和性分子は、他の生物に由来するタンパク質ホモログおよびその誘導体を含む、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎを含んでもよい。
【０５２０】
一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、親和性分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、固相表面は、ビーズである。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を用いて、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。
【０５２１】
一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、コードされる組換えクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、富化するステップは、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。一部の実施形態では、富化するステップは、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。
【０５２２】
一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、トランスフェクトまたは形質導入することを含む。一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸を含むベクターと接触させることを含む。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ポリ核酸は、細胞集団のゲノム中に安定に組み込まれる。
【０５２３】
一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でβ２ミクログロブリンをコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。
【０５２４】
一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、第１の親和性アクセプターペプチドと異なり、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ

、ポリーヒスチジンーグリシンタグ、ポリーアルギニンタグ、ポリーアスパラギン酸タグ、ポリーシステインタグ、ポリーフェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せからなる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【０５２５】

一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【０５２６】

一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析またはタンデム質量分析などの質量分析を実施することを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、ペプチドデータベースに由来する富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された１つまたは複数のペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに対応するペプチド配列を取得することを含み、得られた１つまたは複数の配列は、１つまたは複数のペプチドの配列を識別する。一部の実施形態では、ペプチドデータベースは、改変データベースを含まない、または改変データベースを含むものなどの、非酵素特異性ペプチドデータベースである。一部の実施形態では、方法は、逆データベース検索戦略を使用してペプチドデータベースを検索するステップをさらに含む。

【０５２７】

一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、ヒト細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、マウス細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、ＣＨＯ細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｅｘｐｉ２９３、ＨｅＬａ、Ａ３７５、７２１．２２１、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、ＪｕｒｋａｔおよびＴＨＰ１から選択される細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のサイトカイン、チェックポイント阻害剤、エピジェネティック的に活性な薬物、ＩＦＮ－γ、抗原プロセシングを変更する薬剤（ペプチダーゼ阻害剤

、プロテアソーム阻害剤、およびＴＡＰ阻害剤など）、またはその組合せを用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞の代謝経路または代謝状態をモジュレートする１つまたは複数の試薬を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞の細胞プロテオームをモジュレートする１つまたは複数の試薬を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞の細胞発現または転写をモジュレートまたは調節する１つまたは複数の試薬（例えば、ＡＩＲＥもしくはＣＲＥＢ結合タンパク質またはそのモジュレーター）を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞の転写因子をモジュレートまたは調節する１つまたは複数の試薬を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞のＨＬＡの細胞発現または転写をモジュレートまたは調節する１つまたは複数の試薬を用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞のプロテオームの細胞発現または転写をモジュレートまたは調節する１つまたは複数の試薬を用いて処理される。

【０５２８】

一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^5個の細胞、少なくとも10^6個の細胞または少なくとも10^7個の細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、樹状細胞、マクロファージ、がん細胞またはＢ細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、腫瘍細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団を、１つまたは複数の細胞から前記ＨＬＡ－ペプチド複合体を単離する前に、薬剤と接触させる。一部の実施形態では、前記薬剤は、炎症性サイトカイン、化学薬剤、アジュバント、治療剤または放射線である。

【０５２９】

一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子は、変異したＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、バーコード配列を含む。一部の実施形態では、方法は、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の発現についてアッセイするステップをさらに含む。一部の実施形態では、アッセイするステップは、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を配列決定すること、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子ＲＮＡを検出すること、親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子タンパク質を検出すること、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、発現についてアッセイするステップは、ウェスタンブロットアッセイ、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）、質量分析（ＭＳ）、マイクロアレイハイブリダイゼーションアッセイ、ＲＮＡ－ｓｅｑアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応アッセイ、ＬＡＭＰアッセイ、リガーゼ連鎖反応アッセイ、サザンブロットアッセイ、ノーザンブロットアッセイ、または酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を含んでもよい。

【０５３０】

一部の実施形態では、方法は、異なるＨＬＡ対立遺伝子のための方法のステップを実行することを含む。一部の実施形態では、それぞれ異なるＨＬＡ対立遺伝子は、ユニークなバーコード配列を含む。一部の実施形態では、異なるＨＬＡ対立遺伝子をコードするそれぞれのポリ核酸は、ユニークなバーコード配列を含む。

【０５３１】

本明細書に記載の方法を実行することによって得られるＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベースが、本明細書で提供される。毎回、異なるＨＬＡ－対立遺伝子を使用して、本明細書に記載の方法を反復的に実行することによって得られる２つまたはそれより多いＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチド配列データベースの組合せが、本明細書で提供される。本明細書に記載のペプチド配列データベースまたは本明細書に記載の組合せを用いてマシンを訓練するステップを含む、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための予測アルゴリズムを生成するための方法が、本明細書で提供される。

【０５３２】

一部の実施形態では、マシンは、１つまたは複数の線形モデル、サポートベクターマシン、決定木およびニューラルネットワークを組み合わせる。一部の実施形態では、マシンを訓練するために使用される変数は、ペプチド配列、アミノ酸の物理特性、ペプチドの物

理特性、細胞内のペプチドの供給源タンパク質の発現レベル、タンパク質安定性、タンパク質翻訳率、ユビキチン化部位、タンパク質分解率、リボソームプロファイリングからの翻訳効率、タンパク質切断性、タンパク質局在化、ＴＡＰ輸送を容易にする宿主タンパク質のモチーフ、自食作用を受ける宿主タンパク質、リボソーム失速を好むモチーフ、およびＮＭＤを好むタンパク質特性からなる群から選択される１つまたは複数の変数を含む。

【０５３３】

一部の実施形態では、リボソーム失速を好むモチーフは、ポリプロリンまたはポリリシン伸長物を含む。一部の実施形態では、ＮＭＤを好むタンパク質特性は、長い３’ＵＴＲ、最後のエクソン：エクソン接合部の５０ｎｔを超えて上流にある停止コドン、およびペプチド切断性からなる群から選択される。

【０５３４】

ＨＬＡ－対立遺伝子特異的結合ペプチドを識別するための方法であって、ＨＬＡ－対立遺伝子に関して本明細書に記載の方法を実行することによって得られるペプチド配列データベースを用いて訓練されたマシンを用いて、ペプチドの配列を分析するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、細胞内のペプチドの供給源タンパク質の発現レベルを決定するステップを含み、ここで、供給源タンパク質発現は、マシンによって使用される予測変数である。一部の実施形態では、発現レベルは、供給源タンパク質の量または前記供給源タンパク質をコードするＲＮＡの量を測定することによって決定される。

【０５３５】

親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをそれぞれコードする２つまたはそれより多い配列を含む組換えポリ核酸を含む組成物であって、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、異なる組換えＨＬＡクラスＩα鎖対立遺伝子をコードする配列、親和性アクセプターペプチドをコードする配列、および必要に応じて、β２ミクログロブリンをコードする配列を含み、（ａ）および（ｂ）、ならびに必要に応じて（ｃ）の配列が、作動可能に連結される、組成物が本明細書で提供される。

【０５３６】

親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列をそれぞれ含む２つまたはそれより多い配列を含む組換えポリ核酸を含む組成物であって、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列が、組換えＨＬＡクラスＩＩα鎖対立遺伝子をコードする配列、親和性アクセプターペプチドをコードする配列、および必要に応じて、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含み、（ａ）および（ｂ）、ならびに必要に応じて（ｃ）の配列が、作動可能に連結される、組成物が本明細書で提供される。一部の実施形態では、組換えポリ核酸は、単離される。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。

【０５３７】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプター分子をコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって組換えＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。

【０５３８】

一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、同じポリヌクレオチドから発現される。一部の実施形態では、親和性ア

クセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、異なるポリヌクレオチドから発現される。一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、２つまたはそれより多い親和性アクセプターペプチドを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列は、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする３つまたはそれより多い配列を含み、ここで、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする３つまたはそれより多い配列のうちの少なくとも２つは、同じ親和性アクセプターペプチドを含む。一部の実施形態では、２つまたはそれより多い親和性アクセプターペプチドは、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする２つまたはそれより多い配列のそれぞれについてユニークである。

【０５３９】

一部の実施形態では、コードされる親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せからなる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【０５４０】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、親和性分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、組換えクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、組換えポリ核酸の２つまたはそれより多くについて、親和性アクセプタータグ付きＨＬＡをコードする配列は、細胞のゲノム中に安定に組み込まれる。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第２の親和性アクセプターペプチドは、ＨＡタグを含む。一部の実施形態では

、β２ミクログロブリンをコードする配列またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによって組換えＨＬＡおよび親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。

【０５４１】

一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【０５４２】

本明細書に記載の組成物のポリ核酸によってコードされる２つまたはそれより多い単離されたポリペプチド分子を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物のポリ核酸によってコードされる２つまたはそれより多いポリペプチド分子を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。本明細書に記載の組成物を含む１つまたは複数の細胞を含む細胞集団を含む組成物が、本明細書で提供される。

【０５４３】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性クラスＩまたはクラスＩＩＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠くように操作される。一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。一部の実施形態では、組成物は、患者のＨＬＡ型に特異的なペプチドまたはペプチドをコードするポリ核酸を使用して製剤化される。細胞を作製する方法であって、２つまたはそれより多い細胞に、本明細書に記載の組成物の２つまたはそれより多いポリ核酸を形質導入するか、またはトランスフェクトするステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【０５４４】

本明細書に記載の方法に従って識別されるペプチドが、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において抗腫瘍応答を誘導する方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を含む細胞を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、細胞は、ＨＬＡ－ペプチド複合体としてペプチドを提示する。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物

に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。哺乳動物において免疫応答を誘導するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【０５４５】

一部の実施形態では、免疫応答は、Ｔ細胞免疫応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、ＣＤ８　Ｔ細胞応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、ＣＤ４　Ｔ細胞応答である。一部の実施形態では、免疫応答は、液性免疫応答である。

【０５４６】

疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。疾患を有する哺乳動物を処置するための方法であって、哺乳動物に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸を含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、疾患は、がんである。一部の実施形態では、疾患は、感染性因子による感染である。一部の実施形態では、感染性因子は、病原体、必要に応じて、ウイルスまたは細菌、または寄生虫である。

【０５４７】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＢＫウイルス（ＢＫＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３、ＤＥＮＶ－４、ＤＥＮＶ－５）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトＴ細胞リンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ－１）、インフルエンザウイルス、ＲＳＶ、ＨＰＶ、狂犬病、流行性耳下腺炎、風疹ウイルス、ポリオウイルス、黄熱、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ロタウイルス、水痘ウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、天然痘、帯状疱疹、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【０５４８】

一部の実施形態では、細菌は、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｓｐｐ．、Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ　ｗｈｉｐｐｌｅｉ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｅｐｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、腸チフス、肺炎球菌、髄膜炎菌、ヘモフィルスＢ、炭疽菌、破傷風トキソイド、Ｂ群髄膜炎菌、ｂｃｇ、コレラ、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【０５４９】

一部の実施形態では、寄生虫は、寄生蠕虫または原生動物である。一部の実施形態では、寄生虫は、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ　ｓｐｐ．、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｓｐｐ．、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉ、Ａｓｃａｒｉｓ　ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ、Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ　ｔｒｉｃｈｉｕｒａ、Ｎｅｃａｔｏｒ　ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ　ｓｐｐ．、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【０５５０】

免疫原性ペプチドを富化する方法であって、組換えＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる組換えＨＬＡに作動可能に連結された親和性アクセプターペプチドを含む親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを発現する１つまたは複数の細胞を含む細胞集団を用意するステップ；および親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを含むＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－

ペプチド複合体から単離された免疫原性ペプチドの配列を決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、決定するステップは、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用することを含む。

【０５５１】

対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドの有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドを含む細胞の有効量を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。対象において疾患または障害を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載のペプチドの配列を含むペプチドをコードする配列を含むポリ核酸の有効量を含む細胞を投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。

【０５５２】

疾患または状態を有する対象のための治療薬を開発する方法であって、疾患または状態を有する対象に由来する細胞集団を用意するステップ、親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む配列をコードするポリ核酸を、１つまたは複数の細胞中に導入することによって、細胞集団の１つまたは複数の細胞中で、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を発現させ、これにより１つまたは複数の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化し、特徴付けるステップ；および必要に応じて、特徴付けに基づいて治療薬を開発するステップを含む方法が本明細書で提供される。

【０５５３】

少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原を識別し、少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原を含む対象特異的免疫原性組成物を調製する方法であって、対象が疾患を有し、少なくとも１つの対象特異的免疫原性抗原が対象および対象の疾患に特異的であり、前記方法が、疾患または状態を有する対象に由来する細胞集団を用意するステップ；親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む配列をコードするポリ核酸を、１つまたは複数の細胞中に導入することによって、対象に由来する細胞集団の１つまたは複数の細胞中で、親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を発現させ、これにより１つまたは複数の細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；１つまたは複数の細胞から親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；対象および対象の疾患に特異的である富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から免疫原性ペプチドを識別するステップ；ならびに識別された対象特異的免疫原性ペプチドの１つまたは複数に基づいて対象特異的免疫原性組成物を製剤化するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【０５５４】

一部の実施形態では、治療薬または対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドまたは富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、治療薬または対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現するＴ細胞を含む。一部の実施形態では、対象特異的免疫原性組成物は、富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するポリペプチドに特異的に結合する受容体を発現するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞を含む。

【０５５５】

一部の実施形態では、方法は、別の治療剤、必要に応じて、免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、アジュバント、必要に応じて、ポリ－ＩＣＬＣを対象に投与するステップをさらに含む。

【０５５６】

一部の実施形態では、疾患または障害は、がんである。一部の実施形態では、疾患または障害は、自己免疫疾患である。一部の実施形態では、疾患または障害は、感染である。一部の実施形態では、感染は、感染性因子による感染である。一部の実施形態では、感染性因子は、病原体、ウイルス、細菌、または寄生虫である。

【０５５７】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＢＫウイルス（ＢＫＶ）、デングウイルス（ＤＥＮＶ－１、ＤＥＮＶ－２、ＤＥＮＶ－３、ＤＥＮＶ－４、ＤＥＮＶ－５）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ヒトＴ細胞リンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ－１）、インフルエンザウイルス、ＲＳＶ、ＨＰＶ、狂犬病、流行性耳下腺炎、風疹ウイルス、ポリオウイルス、黄熱、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ロタウイルス、水痘ウイルス、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、天然痘、帯状疱疹、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【０５５８】

一部の実施形態では、細菌は、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｔｒｏｐｈｅｒｙｍａ ｗｈｉｐｐｌｅｉ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒｏｍａｔｏｓｉｓ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、腸チフス、肺炎球菌、髄膜炎菌、ヘモフィルスＢ、炭疽菌、破傷風トキソイド、Ｂ群髄膜炎菌、ｂｃｇ、コレラ、およびその組合せからなる群から選択される。

【０５５９】

一部の実施形態では、寄生虫は、寄生蠕虫または原生動物である。一部の実施形態では、寄生虫は、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐｐ．、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｓｐｐ．、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ、Ａｓｃａｒｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ、Ｔｒｉｃｈｕｒｉｓ ｔｒｉｃｈｉｕｒａ、Ｎｅｃａｔｏｒ ａｍｅｒｉｃａｎｕｓ、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｓｐｐ．、およびその任意の組合せからなる群から選択される。

【０５６０】

疾患または状態を有する対象のための治療薬を開発する方法であって、細胞集団を用意するステップであって、細胞集団の１つまたは複数の細胞が少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含むポリ核酸を含み、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列が第１の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された第１のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む第１の組換え配列、および第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に作動可能に連結された第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列を含む第２の組換え配列を含む、ステップ；少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きＨＬＡを、細胞集団の１つまたは複数の細胞の少なくとも１つの細胞中で発現させ、これにより少なくとも１つの細胞中で親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を形成するステップ；親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を富化するステップ；および富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップ；ならびに識別されたペプチドの１つまたは複数に基づいて免疫原性組成物を製剤化するステップであって、第１および第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子が、対象のＨＬＡハプロタイプに一致する、ステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、対象は、疾患または状態を有する。

【０５６１】

一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子と異なる。一部の実施形態では、第１の親和性アクセプターペプチドは、第２の親和性アクセプターペプチドと同じである。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドを特徴付けるステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０個のクラスＩおよび／またはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、膜貫通ドメインを含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、排出されない。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、発現された場合、細胞膜に組み込まれる。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体は、可溶性の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体ではない。

【０５６２】

一部の実施形態では、方法は、ＨＬＡ－対立遺伝子特異的ペプチドデータベースを生成するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の外因性ペプチドを、細胞集団に導入するステップを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つもしくは複数の外因性ペプチドと接触させること、または細胞集団中で１つもしくは複数の外因性ペプチドを発現させることを含む。一部の実施形態では、導入するステップは、細胞集団を１つまたは複数の外因性ペプチドをコードする１つまたは複数の核酸と接触させることを含む。

【０５６３】

一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＤＮＡである。一部の実施形態では、１つまたは複数のペプチドをコードする１つまたは複数の核酸は、ＲＮＡであり、必要に応じて、ＲＮＡは、ｍＲＮＡである。

【０５６４】

一部の実施形態では、富化するステップは、四量体試薬の使用を含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の配列を決定するステップを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、生化学分析、質量分析、ＭＳ分析、ＭＳ／ＭＳ分析、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析、またはその組合せを含む。

【０５６５】

一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部の結合親和性または安定性を評価するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップに由来する第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に結合したペプチドまたはその一部が、１つまたは複数の変異を含有するかどうかを決定するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体中でのペプチドと、ＨＬＡ分子との会合を評価するステップを含む。

【０５６６】

一部の実施形態では、方法は、細胞集団中でペプチドのライブラリーを発現させ、これにより親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、細胞集団に、ペプチドのライブラリーまたはペプチドをコードする配列のライブラリーを接触させ、これにより親和性アクセプター

タグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体のライブラリーを形成するステップを含む。一部の実施形態では、ライブラリーは、疾患または状態と関連するペプチドのライブラリーを含む。

【０５６７】

一部の実施形態では、疾患または状態は、がんまたは感染性因子による感染である。一部の実施形態では、方法は、感染性因子またはその一部を、細胞集団の１つまたは複数の細胞中に導入するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体に由来する１つまたは複数のペプチドを特徴付けるステップを含み、必要に応じて、ペプチドは、感染性因子の１つまたは複数の標的タンパク質に由来する。一部の実施形態では、方法は、感染性因子の１つまたは複数の標的タンパク質に由来するペプチドの１つまたは複数の領域を特徴付けるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、感染性因子に由来する第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを識別するステップを含む。

【０５６８】

一部の実施形態では、細胞集団は、疾患または状態を有する対象に由来する生体試料に由来する。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞株である。一部の実施形態では、細胞集団は、初代細胞の集団である。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドは、抗原提示細胞によって提示された場合、対象に由来するＴ細胞を活性化することができる。一部の実施形態では、方法は、疾患細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体を、非疾患細胞に由来するＨＬＡ－ペプチド複合体と比較するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、識別するステップの前に、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に由来するペプチドを単離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、細胞集団は、低細胞表面ＨＬＡクラスＩまたはクラスＩＩ発現細胞の集団である。

【０５６９】

一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、細胞集団によって通常発現される内在性ＨＬＡ対立遺伝子を発現する。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数の内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、内在性ＨＬＡクラスＩ対立遺伝子および内在性ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を欠く操作された細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、１つまたは複数のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、細胞集団は、全てのＨＬＡクラスＩ対立遺伝子のノックアウトおよび全てのＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子のノックアウトである。一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、およびＨＬＡ－Ｇからなる群から選択される。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のクラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、少なくとも２つの親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、クラスＩＩ　ＨＬＡをコードする。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される。一部の実施形態では、クラスＩＩ　ＨＬＡは、ＨＬＡクラスＩＩα鎖、ＨＬＡクラスＩ

Ｉβ鎖、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子である。

【０５７０】

一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、それぞれ作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、異なるポリヌクレオチド分子上に含まれる。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および／または第２のコードされる親和性アクセプターペプチドは、細胞外で発現される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＮ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞内部分をコードする配列に作動可能に連結される。一部の実施形態では、コードされる第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、細胞内で発現される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列のＣ末端に作動可能に連結される。一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドをコードする配列は、リンカーによって第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列に作動可能に連結される。

【０５７１】

一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を発現するインタクトな細胞を富化することを含む。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に細胞を溶解するステップを含まない。一部の実施形態では、方法は、富化するステップの前に１つまたは複数の細胞を溶解するステップをさらに含む。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性アクセプターペプチド結合分子を、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、ここで、親和性アクセプターペプチド結合分子は、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する。

【０５７２】

一部の実施形態では、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓ

ｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、またはその組合せを含むタグ配列を含み、必要に応じて、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドは、タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【０５７３】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、ビオチンまたは第１および／もしくは第２の親和性アクセプターペプチドに特異的な抗体である。一部の実施形態では、富化するステップは、親和性分子を、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体に接触させることを含み、ここで、親和性分子は、親和性アクセプターペプチド結合分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性分子は、ストレプトアビジン、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ、またはその誘導体である。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。

【０５７４】

一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、親和性分子は、固相表面に付着される。一部の実施形態では、固相表面は、ビーズである。

【０５７５】

一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドに特異的に結合する親和性アクセプターペプチド結合分子を用いて、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体を免疫沈降させることを含む。一部の実施形態では、親和性アクセプターペプチド結合分子は、コードされる第１および／または第２のクラスＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列ともクラスＩＩ　ＨＬＡのアミノ酸配列とも特異的に相互作用しない。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の細胞外部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。一部の実施形態では、富化するステップは、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子のＮ末端部分に特異的な親和性分子を接触させることを含む。

【０５７６】

一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸と接触させることを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、トランスフェクトまたは形質導入することを含む。一部の実施形態では、用意するステップは、細胞集団をポリ核酸を含むベクターと接触させることを含む。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ポリ核酸は、細胞集団のゲノム中に安定に組み込まれる。

【０５７７】

一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、第１の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第１のＨＬＡクラスＩα鎖であり、第２の組換えクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、第２のＨＬＡクラスＩα鎖である。

【０５７８】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でβ２ミクログロブリンをコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードす

る配列は、リンカーによって第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、β２ミクログロブリンをコードする配列は、第３の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。

【０５７９】

一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドと異なる。一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩα鎖および／またはＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、第１のＨＬＡクラスＩＩα鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を含む。一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、第１のＨＬＡクラスＩＩα鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列は、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第１および／または第２のクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡをコードする配列は、第１のＨＬＡクラスＩＩβ鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列を含む。

【０５８０】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数の細胞中でＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列を発現させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、第１のＨＬＡクラスＩＩβ鎖および第２のＨＬＡクラスＩＩβ鎖をコードする配列は、リンカーによってＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列に接続される。一部の実施形態では、ＨＬＡクラスＩＩβ鎖またはＨＬＡクラスＩＩα鎖をコードする配列は、第３の親和性アクセプターペプチドをコードする配列に接続される。一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１および／または第２の親和性アクセプターペプチドと異なる。

【０５８１】

一部の実施形態では、第３の親和性アクセプターペプチドは、第１の親和性アクセプターペプチドと異なり、ビオチンアクセプターペプチド（ＢＡＰ）、ポリ－ヒスチジンタグ、ポリ－ヒスチジン－グリシンタグ、ポリ－アルギニンタグ、ポリ－アスパラギン酸タグ、ポリ－システインタグ、ポリ－フェニルアラニン、ｃ－ｍｙｃタグ、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ、ＦＬＡＧタグ、ＫＴ３エピトープタグ、チューブリンエピトープタグ、Ｔ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ、ストレプトアビジンタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド（ＳＰＢ）タグ、Ｓｔｒｅｐタグ、ＳｔｒｅｐタグＩＩ、アルブミン結合タンパク質（ＡＢＰ）タグ、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）タグ、ブルータングウイルスタグ（Ｂ－タグ）、カルモジュリン結合ペプチド（ＣＢＰ）タグ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）タグ、コリン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、キチン結合ドメイン（ＣＢＤ）タグ、セルロース結合ドメイン（ＣＢＰ）タグ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（ＤＨＦＲ）タグ、ガラクトース結合タンパク質（ＧＢＰ）タグ、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ（ＥＥ）タグ、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）タグ、ＮＥ－タグ、ＨＳＶタグ、ケトステロイドイソメラーゼ（ＫＳＩ）タグ、ＫＴ３タグ、ＬａｃＺタグ、ルシフェラーゼタグ、ＮｕｓＡタグ、ＰＤＺドメインタグ、ＡｖｉＴａｇ、カルモジュリンタグ、Ｅ－タグ、Ｓ－タグ、ＳＢＰ－タグ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ３、ＴＣタグ、ＶＳＶ－タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、Ｉｓｏｐｅｐｔａｇ、ＳｐｙＴａｇ、ＳｎｏｏｐＴａｇ、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ　ｅＸａｃｔタグ、プロテインＣタグ、Ｓ１－タグ、Ｓ－タグ、ビオチン－カルボキシ担体タンパク質（ＢＣＣＰ）タグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）タグ、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）タグ、タンデム親和性精製（ＴＡＰ）タグ、ＨａｌｏＴａｇ、Ｎｕｓ－タグ、チオレドキシンタグ、Ｆｃ－タグ、ＣＹＤタグ、ＨＰＣタグ、ＴｒｐＥタグ、ユビキチンタグ、ＶＳＶ－Ｇエピトープタグ、Ｖ５タグ、およびその組合せからなる群から選択され、必要に応じて、第１または第２の親和性アクセプターペプチドは、

タグ配列の２つまたはそれより多い反復を含む。

【０５８２】

一部の実施形態では、リンカーは、切断性リンカーをコードするポリ核酸配列を含む。一部の実施形態では、切断性リンカーは、リボソームスキッピング部位または内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントである。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位またはＩＲＥＳは、細胞中で発現された場合に切断される。一部の実施形態では、リボソームスキッピング部位は、Ｆ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、およびＥ２Ａからなる群から選択される。一部の実施形態では、ＩＲＥＳエレメントは、一般的な細胞性またはウイルス性ＩＲＥＳ配列から選択される。

【０５８３】

一部の実施形態では、方法は、生化学分析またはタンデム質量分析などの質量分析を実施するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ペプチドデータベースに由来する富化された親和性アクセプタータグ付きＨＬＡ－ペプチド複合体から単離された１つまたは複数のペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに対応するペプチド配列を取得するステップを含み、ここで、得られた１つまたは複数の配列は、１つまたは複数のペプチドの配列を識別する。

【０５８４】

一部の実施形態では、細胞集団は、ＨＥＫ２９３Ｔ、ｅｘｐｉ２９３、ＨｅＬａ、Ａ３７５、７２１．２２１、ＪＥＧ－３、Ｋ５６２、ＪｕｒｋａｔおよびＴＨＰ１から選択される細胞株である。一部の実施形態では、細胞株は、１つまたは複数のサイトカイン、チェックポイント阻害剤、エピジェネティック的に活性な薬物、ＩＦＮ－γ、またはその組合せを用いて処理される。一部の実施形態では、細胞集団は、少なくとも10^5個の細胞、少なくとも10^6個の細胞または少なくとも10^7個の細胞を含む。一部の実施形態では、細胞集団は、樹状細胞、マクロファージ、がん細胞またはＢ細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、腫瘍細胞を含む。

【０５８５】

一部の実施形態では、細胞集団を、１つまたは複数の細胞から第１および／または第２のＨＬＡ－ペプチド複合体を単離する前に、薬剤と接触させる。一部の実施形態では、薬剤は、炎症性サイトカイン、化学薬剤、アジュバント、治療剤または放射線である。

【０５８６】

一部の実施形態では、第１および／または第２のＨＬＡ対立遺伝子は、変異したＨＬＡ対立遺伝子である。一部の実施形態では、第１および／または第２のＨＬＡ対立遺伝子をコードする配列は、バーコード配列を含む。一部の実施形態では、方法は、第１および／または第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子の発現についてアッセイするステップをさらに含む。

【０５８７】

一部の実施形態では、アッセイするステップは、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子を配列決定すること、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子ＲＮＡをコードするＲＮＡを検出すること、第１および／もしくは第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩもしくはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子タンパク質を検出すること、またはその組合せを含む。一部の実施形態では、第１および第２の親和性アクセプタータグ付きクラスＩまたはクラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子は、ユニークなバーコード配列を含む。一部の実施形態では、第１の配列および第２の配列は、ユニークなバーコード配列を含む。

【図１Ａ】

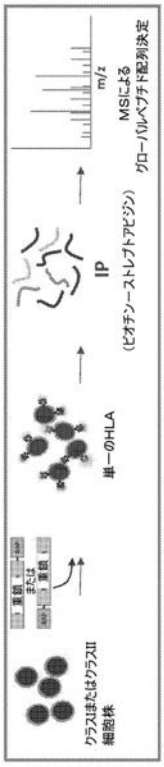

FIG. 1A

【図１Ｂ】

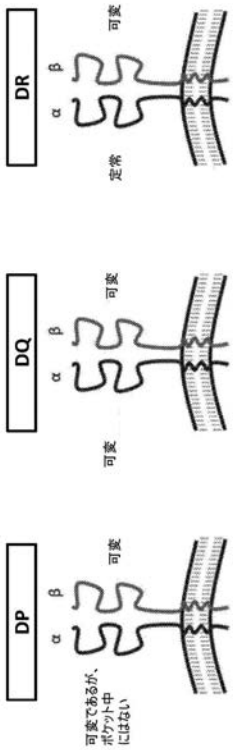

FIG. 1B

【図２】

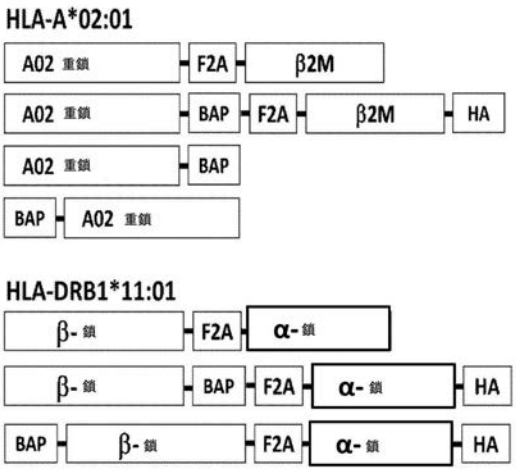

FIG. 2

【図３】

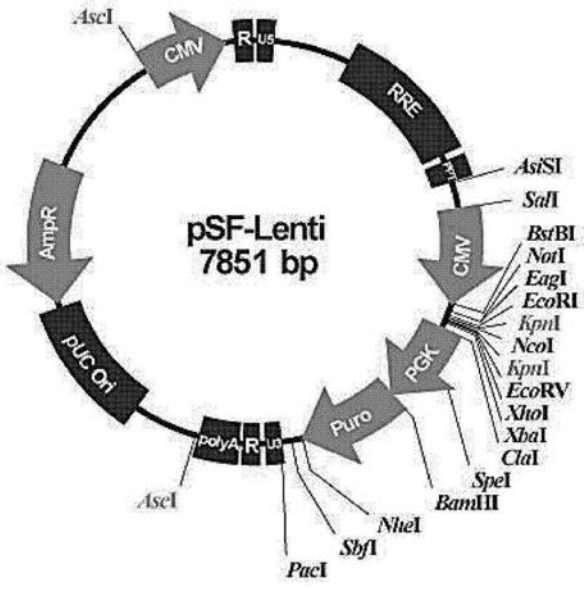

FIG. 3

【図４Ａ】

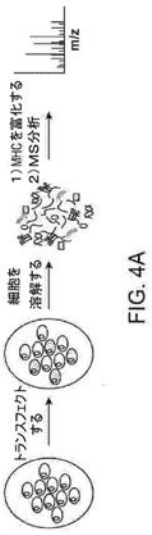

FIG. 4A

【図４Ｂ】

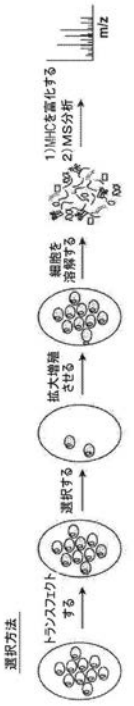

FIG. 4B

【図５】

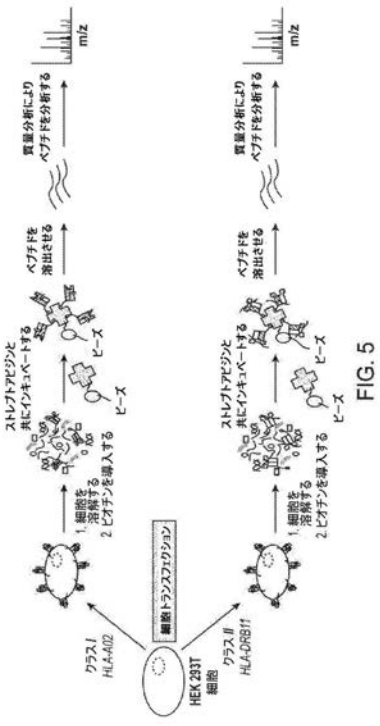

FIG. 5

【図６Ａ】

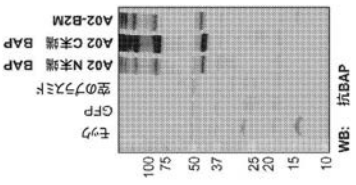

FIG. 6A

【図６Ｂ】

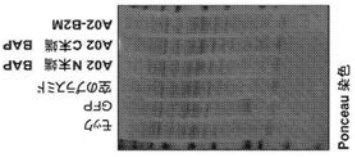

FIG. 6B

【図６Ｃ】

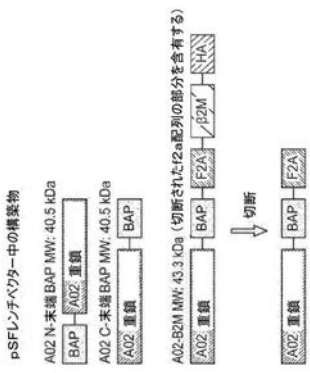

FIG. 6C

【図７Ａ】

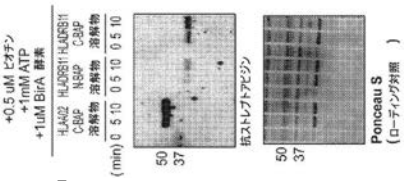

FIG. 7A

【図７Ｂ】

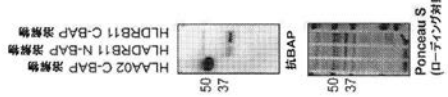

FIG. 7B

【図７Ｃ】

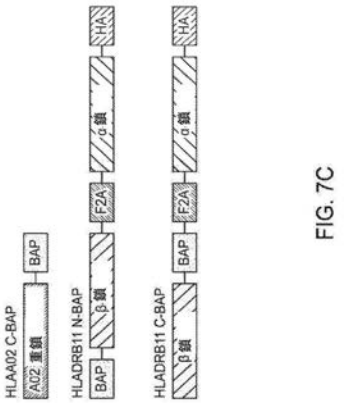

FIG. 7C

【図８Ａ】

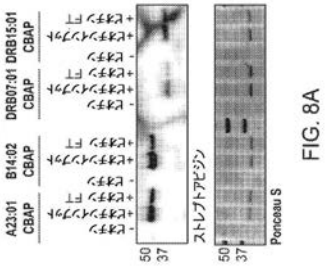

FIG. 8A

【図８Ｂ】

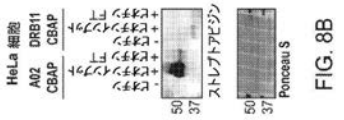

FIG. 8B

【図８Ｃ】

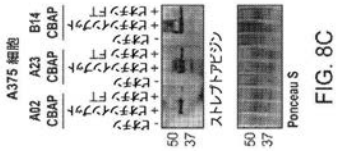

FIG. 8C

【図８Ｄ】

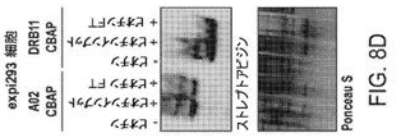

FIG. 8D

【図９Ａ】

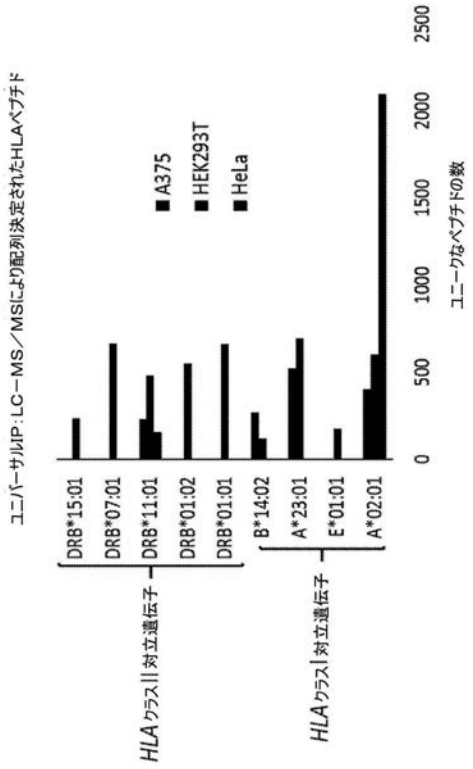

FIG. 9A

【図９Ｂ】

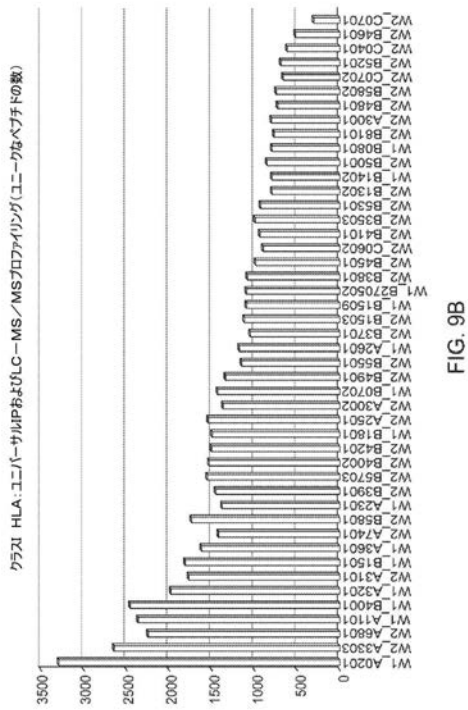

FIG. 9B

【図９Ｃ】

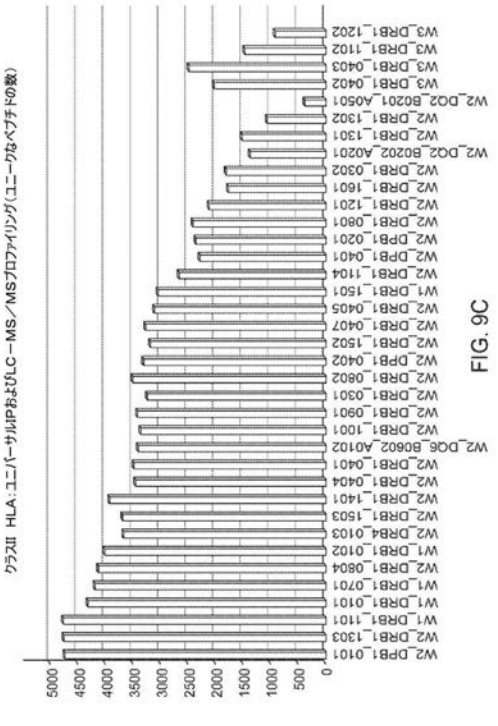

FIG. 9C

【図１０Ａ】

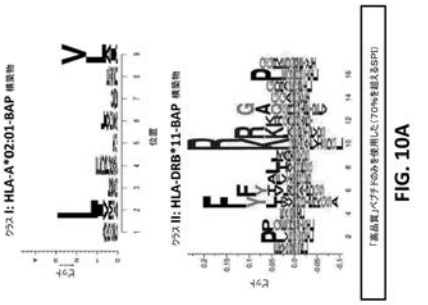

FIG. 10A

【図１０Ｂ】

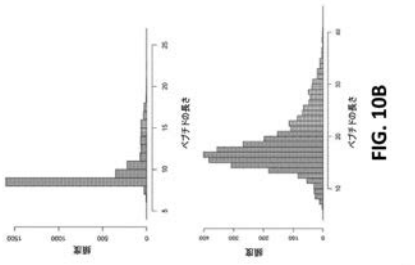

FIG. 10B

【図１１Ａ】

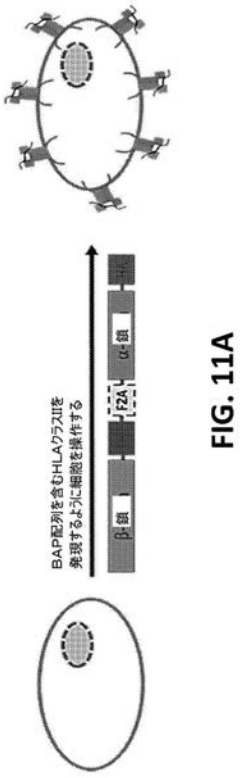

FIG. 11A

【図１１Ｂ】

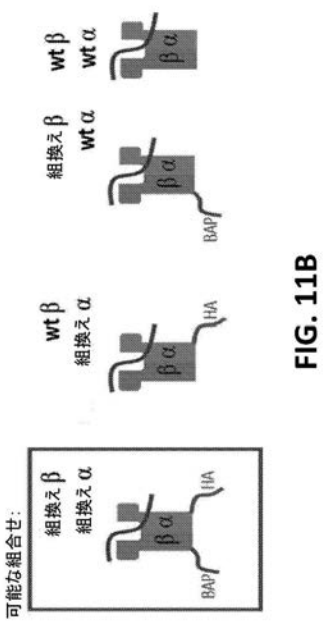

FIG. 11B

【図１２Ａ】

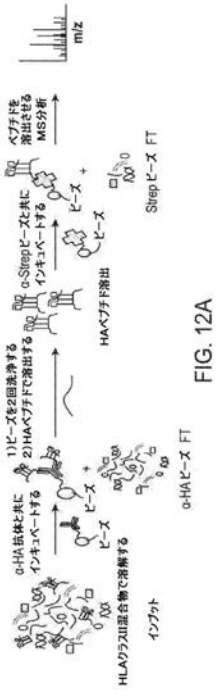

FIG. 12A

【図１２Ｂ】

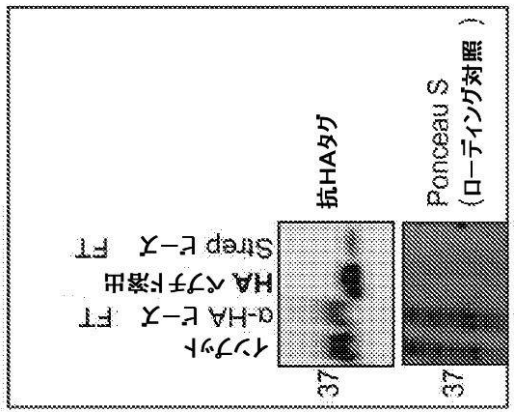

FIG. 12B

【図１２Ｃ】

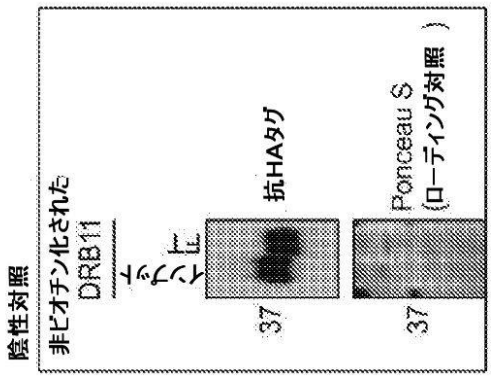

FIG. 12C

【図１３】

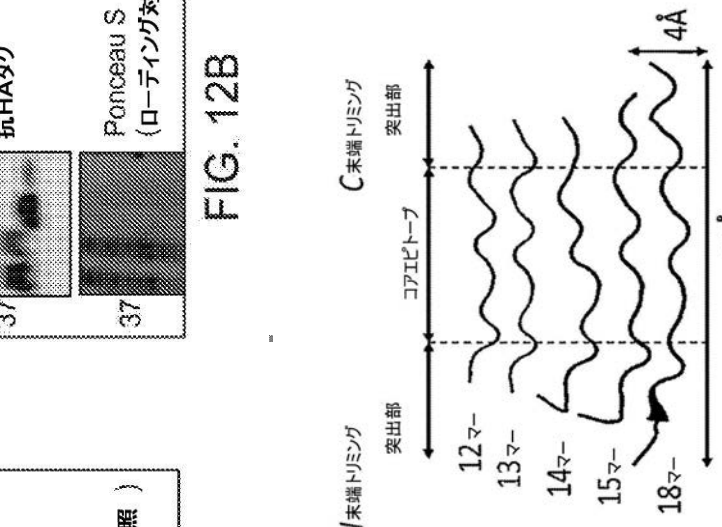

FIG. 13

【図１４Ａ】

FIG. 14A

【図１４Ｂ】

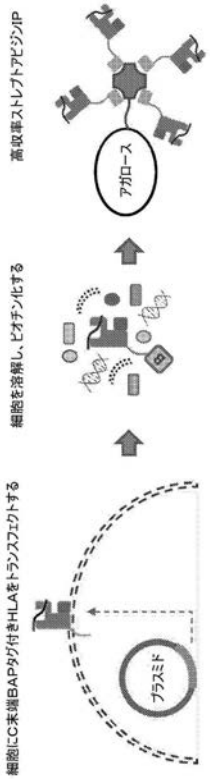

FIG. 14B

【図１５】

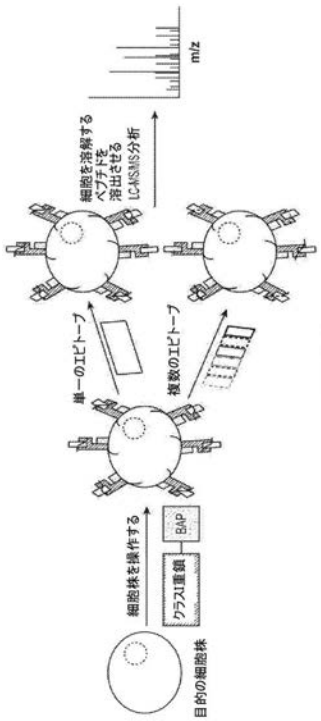

FIG. 15

【図１６】

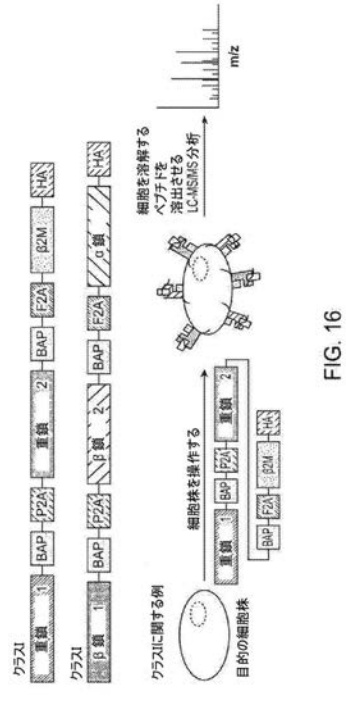

FIG. 16

【図１７】

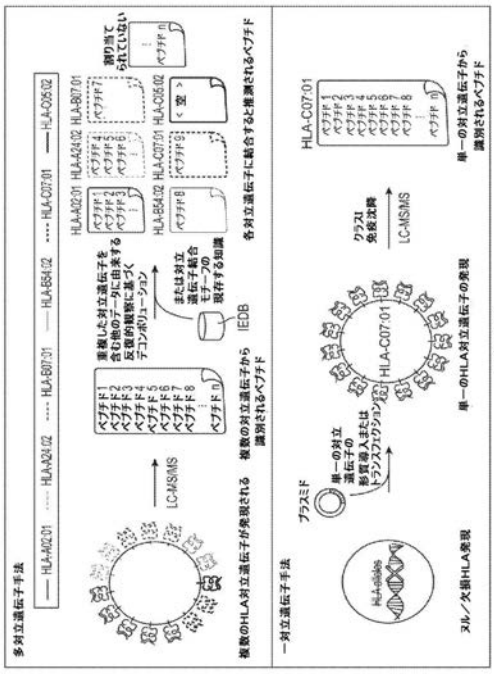

FIG. 17

【図１８Ａ】

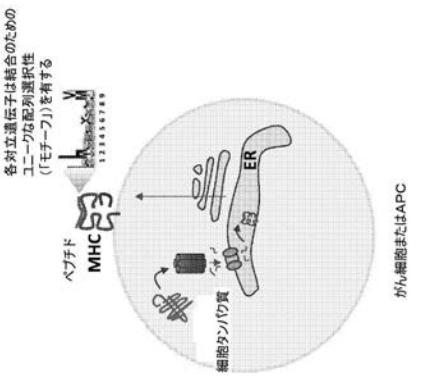

FIG. 18A

【図１８Ｂ】

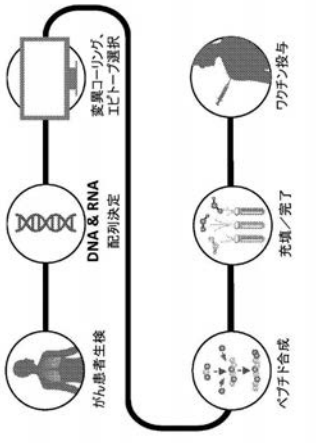

FIG. 18B

【図１９】

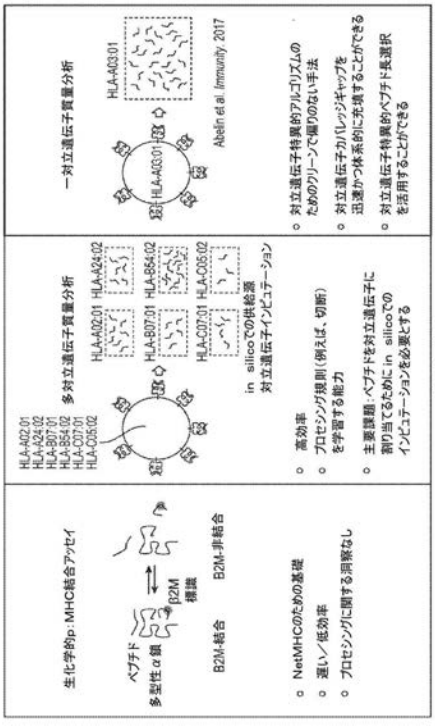

FIG. 19

【図２０Ａ】

		ペプチド	netMHCpan 2.8 (nM)	測定値 (nM)
A*01:01	1	FSWPNAPLY	409.9	1.3
	2	YVYESWEYY	551.9	11.1
	3	KSDLAEQEY	466.7	70.6
	4	TTDGYLLRL	792.1	78.9
	5	DTEFPNPKY	344.0	80.8
	6	ATDGSVVLW	532.5	191.4
B*51:01	1	DGLLAEVLTV	11221.3	0.2
	2	DAPLNTRSI	17149.1	6.5
	3	DGLADLPSI	12708.1	12.6
	4	DGYVVKSTI	13414.5	13.4
	5	DSRLVINRV	18358.8	13.5
	6	DAYPQRIKF	12680.6	31.0
	7	IIYPTPKVV	11654.4	38.0
	8	VPPLVDKVL	11306.6	56.3
	9	TPESKTRFV	9509.3	84.8
	10	VALLAVSSRV	9538.0	143.6
A*29:02	11	YIERSEPLI	16193.4	1791.8
	1	FYPELKLAY	398.3	0.2
	2	HFADSHLVF	825.4	1.6
	3	YLPAAAVEY	113.3	2.6
	4	LPLDIQIFY	359.2	4.6
	5	ALSDLAAIHF	217.8	6.0
	6	GLDDRILLHY	157.5	21.3
	7	GLPDLVAKY	123.9	29.7
B*54:01	1	YPVQPVGP	8015.0	1.7
	2	YGFVAIVTA	5011.5	6.0
	3	FVSILIPVA	6043.1	12.2
	4	FPKSTPSGP	8478.9	16.4
	5	SAPVNFISA	5762.2	16.6

FIG. 20A

【図２０Ｂ】

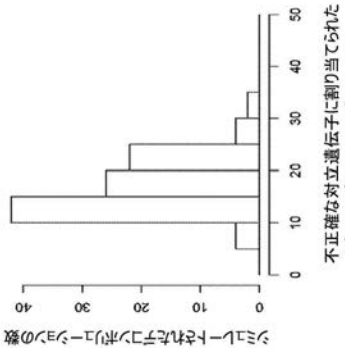

FIG. 20B

【図２１】

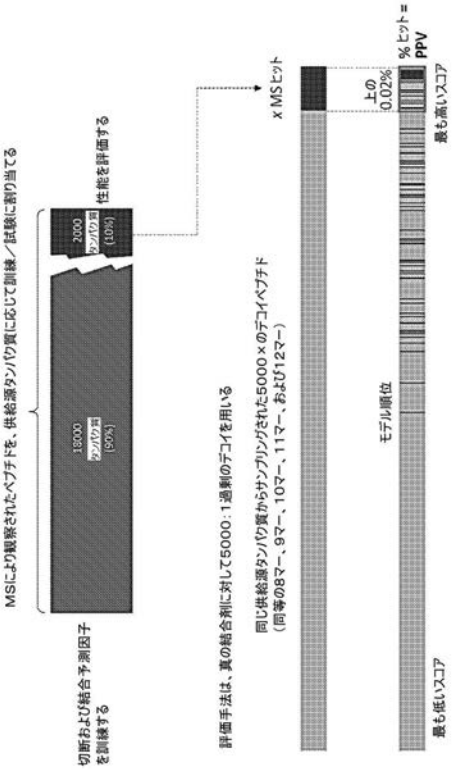

FIG. 21

【図２２】

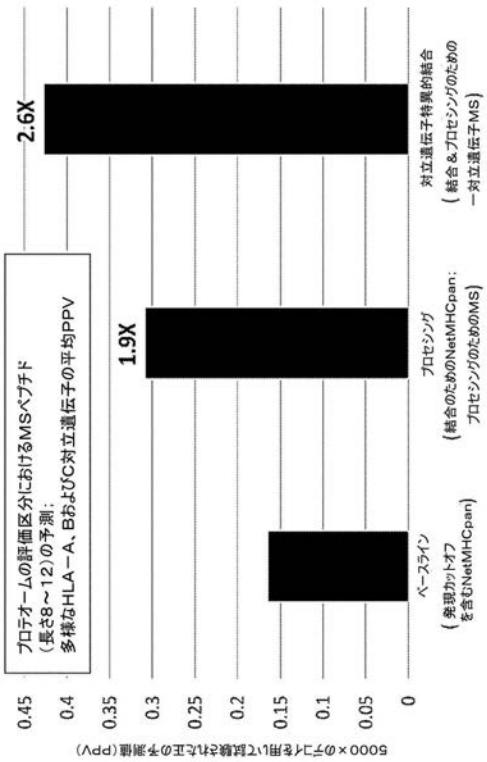

FIG. 22

【配列表】
2020511121000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/017849

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50 C12Q1/6886 G01N33/68 G01N33/574 C40B40/02
ADD. A61K39/00 C40B50/02 C40B30/02 C40B30/04

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)
A61K G01N C12Q C40B

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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOMAS TROLLE ET AL: "The Length Distribution of Class I-Restricted T Cell Epitopes Is Determined by Both Peptide Supply and MHC Allele-Specific Binding Preference", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 196, no. 4, 15 February 2016 (2016-02-15), pages 1480-1487, XP055383890, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1501721	1-4, 14-32, 35-40, 47-54, 58-63
Y	p.1481 col.1 par.2-4, p.1481 col.2 par.5-p.1482 col.1 par.4	5-9, 41-46, 55-57, 64-76
	----- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family 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 application or patent 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 April 2018	17/05/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bonello, Steve

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/017849

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ORIANA E. HAWKINS ET AL: "Identification of Breast Cancer Peptide Epitopes Presented by HLA-A*0201", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 7, no. 4, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 1445-1457, XP055116965, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/pr700761w	1-4, 10-12, 14-32, 35-40, 47-49, 58-62
Y	p.1446 col.1 par.2 p.1446 col.1 par.5- p.1447 col.2 par.2	5-9, 41-46, 64-76

X	W. JIANG ET AL: "High-throughput engineering and analysis of peptide binding to class II MHC", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 30, 9 July 2010 (2010-07-09) , pages 13258-13263, XP055470622, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1006344107	1-4, 10-22, 26,27, 30-34, 36-40, 47,48, 58,59
Y	p.13258 col.2 par.2 - p.13259 col.1 par.1, col.2 par.1-3, Fig.1, p.13262 col.1 par.2, 3	5-9, 41-46, 64-76

Y	MICHAL BASSANI-STERNBERG ET AL: "Unsupervised HLA Peptidome Deconvolution Improves Ligand Prediction Accuracy and Predicts Cooperative Effects in Peptide-HLA Interactions", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 197, no. 6, 10 August 2016 (2016-08-10), pages 2492-2499, XP055471186, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1600808 p.2492 col.2 par.3 p.2493 col.1 par.2-col.2 par.5 p.2497 col.2 par.2-p.2498 col.2 par.2	55-57

Y	WO 2012/156969 A1 (HADASIT MED RES SERVICE [IL]; PERETZ TAMAR [IL]; LOTEM MICHAL [IL]; MA) 22 November 2012 (2012-11-22) p.3 l.19-25, p.5 l.1-18, p.6 l.17-23	5-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/017849

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012156969 A1	22-11-2012	AU 2012257377 A1	28-11-2013
		US 2014141045 A1	22-05-2014
		US 2016175416 A1	23-06-2016
		WO 2012156969 A1	22-11-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		４Ｃ０８５
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	４Ｈ０４５
Ｇ０１Ｎ	*33/50*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/50	Ｐ	
Ｇ０１Ｎ	*30/72*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	30/72	Ｃ	
Ｇ０１Ｎ	*27/62*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	27/62	Ｖ	
Ｇ１６Ｂ	*30/00*	*(2019.01)*	Ｇ１６Ｂ	30/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		
Ｃ４０Ｂ	*40/10*	*(2006.01)*	Ｃ４０Ｂ	40/10		
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ０７Ｋ	*14/725*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/725		
Ｃ０７Ｋ	*14/74*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/74		
Ｃ０７Ｋ	*16/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/00		

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策
(72)発明者　アベリン,　ジェニファー　グレイス
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１２４,　ボストン,　ドラカット　ストリート　６０,　ナンバー４
(72)発明者　オスランド,　ロブ　カール
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４４６,　ブルックライン,　セント　ポール　ストリート　３７　ナンバー６
(72)発明者　ハコーエン,　ニア
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４４６,　ブルックライン,　メイソン　テラス　１１７
(72)発明者　バーセルミ,　ドミニク
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４７８,　ベルモント,　ベイカー　ストリート　１９
(72)発明者　ルーニー,　マイケル
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１２４,　ボストン,　マザー　ストリート　３３

Ｆターム(参考)　2G041 CA01 EA04 FA11 FA12 GA09 HA01 JA03 LA07
2G045 AA25 DA14
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35
4B065 AA93X AA93Y AA94X AA94Y AB01 AC14 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA17 NA14 ZB071 ZB072
4C085 AA02 BB11
4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	基于HLA的方法和成分及其用途		
公开(公告)号	JP2020511121A	公开(公告)日	2020-04-16
申请号	JP2019543304	申请日	2018-02-12
[标]发明人	ルーニーマイケル		
发明人	アベリン, ジェニファー グレイス オスランド, ロブ カール ハコーエン, ニア バーセルミ, ドミニク ルーニー, マイケル		
IPC分类号	C12N15/62 C12Q1/02 C12Q1/68 A61K45/00 A61K39/00 A61P37/02 G01N33/53 G01N33/50 G01N30/72 G01N27/62 G16B30/00 C12N15/12 C40B40/10 C12N5/10 C07K19/00 C07K14/725 C07K14/74 C07K16/00		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/39 A61K2039/5154 C40B40/10 C40B30/04 C40B40/02 G01N33/6878 G16B20/20 G16B20/30 G16B40/00 A61K35/12 A61K39/0011 G16B5/00 G16B30/00 G16B35/10 G16B40/10		
FI分类号	C12N15/62.Z C12Q1/02.ZNA C12Q1/68 A61K45/00 A61K39/00.H A61P37/02 G01N33/53.D G01N33/50.P G01N30/72.C G01N27/62.V G16B30/00 C12N15/12 C40B40/10 C12N5/10 C07K19/00 C07K14/725 C07K14/74 C07K16/00		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/EA04 2G041/FA11 2G041/FA12 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/JA03 2G041/LA07 2G045/AA25 2G045/DA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C085/AA02 4C085/BB11 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/457978 2017-02-12 US 62/461162 2017-02-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了从细胞分离HLA肽的组合物和方法。 本公开提供了用于谱分析HLA-肽组的通用平台和方法，使得能够从表达任何可能的I或II类构建体的细胞系中鉴定内源性呈递的HLA-肽。

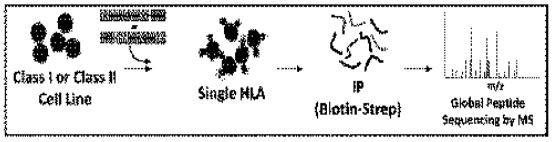

FIG. 1A

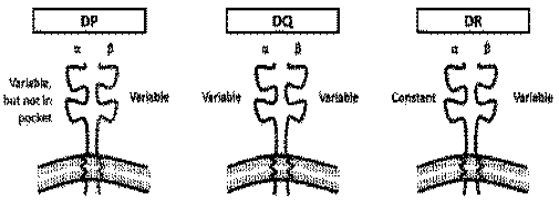

FIG. 1B