



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112017008212-8 B1

(22) Data do Depósito: 15/12/2015

(45) Data de Concessão: 28/11/2023

(54) Título: MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE PELO MENOS UM PEPTÍDEO LIGANTE DE MHC EM UMA CÉLULA

(51) Int.Cl.: G01N 33/68.

(30) Prioridade Unionista: 30/12/2014 GB 1423361.3; 30/12/2014 US 62/097,994.

(73) Titular(es): IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH.

(72) Inventor(es): TONI WEINSCHENK; JULIA LEIBOLD.

(86) Pedido PCT: PCT EP2015079873 de 15/12/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/107740 de 07/07/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/04/2017

(57) Resumo: MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE PEPTÍDEOS DE CÂNCER PROCESSADOS NATURALMENTE E RESTRITOS POR HLA. A presente invenção refere-se a um método de quantificação absoluta de peptídeos de câncer processados naturalmente e restritos por HLA, isto é, a determinação do número de cópias de peptídeos apresentados em cada célula. A presente invenção pode ser usada tanto para desenvolver tratamentos à base de anticorpos ou vacinas peptídicas como para monitoramento imunológico definido molecularmente, sendo também útil em processos de identificação de novos antígenos peptídicos para estratégias imunoterápicas, tais como vacinas para tal finalidade, terapias à base de anticorpos ou técnicas baseadas em transferência de células T contra o câncer, doenças infecciosas e/ou autoimunes.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE PELO MENOS UM
PEPTÍDEO LIGANTE DE MHC EM UMA CÉLULA"**.

[001] A presente invenção refere-se a um método de quantificação absoluta de peptídeos de câncer processados naturalmente e restritos por HLA, isto é, a determinação do número de cópias de peptídeos apresentados em cada célula. A presente invenção pode ser usada tanto para desenvolver tratamentos à base de anticorpos ou vacinas peptídicas como para monitoramento imunológico definido molecularmente, sendo também útil em processos de identificação de novos antígenos peptídicos para estratégias imunoterápicas, tais como vacinas para tal finalidade, terapias à base de anticorpos ou técnicas baseadas em transferência de células T contra o câncer, doenças infecciosas e/ou autoimunes.

Campo da invenção

[002] O desenvolvimento de imunoterapia anticâncer ou contra doenças autoimunes ou infecciosas visando a induzir a via de linfócitos T do sistema imune a combater o câncer poderia ser melhorado significativamente por um conhecimento profundo dos níveis de apresentação de peptídeos ligados a antígenos leucocitários humanos (HLA) em tecidos patológicos primários. Essa informação é relevante para tratamentos à base de anticorpos, e em especial para vacinas peptídicas, e também para qualquer outro tipo de vacina de célula T baseada em entidades moleculares como proteínas, DNA ou RNA. Antes, dados quantitativos com essas características não estavam disponíveis para medir o número absoluto de cópias por célula em tecidos obtidos de pacientes.

[003] Um método de identificação de peptídeos como o descrito anteriormente, que evita o problema de "imunologia reversa", foi revelado em EP 1508047B1. Conforme descrito anteriormente, esse

método não pode ser usado para quantificar os referidos peptídeos. Outro método, que emprega uma estratégia de marcação, foi revelado em WO 2005/076009 e permite algum grau de quantificação, mas não em uma escala absoluta. Outros marcadores foram revelados em, por exemplo, WO 03/025576 ou por Martin et al. em *Proteomics* 2003, 3, 2208-2220.

[004] Outro método foi revelado por Fortier et al. (The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome, *JEM*, Vol. 205, No. 3, March 17, 2008 595-610). Esse método apresenta as desvantagens de necessitar de separação dos peptídeos ligados ao MHC dos peptídeos não ligados ao MHC por eluição em ácido. Isso é realizado em linhagens celulares com b2m nocauteado. Portanto, o método não pode ser empregado em materiais derivados de tumores primários (de pacientes). Nesse método, timócitos murinos primários foram comparados à linhagem celular murina EL4. As quantidades iniciais foram ajustadas medindo-se as moléculas de MHC da classe I. Essa etapa constitui, por si só, uma importante restrição ao método revelado por Fortier et al. Também não foi realizada normalização, que seria necessária para compensar as diferenças de tamanho e origem dos tecidos. Em vez disso, foram utilizados materiais iniciais equilibrados, que tornaram desnecessária a normalização, embora ela seja imprescindível para materiais primários (obtidos de pacientes).

[005] WO 2011/128448 revela um método de identificação quantitativa de peptídeos antigênicos ligados a HLA em amostras de tecido primárias em grande escala e sem marcação. O método compreende as seguintes etapas: fornecimento de pelo menos uma amostra de tecido patológico primário e pelo menos uma amostra de tecido saudável primário (preferivelmente correspondente ao tecido patológico, isolamento de peptídeos ligantes de MHC das referidas amostras, realização de análise por cromatografia líquida de alto

desempenho HPLC ("high performance liquid chromatography") e espectrometria de massa MS ("mass spectrometry") dos referidos peptídeos ligantes de MHC, extração da intensidade do sinal (área) do íon precursor de cada sinal (conforme determinado pelas análises), identificação das sequências dos referidos peptídeos ligantes de MHC e etapas de controle de qualidade dos dados para quantificação relativa dos referidos peptídeos ligantes de MHC , tudo sem necessidade de marcação.

[006] Hassan et al. (Hassan C, et al, Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes, J Prot (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.009>) revelaram uma abordagem na qual monômeros de peptídeo e MHC marcados por isótopos (hpMHC) são preparados e acrescentados diretamente após a lise celular, isto é, antes do processamento normal da amostra. Essa abordagem permite contabilizar todas as perdas durante o processamento da amostra e, com isso, determinar com precisão a presença de ligantes específicos apresentados por MHC classe I. O estudo salienta que a etapa de imunopurificação causa perdas bastante acentuadas durante o pré-tratamento da amostra e oferece uma solução para compensá-las. A estratégia apresentada pode ser empregada para medir de maneira confiável o número de cópias de um epítipo; portanto, diz-se que ela permite melhorar projetos de vacinas e estratégias de imunoterapia.

[007] A estimulação de uma resposta imune depende da presença de antígenos reconhecidos como estranhos pelo sistema imune do hospedeiro. A descoberta da existência de antígenos associados a tumores e outras doenças levantou a possibilidade de induzir o sistema imune do hospedeiro a interferir no crescimento tumoral. Vários mecanismos para acionar os compartimentos humoral e celular do sistema imune vêm sendo explorados para imunoterapia

do câncer.

[008] Alguns elementos específicos da resposta imune celular podem reconhecer e destruir células tumorais de maneira específica. O isolamento de linfócitos T citotóxicos (LTC) de populações de células infiltrantes de tumores ou do sangue periférico sugere que tais células podem exercer efeitos significativos nas defesas imunes naturais contra o câncer, com destaque para os linfócitos T positivos para CD8 (T-CD8⁺), que reconhecem os peptídeos ligados a moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Esses peptídeos normalmente possuem 8 a 12 resíduos de aminoácidos e são derivados de proteínas ou de produtos ribossômicos defeituosos (DRIPS) localizados no citosol, que desempenham um importante papel nessa resposta. As moléculas do MHC humano também são designadas antígenos leucocitários humanos (HLA, "human leucocyte antigen").

[009] Existem duas classes de moléculas de MHC: moléculas classe I do MHC, que são encontradas na maioria das células nucleadas. As moléculas de MHC consistem em uma cadeia pesada alfa e em beta-2 microglobulina (receptores de MHC classe I) ou em uma cadeia alfa e outra beta (receptores de MHC classe II). Sua conformação tridimensional produz um sulco de ligação, que é empregado para interação não covalente com peptídeos. O MHC classe I apresenta peptídeos derivados da clivagem proteolítica de proteínas predominantemente endógenas, DRIPS e peptídeos maiores. As moléculas classe II do MHC são encontradas predominantemente em células apresentadores de antígenos (APC, "antigen presenting cells") profissionais e apresentam sobretudo peptídeos de proteínas exógenas ou transmembrana que são captadas pelas APC durante a endocitose e depois processadas. Os complexos de peptídeos com moléculas de classe I do MHC são

reconhecidos por linfócitos T citotóxicos positivos para CD8 que apresentam o TCR (receptor de célula T) apropriado; já os complexos de peptídeos com moléculas de MHC classe II são reconhecidos por linfócitos T auxiliares positivos para CD4 que apresentam o TCR apropriado. É bem sabido que, em razão dessa configuração, o TCR, o peptídeo e o MHC estão presentes em proporções estequiométricas de 1:1:1.

[0010] Para um peptídeo desencadear (provocar) uma resposta imune celular, ele precisa ligar-se a uma molécula de MHC. O processo depende do alelo da molécula de MHC e de polimorfismos específicos da sequência de aminoácidos do peptídeo. Os peptídeos ligantes de MHC classe I geralmente possuem 8 a 12 resíduos de aminoácidos de comprimento e geralmente contêm dois resíduos conservados ("âncoras") em sua sequência que interage com o sulco de ligação correspondente da molécula de MHC. Dessa forma, cada alelo de MHC possui um "motivo de ligação" que controla a capacidade dos peptídeos de se ligarem especificamente ao sulco de ligação.

[0011] Nas reações imunes dependentes do MHC classe I, os peptídeos precisam ser capazes de se ligar a certas moléculas de MHC classe I expressas em células tumorais e de serem reconhecidos por células T que apresentam receptores de célula T (TCR, "T-cell receptors") específicos.

[0012] Os antígenos reconhecidos por linfócitos T citotóxicos específicos para tumores, ou seja, seus epítomos podem ser moléculas derivadas de todas as classes de proteínas, tais como enzimas, receptores, fatores de transcrição, etc., que são expressas e, em comparação com células inalteradas da mesma origem, reguladas positivamente em células do respectivo tumor.

[0013] A classificação atual de antígenos associados a tumores ou

a outras doenças compreende os seguintes grupos principais:

[0014] Antígenos de câncer testicular: Os primeiros AATs [antígenos associados a tumores; os antígenos associados a doenças possuam a abreviatura AAD] a serem identificados e que são reconhecidos por linfócitos T pertencem a essa classe, que foi denominada inicialmente antígenos de câncer de testículo (CT) devido à expressão de seus membros em tumores humanos histologicamente diferentes e, em tecidos normais, apenas em espermatozoides e espermatogônias nos testículos e, ocasionalmente, na placenta. Como as células testiculares não expressam moléculas de HLA classe I e II, esses antígenos não podem ser reconhecidos pelos linfócitos T de tecidos normais e, portanto, podem ser consideradas imunologicamente específicas para o tumor. Alguns exemplos bem conhecidos de antígenos CT são os membros da família MAGE ou NY-ESO-1.

[0015] Antígenos de diferenciação: Estes AATs estão presentes tanto em tumores como em tecidos normais dos quais o tumor se originou, sendo encontrados sobretudo em melanomas e melanócitos normais. Embora muitas dessas proteínas relacionadas a linhagens melanocitárias participem da biossíntese da melanina e, portanto, não sejam específicas para tumores, elas são amplamente utilizadas para imunoterapia do câncer. Alguns exemplos são, entre outros, tirosinase e Melan-A/MART-1 em melanoma e PSA em câncer de próstata.

[0016] AATs expressos mais acentuadamente: Os genes que codificam AATs amplamente expressos foram detectados tanto em tumores de diversos tipos histológicos como em diversos tecidos normais, geralmente com níveis de expressão mais baixos. É possível que muitos dos epítomos processados e talvez apresentados por tecidos normais não atinjam concentrações suficientes para serem reconhecidos por linfócitos T, mas sua expressão mais acentuada em

células tumorais pode quebrar a tolerância estabelecida anteriormente e induzir uma resposta anticâncer. Alguns exemplos conhecidos dessa classe de AATs são o Her-2/neu, survivina, telomerase ou WT1.

[0017] Antígenos específicos para tumores: Estes AATs específicos se originam de mutações em genes normais (por exemplo, β -catenina, CDK4, etc.). Algumas dessas alterações moleculares estão associadas à transformação e/ou progressão neoplásica. Os antígenos específicos para tumores são geralmente capazes de induzir fortes respostas imunes sem criar risco de reações imunes contra tecidos normais. Por outro lado, a maioria desses AATs são relevantes apenas para o tumor no qual foram encontrados e geralmente não estão presentes em muitos outros tumores.

[0018] AATs originários de modificações traducionais anormais: Estes AATs podem se originar de proteínas que não são nem específicas nem expressas mais acentuadamente em tumores, mas que se tornam associadas a tumores porque passam por processos pós-traducionais que são mais ativos em tumores. Alguns exemplos dessa classe surgem de padrões de glicosilação anormais, que produzem novos epítomos em tumores como no MUC1, ou eventos como "splicing" de proteínas durante a degradação, que podem ou não ser específicos para um tumor.

[0019] Proteínas oncovirais : Esses AATs são proteínas virais que podem desempenhar um importante papel no processo oncogênico e, por serem de origem exógena não humana, podem produzir respostas por linfócitos T. São exemplos dessas proteínas as proteínas E6 e E7 do papilomavírus humano tipo 16, que são expressas no carcinoma de colo do útero.

[0020] Para uma proteína ser reconhecida pelos linfócitos T citotóxicos como antígeno específico para ou associado a um tumor ou outra doença e ser usada em um tratamento, alguns pré-requisitos

precisam ser atendidos. O antígeno deve ser expresso sobretudo por células tumorais ou por células infectadas e pouco ou nada expresso em tecidos normais saudáveis, por exemplo, por um fator de 5 a 10 vezes ou mais.

[0021] Em doenças infecciosas, as possibilidades são duas: as células infectadas expressam um antígeno que não é expresso por células saudáveis (e está diretamente associado à infecção), ou as células infectadas expressam níveis supranormais um antígeno expresso em quantidades diminutas por células saudáveis, ou seja, um antígeno encontrado normalmente no peptidoma de uma célula saudável é expresso em níveis supranormais.

[0022] Outrossim, é desejável que o respectivo antígeno não apenas esteja presente em um determinado tipo de tumor, infecção ou cepa, mas também apresente concentrações elevadas (isto é, número de cópias do respectivo peptídeo por célula). Os antígenos específicos para ou associados a tumores ou outras doenças são frequentemente derivados de proteínas que participam diretamente da transformação de uma célula normal em uma célula tumoral ou infectada devido a uma função; por exemplo, controle do ciclo celular ou supressão de apoptose.

[0023] No caso do câncer, outros alvos distais das proteínas que causam diretamente as transformações podem ser regulados positivamente e, portanto, associarem-se indiretamente ao tumor. Tais antígenos associados indiretamente a tumores também podem ser alvos de abordagens vacinais (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). Em ambos esses casos, os epítomos precisam estar presentes na sequência de aminoácidos do antígeno, pois tal peptídeo ("peptídeo imunogênico") derivado de um antígeno associado a tumor ou a outras doenças deve iniciar uma resposta de células T *in vivo* ou

in vitro.

[0024] Basicamente, qualquer peptídeo capaz de se ligar a uma molécula do MHC pode funcionar como epítopo de células T. Um pré-requisito para indução de resposta de células T *in vitro* ou *in vivo* é a presença de uma célula T com um TCR correspondente e ausência de tolerância imunológica para o epítopo em questão.

[0025] Portanto, os AATs e AADs são um ponto de partida para o desenvolvimento de vacinas antitumorais. Os métodos utilizados para identificar e caracterizar os AATs baseiam-se na utilização de LTCs, que podem ser isolados de pacientes ou de indivíduos saudáveis, ou baseados na geração de perfis de transcrição diferentes ou de padrões de expressão de peptídeos que sejam diferentes em tumores e em tecidos normais.

[0026] Entretanto, a identificação de genes expressos acentuada ou seletivamente em tecidos tumorais ou em linhagens tumorais humanas não proporciona informações precisas sobre a utilização dos antígenos transcritos a partir desses genes em imunoterapia. Isso ocorre porque apenas uma subpopulação individual de epítopos desses antígenos é apropriada para tal aplicação, pois é preciso que haja um linfócito T com um TCR correspondente e pouca ou nenhuma tolerância imunológica a esse epítopo em particular. Portanto, é importante selecionar apenas peptídeos de proteínas expressas demasiada ou seletivamente e apresentadas em associação com moléculas do MHC contra as quais se pode encontrar uma célula T funcional. Os linfócitos T auxiliares são definidos como linfócitos T que, quando estimulados por um determinado antígeno, podem se expandir de forma clonal e são capazes de executar funções efetoras ("linfócitos T efetores").

[0027] As células T auxiliares exercem uma importante atividade de orquestração da função efetora de LTC na imunidade antitumoral.

Os epítomos de linfócitos T auxiliares que desencadeiam respostas de linfócitos T auxiliares do tipo T_{H1} suportam as funções efectoras de células T "killer" positivas para CD8, incluindo atividade citotóxica contra células tumorais cuja superfície apresente peptídeos associados a tumor em complexos com MHC. Desse modo, os epítomos peptídicos de células T auxiliares associadas a tumores podem, isoladamente ou em associação com outros peptídeos associados a tumores, atuar como ingredientes farmacêuticos ativos de composições vacinais que estimulam respostas imunes antitumorais.

[0028] Saber o número exato de ligantes de HLA classe I ou II apresentados é importante para a imunologia, tanto básica como clínica. Atualmente, o melhor método para medir o número de cópias é a espectrometria de massa com monitoramento de reação única (SRM, "single reaction monitoring") usando também uma quantidade conhecida de um peptídeo marcado por isótopo. Entretanto, essas abordagens ainda não são precisas o bastante para serem empregadas de forma eficiente nas abordagens descritas anteriormente.

[0029] Diante do exposto anteriormente, é objeto da presente invenção o fornecimento de um método preciso, eficiente, fácil de manejar e que possa ser realizado com alto rendimento para medir o número absoluto de cópias de ligantes apresentados por HLA classe I ou II. Outros objetos e vantagens da presente invenção ficarão evidentes para os versados na técnica após o estudo da descrição apresentada a seguir.

[0030] Em um primeiro aspecto da presente invenção, o objeto da presente invenção é solucionado por um método para quantificação absoluta de pelo menos um peptídeo ligante de MHC em uma célula, sendo que o referido método compreende:

a) preparar células que apresentam o referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC a partir de uma amostra biológica compreendendo células;

b) determinar a contagem celular do referido preparado na etapa a);

c) adicionar uma quantidade conhecida do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC e/ou um complexo peptídeo ligante-MHC a ser quantificado ao referido preparado na etapa a) ("repique I");

d) isolar pelo menos um peptídeo ligante com MHC do referido preparado na etapa c) a fim de obter um eluato de peptídeos;

e) adicionar uma quantidade conhecida de pelo menos um peptídeo ligante de MHC a ser quantificado ao referido eluato de peptídeos ("repicagem II");

f) realizar análise por espectrometria de massa do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC para gerar pelo menos um dos seguintes:

aa) um sinal da eficiência do isolamento na etapa d);

bb) um sinal da quantidade conhecida do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC conforme adicionado na etapa e);
e

cc) um sinal do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC das referidas células preparadas na etapa a);e;

g) quantificar o referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC com base em uma comparação de sinais conforme obtidos na etapa f) com aa) a contagem celular conforme obtida;

bb) a quantidade conhecida do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC e/ou complexo peptídeo ligante-MHC a ser quantificado conforme adicionado na etapa c); e

cc) a quantidade conhecida do referido pelo menos um

peptídeo ligante de MHC a ser quantificado conforme adicionado na etapa e);

na qual é realizada, pelo menos em parte, uma quantificação absoluta de pelo menos um peptídeo ligante de MHC em uma célula.

[0031] Em um método de acordo com a presente invenção, no qual várias amostras são analisadas paralelamente, pode-se omitir a etapa c) descrita anteriormente uma vez estabelecida a eficiência do isolamento, pois a eficiência de uma amostra pode ser empregada para estimar a eficiência de isolamento de um segundo peptídeo ligante de MHC e/ou complexo de peptídeo ligante com MHC (isto é, usado como valor de referência cruzada).

[0032] Prefere-se um método que emprega também o sinal obtido a partir da calibração interna (repicagem II) em e) como referência constante e preservada (controle) para o sinal obtido a partir dos um ou mais complexos de peptídeo com MHC isolados calculando-se uma proporção entre esses dois sinais. Essa proporção é comparada com a curva de calibração estabelecida, que também inclui o calibrador interno na mesma quantidade, preferivelmente usando uma alíquota idêntica do mesmo calibrador interno. Em seguida, a curva de calibração descreve a relação entre essas proporções e a quantidade de peptídeo. Vide também a Figura 3 e a respectiva legenda.

[0033] Surpreendentemente, os inventores constataram que, no âmbito da presente invenção, a combinação das etapas de análise enumeradas anteriormente permitiu, pela primeira vez, a quantificação absoluta *direta* de níveis de peptídeos de MHC, preferivelmente restritos por HLA, em câncer ou em outros tecidos infectados em comparação com vários tecidos e órgãos não cancerosos ou não infectados.

[0034] No âmbito da presente invenção, "repicagem" significa a

adição de uma quantidade ou concentração conhecida de pelo menos um peptídeo ligante de MHC não ligado ("livre") a ser quantificado em uma amostra tal como, por exemplo, uma preparação, (aqui designada como "repicagem I") ou eluato de peptídeos (aqui designado "repicagem II"). As quantidades e concentrações dos peptídeos a serem adicionados são fáceis de ajustar e dependem, ao menos parcialmente, da amostra a ser repicada e ao método usado para análise.

[0035] Prefere-se um método de acordo com a presente invenção no qual os referidos pelo menos um peptídeos ligantes de MHC são selecionados entre um peptídeo associado a tumor (AAT) ou peptídeo associado à doença (AAD).

[0036] Prefere-se também um método de acordo com a presente invenção no qual a referida amostra biológica celular é selecionada entre uma amostra de tecido, de sangue, de tumor ou de tecido infectado. No âmbito da presente invenção, amostras derivadas diretamente de indivíduos (por exemplo, pacientes) são denominadas amostras "primárias", tais como tecidos primários ou amostras tumorais, em contraste com amostras de linhagens celulares como, por exemplo, linhagens estabelecidas de células tumorais. As amostras podem ser frescas ou conservadas (por exemplo, congeladas ou preparadas), conquanto sejam apropriadas para o método de acordo com a invenção. Prefere-se uma amostra biológica que não inclua linhagens celulares permanentes.

[0037] Como exemplo preferido, misturas de peptídeos de HLA originários de amostras de tecido primárias criocongeladas podem ser obtidas por imunoprecipitação de tecidos sólidos usando-se, por exemplo, anticorpos w6/32 específicos para HLA-A, B ou C ou anticorpos BB7.2 específicos para HLA-A*02 acoplados com sefarose ativada por CNBr, seguida de tratamento com ácido e ultrafiltração.

Outros alelos de HLA e outros anticorpos específicos conhecidos na técnica também podem ser empregados, tais como, por exemplo, GAP-A3 para A*03 ou B1.23.2 para alelos B. Existem métodos correspondentes, bem conhecidos na técnica, para obter peptídeos de MHC classe I de outros mamíferos.

[0038] O método de acordo com a invenção também pode ser empregado em contextos envolvendo doenças infecciosas (por exemplo, infecções bacterianas ou virais), tais como dengue, ebola, vírus Marburg, tuberculose (TB), meningite ou sífilis, sendo que, preferivelmente, o método é empregado contra cepas resistentes a antibióticos de microrganismos infecciosos; doenças autoimunes como artrite; infecções parasitárias como a malária; e outras doenças como esclerose múltipla e doença de Parkinson, conquanto o grupamento alvo seja um peptídeo ligado a MHC de classe I.

[0039] São exemplos de doenças autoimunes (incluindo doenças que não são oficialmente consideradas autoimunes) a doença pulmonar obstrutiva crônica, espondilite anquilosante, doença de Crohn (um dos dois tipos de doença inflamatória intestinal (DII) idiopática, dermatomiosite, diabetes melito tipo 1, endometriose, síndrome de Goodpasture, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barre, doença de Hashimoto, hidradenite supurativa, doença de Kawasaki, nefropatia por IgA, purpura trombocitopênica idiopática, cistite intersticial, lúpus eritematoso, doença mista do tecido conjuntivo, morfeia, miastenia grave, narcolepsia, neuromiotonia, pênfigo vulgar, anemia perniciosa, psoríase, artrite psoriásica, polimiosite, cirrose biliar primária, policondrite recorrente, artrite reumatoide, esquizofrenia, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome do corpo rígido, arterite temporal (arterite de células gigantes), colite ulcerativa — um dos dois tipos de doença inflamatória intestinal (DII) — vasculite, vitiligo e granulomatose de Wegener.

[0040] A presente invenção não se restringe a doenças humanas, podendo ser empregada também em mamíferos como vacas, porcos, cavalos, gatos, cães, roedores (como rato e camundongo), cabras e outros animais domésticos.

[0041] Em ainda outra modalidade preferida do método de acordo com a presente invenção, a preparação das células compreende, ao menos parcialmente, digestão enzimática de tecidos e/ou lise celular.

[0042] Prefere-se um método de acordo com a presente invenção no qual a referida contagem celular é determinada por um método selecionado entre contagem de núcleos celulares, determinação fotométrica de DNA, determinação fluorimétrica de DNA (como, por exemplo, usando a tecnologia Qubit®) e PCR quantitativa.

[0043] Prefere-se também um método de acordo com a presente invenção que compreende também a determinação de pelo menos um tipo de molécula de HLA na preparação referida na etapa a). A quantidade pode ser determinada empregando-se métodos comumente usados na técnica, tais como métodos que empregam anticorpos específicos, por exemplo, ELISA em gel, separação de células e/ou cromatografia.

[0044] Prefere-se também um método de acordo com a presente invenção no qual o pelo menos um complexo de peptídeo com MHC adicionado e/ou o pelo menos um peptídeo ligante com MHC conforme adicionado são marcados e, preferivelmente, marcados de forma diferente. Os marcadores são conhecidos dos versados na técnica e podem incluir marcadores isotópicos, marcadores radioativos ou não radioativos, enzimas e outros grupamentos, preferivelmente com massas diferentes. Preferivelmente, a marcação é específica para os peptídeos a serem quantificados. O mais preferido é um AAT/TUMAP com marcação dupla, por exemplo, em situações nas quais dois repicados com marcação distinta são necessários para o mesmo

experimento (ver exemplos a seguir).

[0045] Prefere-se um método de acordo com a presente invenção, no qual o isolamento compreende cromatografia, tal como cromatografia por afinidade. Portanto, os ligantes isolados de MHC ou HLA podem ser separados de acordo com sua hidrofobicidade por cromatografia de fase reversa (por exemplo, sistema nanoAcquity de UPLC, Waters), seguido de detecção por um espectrômetro de massa híbrido Orbitrap (ThermoElectron). Preferivelmente, as amostras são analisadas por aquisição de (por exemplo,) leituras repetidas de LC-MS. Em seguida, os dados de LC-MS são processados por análise dos dados de espectroscopia de massa (MS) em tandem (MS/MS).

[0046] Os espectros de MS em tandem são registrados de forma selecionada, com foco nos valores m/z dos peptídeos a serem quantificados, preferivelmente por um software que extrai as intensidades correspondentes a transições predefinidas de fragmentos ionizados pré-selecionados. Um desses softwares é o Skyline (MacLean B et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010 Apr 1; 26(7):966-8., <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>), um aplicativo de análise de dados de espectrometria de massa em experimentos de aquisição de dados independentes para monitoramento de reações paralelas. Esse software também pode ser usado em relação à coeluição do peptídeo marcado com isótopos para fins de especificidade, assim como para extrair as intensidades de transições específicas para processamento posterior.

[0047] Podem-se comparar grupos de peptídeos restritos por um mesmo alelo de HLA em amostras diferentes com base em um anticorpo comum específico para alelos usado para purificação, se disponível, ou, como alternativa, com base na atribuição de sequências a alelos de HLA comuns por meio de padrões de

sequências de aminoácidos de ancoragem.

[0048] Por motivos estatísticos, prefere-se um método de acordo com a presente invenção no qual pelo menos uma repetição de sequências de espectrometria de massa idênticas é realizada para cada um do pelo menos um peptídeo ligante de MHC.

[0049] Logo, ainda outro aspecto da presente invenção refere-se a um método de acordo com a presente invenção, que compreende também seleção para análise de ligantes de peptídeo e MHC representados excessivamente, expressos em demasia e/ou específicos para tumores.

[0050] Ainda outro aspecto da presente invenção refere-se a um método de acordo com a presente invenção, no qual o referido método pode ser ou é realizado no âmbito de um sistema de alto rendimento, que permite, preferivelmente, analisar 50 a 100 peptídeos ligantes em paralelo.

[0051] Em ainda outra modalidade preferida do método de acordo com a presente invenção, as etapas do referido método são realizadas na ordem indicada nas reivindicações em anexo ou conforme descrito anteriormente. Em ainda outro método preferido do método de acordo com a presente invenção, o referido método consiste nas etapas descritas aqui e anteriormente.

[0052] Em ainda outro aspecto preferido do método de acordo com a presente invenção, o referido método refere-se a tratamentos e diagnósticos personalizados. Para isso, as referidas amostras a serem analisadas são derivadas de um único indivíduo ou de um grupo de indivíduos que sofrem de um mesmo problema clínico, conforme aqui descrito. Além disso, um perfil personalizado de ligantes de MHC, preferivelmente um perfil personalizado e quantificado de ligantes de MHC específicos para uma doença, baseado nos referidos peptídeos ligantes de MHC conforme quantificados, pode ser gerado com base

no método de acordo com a presente invenção, conforme aqui descrito.

[0053] Mais preferivelmente de todos, o método de acordo com a presente invenção é realizado *in vitro*.

[0054] Em outro aspecto preferido do método de acordo com a presente invenção, o referido método compreende também a etapa de síntese, preferivelmente síntese química, dos referidos um ou mais peptídeos ligantes de MHC, conforme quantificados pelo referido método em um sintetizador ou manualmente. Portanto, outro aspecto da presente invenção refere-se a um método de preparação de um peptídeo imunorreagente, no qual o peptídeo é quantificado de acordo com o método revelado e o peptídeo é sintetizado quimicamente *in vitro* ou *in vivo*. Os peptídeos podem ser preparados por ligação química dos aminoácidos empregando-se os métodos padrão conhecidos na técnica.

[0055] Os peptídeos podem ser preparados *in vitro*, por exemplo, em sistemas acelulares ou *in vivo* usando células. Os peptídeos podem ser formulados conforme revelado, por exemplo, em EP2111867 por Lewandrowski et al.

[0056] Ainda outro aspecto refere-se a um método de acordo com a invenção, no qual é realizada uma etapa adicional de detecção de linfócitos T. Por meio desse método, pode-se detectar especificamente o quanto um paciente já possui linfócitos T dirigidos contra os peptídeos isolados e identificados. A realização dessa etapa permite aplicar, como vacina, apenas os peptídeos contra os quais o paciente já possui linfócitos T. Em seguida, o peptídeo pode ser usado para ativar esses linfócitos T de forma específica.

[0057] Outro aspecto refere-se ao método de acordo com a presente invenção, no qual a detecção de linfócitos T específicos preexistentes é realizada marcando-se os linfócitos com complexos

reconstituídos de moléculas apresentadoras de antígenos e peptídeos antigênicos.

[0058] Em ainda outra modalidade preferida do método de acordo com a presente invenção, o referido método exclui também o emprego de células, linhagens celulares ou animais nocauteados.

[0059] Outra etapa opcional preferida da presente invenção é um controle de qualidade automático baseado em moléculas repicadas nas amostras em quantidades predefinidas.

[0060] Com o método de acordo com a presente invenção, podem-se também identificar peptídeos específicos de pacientes, isto é, podem-se identificar com precisão os peptídeos a serem usados para vacinar um paciente a fim de induzir uma resposta imune específica.

[0061] Outro aspecto da invenção relaciona-se com uma composição farmacêutica da invenção que compreende quantidades predefinidas de um ou mais peptídeos de AAT e/ou de AAD quantificados pelo método de acordo com a presente invenção.

[0062] A composição pode ser aplicada, por exemplo, por via parenteral, por exemplo, subcutânea, intradérmica ou intramuscular, ou pode ser administrada por via oral, dependendo da formulação e da doença a ser abordada. Para esse fim, os peptídeos são dissolvidos ou suspensos em um veículo farmacêuticamente aceitável, preferivelmente um veículo aquoso, e a composição pode compreender aditivos como, por exemplo, soluções tampão, agentes ligantes, etc. Os peptídeos também podem ser administrados conjuntamente com substâncias imunoestimulantes, por exemplo, citoquinas.

[0063] De acordo com um aspecto da invenção, os peptídeos podem ser empregados para tratamento de doenças tumorais ou para preparar um fármaco para tratamento de doenças tumorais. As doenças tumorais a serem tratadas compreendem tanto tumores

sólidos, tais como câncer renal, de mama, pancreático, gástrico, testicular ou de pele, como cânceres hematológicos (por exemplo, leucemia mieloide aguda). Essa lista de tumores é apresentada apenas a título exemplificativo e sem nenhum intuito de limitar a área de aplicação da presente invenção.

[0064] Os peptídeos também podem ser empregados para avaliar a evolução de uma doença tumoral ao longo do tratamento.

[0065] Os peptídeos também podem ser empregados para monitorar um tratamento no caso de outras imunizações ou tratamentos. Portanto, o peptídeo pode ser usado tanto para tratamento como para diagnóstico.

[0066] Outro aspecto da presente invenção refere-se ao uso dos peptídeos conforme quantificados para gerar um anticorpo. De maneira geral, os anticorpos policlonais podem ser obtidos imunizando-se animais por meio de injeção dos peptídeos seguida de purificação da imunoglobulina. Os anticorpos monoclonais podem ser gerados de acordo com protocolos padronizados conhecidos na técnica.

[0067] A presente invenção é especialmente relevante para abordagens baseadas em anticorpos, pois o número de cópias do alvo na superfície celular de uma célula alvo determina e/ou reflete se o alvo pode ser atingido por anticorpos e, se puder, quais meios efetores podem ser utilizados, tais como fármacos conjugados, toxinas, anticorpos com dupla especificidade que recrutam células T ou outras células efetoras. Outros aspectos referem-se ao uso nesse contexto das chamadas moléculas formadoras de suporte ("scaffolding"), tais como aptâmeros (oligomoléculas de ácidos nucleicos ou peptídeos que se ligam a alvos) e/ou receptores solúveis de células T (TCRs). Assim como ocorre com os anticorpos, o número de cópias determina a afinidade necessária e as funções efetuadas pelas referidas

moléculas de suporte.

[0068] A estimulação de uma resposta imune depende da presença de antígenos reconhecidos como estranhos pelo sistema imune do hospedeiro. A descoberta da existência de antígenos associados a tumores levantou a possibilidade de usar o sistema imune do hospedeiro para intervir no crescimento tumoral. Vários mecanismos para acionar os compartimentos humoral e celular do sistema imune vêm sendo explorados para imunoterapia do câncer.

[0069] Alguns elementos específicos da resposta imune celular podem reconhecer e destruir células tumorais de maneira específica. O isolamento de linfócitos T citotóxicos (LTC) de populações de células infiltrantes de tumor ou do sangue periférico sugere que tais células podem desempenhar um importante papel nas defesas imunes naturais contra o câncer. Em particular, as células T CD8-positivas que reconhecem moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que normalmente possuem 8 a 12 resíduos derivados de proteínas ou proteínas produtos de defeitos ribossômicos (DRIPS, "defect ribosomal products") localizadas no citosol, desempenham um importante papel nessa resposta. As moléculas do MHC humano também são designadas antígenos leucocitários humanos (HLA, "human leucocyte antigen").

[0070] As moléculas de classe I do MHC, que podem ser encontradas na maioria das células nucleadas que apresentam peptídeos resultantes da clivagem proteolítica de proteínas principalmente endógenas, citosólicas ou nucleares, DRIPS e peptídeos maiores. Entretanto, os peptídeos derivados de compartimentos endossômicos ou de fontes exógenas também são frequentemente encontrados em moléculas de classe I do MHC. Na literatura, esse modo de apresentação por meio de moléculas de classe I, que é diferente do modo clássico, é denominado

apresentação cruzada.

[0071] Para que os linfócitos T citotóxicos reconheçam as proteínas como antígenos específicos para ou associados a tumores e possam ser usados em tratamentos, alguns requisitos precisam ser atendidos. O antígeno deve ser expresso sobretudo por células tumorais e relativamente pouco ou nada em tecidos normais saudáveis. Outrossim, é desejável que o respectivo antígeno, além de estar presente em apenas um determinado tipo de tumor, apresente concentrações elevadas (isto é, número de cópias do respectivo peptídeo por célula). Os antígenos específicos para ou associados a tumores são frequentemente derivados de proteínas que participam diretamente da transformação de uma célula normal em uma célula tumoral devido a uma função; por exemplo, controle do ciclo celular ou apoptose. Além disso, alvos distais da proteína causadora direta da transformação podem ser regulados positivamente e, portanto, associarem-se indiretamente ao tumor. Tais antígenos associados indiretamente a tumores também podem ser alvos de abordagens vacinais. Em ambos os casos, é essencial que os epítomos estejam presentes na sequência de aminoácidos do antígeno, pois tal peptídeo ("peptídeo imunogênico") derivado de um antígeno associado a tumor ou a uma doença pode levar a uma resposta de células T *in vivo* ou *in vitro*.

[0072] Basicamente, qualquer peptídeo capaz de se ligar a uma molécula do MHC pode funcionar como epítomo de células T. Um pré-requisito para indução de resposta de células T *in vitro* ou *in vivo* é a presença de uma célula T com um TCR correspondente e ausência de tolerância imunológica para o epítomo em questão. Portanto, os AATs são um ponto de partida para o desenvolvimento de vacinas contra tumores. Os métodos utilizados para identificar e caracterizar os AATs baseiam-se na utilização de LTC que podem ser isolados de pacientes

ou de indivíduos saudáveis ou baseados na geração de diferentes perfis de transcrição ou perfis diferentes de expressão de peptídeos em tumores e em tecidos normais (Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27). Entretanto, a identificação de genes expressos acentuada ou seletivamente em tecidos tumorais ou em linhagens tumorais humanas não proporciona informações precisas sobre a utilização dos antígenos transcritos a partir desses genes em imunoterapias. Isso ocorre porque apenas uma subpopulação individual de epítomos desses antígenos é apropriada para tal aplicação, pois é preciso que haja um linfócito T com um TCR correspondente e pouca ou nenhuma tolerância imunológica a esse epítipo em particular. Portanto, é importante selecionar apenas peptídeos de proteínas expressas demasiada ou seletivamente e apresentadas em associação com moléculas do MHC contra as quais se pode encontrar uma célula T funcional. Tais células T funcionais são definidas como células T que, quando estimuladas por um determinado antígeno, podem se expandir de forma clonal e são capazes de executar funções efetoras ("células T efetoras").

[0073] Considerando os graves efeitos colaterais e despesas associadas ao tratamento do câncer, existe uma premente necessidade de métodos prognósticos e diagnósticos melhores.

[0074] O termo "peptídeo" é aqui utilizado para designar uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. Preferivelmente, os peptídeos possuem 9 aminoácidos de comprimento, mas podem ter apenas 8 aminoácidos de comprimento ou até 10, 11, 12, 13 ou 14 aminoácidos de comprimento.

[0075] O termo "oligopeptídeo" é aqui utilizado para designar uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros,

tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. O comprimento do oligopeptídeo não é essencial para a invenção, conquanto o epítopo ou epítomos corretos sejam nele mantidos. Os oligopeptídeos tipicamente possuem menos de 30 resíduos de aminoácidos de comprimento e mais de cerca de 14 aminoácidos de comprimento.

[0076] O termo "polipeptídeo" designa uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. O comprimento do polipeptídeo não é essencial para a invenção, conquanto os epítomos corretos sejam nele mantidos. Ao contrário dos termos peptídeo e oligopeptídeo, o termo polipeptídeo designa apenas moléculas com mais de cerca de 30 resíduos de aminoácidos.

[0077] Um peptídeo, oligopeptídeo, proteína ou polinucleotídeo que codifica tal molécula é "imunogênico" (e, portanto, "imunogênico" no escopo da presente invenção) se for capaz de induzir uma resposta imune. No caso da presente invenção, a imunogenicidade é definida mais especificamente como a capacidade de induzir uma resposta de células T. Portanto, um "imunogênio" seria uma molécula capaz de induzir uma resposta imune e, no caso da presente invenção, uma molécula capaz de induzir uma resposta de células T.

[0078] Um "epítopo" de células T requer um peptídeo curto ligado a um receptor do MHC classe I formando um complexo ternário (cadeia alfa do MHC classe I, beta-2 microglobulina e peptídeo), que pode ser reconhecido por receptores de célula T que se ligam ao complexo MHC-peptídeo com afinidade apropriada. Os peptídeos que se ligam a moléculas de MHC classe I geralmente possuem 8 a 14 aminoácidos de comprimento, e mais tipicamente 9 aminoácidos de comprimento.

[0079] Na presente descrição, a invenção é descrita empregando o câncer como exemplo. Contudo, o método da invenção também pode ser aplicado a doenças infecciosas, doenças autoimunes e infecções parasitárias, conquanto haja uma resposta imune baseada no MHC classe I.

[0080] A invenção será descrita mais detalhadamente nos exemplos a seguir, mas sem limitar-se aos mesmos. Nas Figuras e nas Listas de Sequências a seguir:

[0081] A Figura 1 mostra um esquema geral da abordagem experimental de acordo com a presente invenção.

[0082] A Figura 2 mostra uma análise comparativa por MS de uma mistura de TUMAPs com 10 fmol por TUMAP da Tabela 1. Cada peptídeo produz um sinal de MS diferente, permitindo detectá-los individualmente. O peptídeo 5 não consta da Tabela 1, isto é, as sequências 1 a 4 da Tabela 1 correspondem aos números 1 a 4 da Figura 2 e as sequências 5 a 11 da Tabela 1 correspondem aos números 6 a 12 da Figura 2.

[0083] A Tabela 2 também não lista os peptídeos 19, 21 e 22 constantes da Figura 2, isto é, as sequências 13 a 18 da Figura 2 correspondem aos n.ºs. 12 a 17 da Tabela 2, a sequência 20 da Figura 2 corresponde ao n.º. 18 da Tabela 2 e as sequências 23 a 28 da Figura 2 correspondem aos n.ºs 19 a 24 da Tabela 2.

[0084] A Figura 3 mostra o princípio do método interno padrão. Uma curva de calibração é gerada titulando-se uma versão marcada por isótopo (mostrada em cinza-claro) do TUMAP. Para todas as aferições por MS, uma quantidade constante de outra versão marcada por isótopo do peptídeo padrão interno do TUMAP (mostrado em cinza-escuro) é repicada nas amostras para análise por MS. Uma curva de calibração é calculada por regressão logística a partir da relação entre sinais de MS. O limite inferior de quantificação (LIQ) é

definido por inspeção visual, considerando-se o desvio da linearidade. As "amostras de quantificação" (mostradas em verde) representam intensidades de sinal medidas em amostras tumorais selecionadas de acordo com os números absolutos de TUMAPs quantificados.

[0085] A Figura 4 mostra as curvas de calibração dos TUMAPs de HLA-A*02 selecionados para quantificação absoluta. Os resultados de MS para os TUMAPs observados em diferentes amostras tumorais usadas para análise de contagem absoluta de TUMAPs por célula ("amostras de quantificação") são mostrados em cada tabela.

[0086] A Figura 5 mostra outras curvas de calibração dos TUMAPs de HLA-A*02 selecionados para quantificação absoluta. Os resultados de MS para os TUMAPs observados em diferentes amostras tumorais usadas para análise de contagem absoluta de TUMAPs por célula ("amostras de quantificação") são mostrados em cada tabela.

[0087] A Figura 6 mostra as curvas de calibração dos TUMAPs de HLA-A*24 selecionados para quantificação absoluta. Os resultados de MS para os TUMAPs observados em diferentes amostras tumorais usadas para análise de contagem absoluta de TUMAPs por célula ("amostras de quantificação") são mostrados em cada tabela.

[0088] A Figura 7 mostra outras curvas de calibração dos TUMAPs de HLA-A*24 selecionados para quantificação absoluta. Os resultados de MS para os TUMAPs observados em diferentes amostras tumorais usadas para análise de contagem absoluta de TUMAPs por célula ("amostras de quantificação") são mostrados em cada tabela.

[0089] A Figura 8 mostra a variação estimada em ensaios repetidos de MS em todos os TUMAPs analisados. Cada ponto representa o coeficiente de variação (CV em %) em ensaios repetidos de MS de um TUMAP individual em uma determinada amostra de tecido patológico. A mediana dos CVs para todos os TUMAPs é considerada como variação média das repetições de sequências de

MS.

[0090] A Figura 9 mostra a eficiência do isolamento de complexos de peptídeo com MHC. A eficiência do isolamento de complexos peptídeo-MHC foi determinada em 8 amostras positivas para TUMAPs de A*02 (A) e em 6 amostras positivas para TUMAPs de A*24 (B). A eficiência do isolamento varia em média 24% para TUMAPs de A*02 e 32% para TUMAPs de A*24 (C).

[0091] A Figura 10 mostra métodos de análise do conteúdo de DNA. A. Comparação de três métodos diferentes de interpolação de uma contagem celular para uma determinada quantidade de DNA. A curva padrão foi preparada a partir de linhagens de células tumorais (cinza-escuro), de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e de doadores saudáveis (cinza). Também foi utilizado o peso teórico de um genoma humano diploide (cinza-claro). As réplicas biológicas, isto é, preparações independentes de lisados de tecidos de partes diferentes de um mesmo tumor, aparecem destacadas em cinza. B. Gráfico da curva padrão de CMSP, que foi usada para determinar a contagem celular total de amostras de tecido analisadas durante a quantificação absoluta de TUMAPs.

[0092] A Figura 11 mostra as contagens celulares determinadas em amostras de tecido sólidas congeladas. Análise de contagens celulares de amostras tumorais positivas para A*02 e A*24 (A) e a variação estimada das contagens celulares analisadas (B). As réplicas biológicas aparecem destacadas em cinza.

[0093] A Figura 12 mostra os resultados de cópias de peptídeos por célula para TUMAPs de HLA-A*02. Oito cânceres gástricos diferentes foram analisados, sendo 3 deles em duplicata. As duplicatas biológicas aparecem agrupadas e destacadas em cinza. O LIQ refere-se ao intervalo de quantificação em um experimento de MS e é extrapolado para uma amostra, e os LIQ específicos de TUMAPs, isto

é, o menor número de cópias quantificável em uma amostra específica de um TUMAP específico (mostrado em cinza).

[0094] A Figura 13 mostra outros resultados de cópias de peptídeos por célula para TUMAPs de HLA-A*02. Oito cânceres gástricos diferentes foram analisados, sendo 3 deles em duplicata. As duplicatas biológicas aparecem agrupadas e destacadas em cinza. O LIQ refere-se ao intervalo de quantificação em um experimento de MS e é extrapolado para uma amostra, e os LIQ específicos de TUMAPs, isto é, o menor número de cópias quantificável em uma amostra específica de um TUMAP específico (mostrado em cinza).

[0095] A Figura 14 mostra os resultados de cópias de peptídeos por célula para TUMAPs de HLA-A*24. Seis cânceres gástricos diferentes foram analisados, sendo 3 deles em duplicata. As duplicatas biológicas aparecem agrupadas e destacadas em cinza. O LIQ refere-se ao intervalo de quantificação em um experimento de MS e é extrapolado para uma amostra, e os LIQ específicos de TUMAPs, isto é, o menor número de cópias quantificável em uma amostra específica de um TUMAP específico (mostrado em cinza).

[0096] A Figura 15 mostra outros resultados de cópias de peptídeos por célula para TUMAPs de HLA-A*24. Seis cânceres gástricos diferentes foram analisados, sendo 3 deles em duplicata. As duplicatas biológicas aparecem agrupadas e destacadas em cinza. O LIQ refere-se ao intervalo de quantificação em um experimento de MS e é extrapolado para uma amostra, e os LIQ específicos de TUMAPs, isto é, o menor número de cópias quantificável em uma amostra específica de um TUMAP específico (mostrado em cinza).

[0097] A Figura 16 mostra o teste do efeito de um repique de amostras com 500 fmol de peptídeos livres no preparado de monômeros de MHC e peptídeo. Conforme indicado, os peptídeos livres na análise não influenciaram significativamente os peptídeos.

[0098] A Figura 17 mostra os resultados de ensaios de reprodutibilidade do isolamento de DNA usando Qubit HS (fluorescência) comparado com uma curva padrão. As amostras (derivadas de cânceres como o CPCNP) mostram homogeneidade suficiente. O DNA foi isolado de 3 alíquotas de 50 µl.

[0099] As SEQ N^{os}. 1 a 24 correspondem aos peptídeos das tabelas 1 e 2, que foram selecionados para quantificação absoluta de acordo com os exemplos.

Exemplos:

[00100] Os exemplos a seguir descrevem o método da invenção no âmbito de AATs e câncer. A invenção não se restringe aos exemplos, que constituem tão somente uma modalidade preferida da invenção. Para os fins da presente invenção, todas as referências aqui citadas ficam integralmente incorporadas por referência.

Tabela 1: TUMAPs de HLA-A*02 selecionados para quantificação absoluta

[00101] Onze peptídeos foram selecionados para quantificação absoluta

N ^o .	Código do peptídeo	Sequência
1	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
2	FAP-003	YVYQNNIYL
3	COL12A1-002	FLVDGSWSV
4	MXRA5-001	TLSSIKVEV
5	NCAPG-001	YLLSYIQSI
6	COL6A3-002	FLLDGSANV
7	WNT5A-001	AMSSKFFLV
8	F2R-001	TLDPRSFLL
9	HIF1A-001	ALDGFVMVL
10	MET-001	YVDPVITSI
11	CCNB1-002	ILIDWLVQV

Tabela 2: TUMAPs de HLA-A*24 selecionados para quantificação absoluta

[00102] Quatorze peptídeos foram selecionados para quantificação absoluta. Um dos peptídeos (PLK4-001) não apresentou propriedades adequadas para novos experimentos. Os 13 peptídeos restantes foram submetidos a experimentos de quantificação absoluta.

Nº.	Código do peptídeo	Sequência
12	ASPM-002	SYNPLWLRI
13	SLC6A6-001	VYPNWAIGL
14	MMP3-001	VFIFKGNQF
15	CDC2-001	LYQILQGIVF
16	PLK4-001	QYASRFVQL
17	ASPM-001	RYLWATVTI
18	ATAD2-002	KYLTVKDYL
19	KIF2C-001	IYNGKLFDLL
20	MET-006	SYIDVLPEF
21	AVL9-001	FYISPVNKL
22	PPAP2C-001	AYLVYTDRL
23	UHL5-001	NYLPFIMEL
24	UQCRB-001	YYNAAGFNKL

[00103] A quantificação de cópias de TUMAPs por célula de amostras de tumores sólidos requer que cada um

a) dos TUMAPs isolados seja quantificado

b) e análise das informações sobre a perda de TUMAPs durante o

c) isolamento e contagens celulares da amostra de tecido.

[00104] A Figura 1 apresenta uma visão geral da abordagem experimental de acordo com a presente invenção.

Quantificação de peptídeos por nano-LC-MS/MS

[00105] Para quantificar peptídeos com exatidão usando

espectrometria de massa, são necessários conhecimentos básicos e específicos para o peptídeo sobre a correlação entre a quantidade de peptídeo e o sinal de MS. A título exemplificativo, a mensuração por MS de uma mistura de peptídeos com 10 fmol por peptídeo revela que o sinal de MS apresenta variações grandes e específicas para peptídeos (Figura 2). Isso também implica que o intervalo no qual um peptídeo pode ser quantificado de forma confiável por MS depende de características específicas do peptídeo.

[00106] Além disso, a correlação linear entre a quantidade de um peptídeo específico e o sinal de MS pode ser esperada apenas dentro de um determinado intervalo. Portanto, os inventores decidiram determinar uma curva de calibração individual para cada peptídeo. O intervalo de cada curva de calibração foi selecionado para refletir não apenas o intervalo de quantificação de um peptídeo individual, mas também o intervalo de sinais de MS para cada peptídeo em amostras de tumor analisadas anteriormente. O objetivo foi fazer com que cada curva de calibração compreendesse um intervalo de sinal de MS específico para o peptídeo em pelo menos 80% das amostras de rotina.

[00107] A geração de curvas de calibração exatas requer um padrão sintético, que precisa ser quantificado por um método independente que possua as mesmas características que os TUMAPs naturais. Os inventores usaram TUMAPs marcados com dois isótopos, isto é, dois aminoácidos marcados por isótopos foram incluídos durante a síntese dos TUMAPs. As versões duplamente marcadas podem ser distinguidas dos TUMAPs naturais porque apresentam diferença de massa de 12 a 18 Daltons, dependendo de qual aminoácido foi marcado. Além de seus efeitos sobre a massa, a marcação isotópica não altera as propriedades do peptídeo em ensaios de MS, isto é, peptídeos com a mesma sequência marcados

com isótopos diferentes produzem sinais de intensidade idêntica em ensaios de MS (Anderson et al., 2012). Após a síntese, os TUMAPs duplamente marcados foram quantificados com precisão por análise em nitrogênio para que se pudesse correlacionar exatamente a quantidade de peptídeo com o sinal da MS.

[00108] As curvas de calibração foram preparadas em pelo menos três matrizes diferentes, isto é, eluatos de peptídeos de HLA obtidos de amostras naturais semelhantes às amostras usadas rotineiramente para MS. Todas as preparações foram ensaiadas em duplicata. Para compensar eventuais variações técnicas entre os lotes de MS, todas as aferições foram realizadas com um peptídeo interno padrão. A proporção entre os sinais espectrométricos do peptídeo titulado e do padrão interno foi exibida em um gráfico, e a curva de calibração foi calculada por regressão logística (Figura 3). O limite inferior de quantificação (LIQ) foi determinado visualmente considerando-se o desvio da linearidade. Se não houvesse desvio evidente da linearidade, tal como ocorreu para o peptídeo FAP-003 (Figura 4), o LIQ foi calculado a partir da relação média do peptídeo presente em menor quantidade. Nenhuma das curvas de calibração atingiu o limite superior de quantificação, isto é, desvio da linearidade em concentrações mais elevadas.

[00109] Nos experimentos reais de quantificação realizados, o padrão interno foi adicionado a cada amostra em quantidades idênticas à usada para gerar a curva de calibração. Em seguida, foi calculada a proporção entre o peptídeo natural e o peptídeo padrão interno. Esse "método de padronização interna" é comumente empregado na quantificação de proteínas por MS, por exemplo, para análise de biomarcadores em amostras biológicas (Sturm et al., 2012; Prasad and Unadkat, 2014; Sato et al., 2012). A Figura 4 e a Figura 5 mostram as curvas de calibração e os valores medidos de HLA-A*02

em amostras de tumores reais, enquanto a Figura 6 e a Figura 7 mostram esses resultados para todos os TUMAPs selecionados para quantificação absoluta.

[00110] A fim de estimar a variação das aferições quantitativas por espectroscopia de massa, calculou-se o coeficiente de variação (CV %) do conteúdo peptídico de cada amostra de MS. Os CVs por amostra de espectroscopia de massa foram exibidos em gráficos, e a variação global de aferições por espectrometria foi estimada como o CV mediano (Figura 8).

Eficiência do isolamento de peptídeo e MHC

[00111] Assim como em qualquer processo de purificação de proteínas, o isolamento de proteínas de amostras de tecidos está associado com perda parcial da proteína pesquisada. Para determinar se o isolamento de TUMAPs foi eficaz, foram gerados complexos peptídeo-MHC para todos os TUMAPs selecionados para quantificação absoluta. A fim de distinguir os complexos peptídeo-MHC repicados dos complexos naturais, foram usados TUMAPs marcados por um único isótopo, isto é, um aminoácido marcado por isótopo foi introduzido durante a síntese dos TUMAPs. Esses complexos foram repicados em lisados de tecidos preparados frescos, isto é, no momento mais precoce possível do procedimento de isolamento de TUMAPs, e depois capturados da mesma forma que os complexos de peptídeo com MHC naturais na purificação por afinidade realizada em seguida. Portanto, a aferição da recuperação de TUMAPs com marcação única permite tirar conclusões sobre a eficiência do isolamento de TUMAPs naturais específicos.

[00112] A eficiência do isolamento foi determinada em 13 amostras selecionadas para quantificação absoluta de TUMAP, sendo 7 positivas para HLA-A*02, 5 positivas para HLA-A*24 e 1 positiva dupla para HLA-A*02 e A*24. Oito amostras positivas para A*02 foram

analisadas para caracterizar a eficiência do isolamento de TUMAPs de A*02 e 6 amostras positivas para TUMAPs de A*24 (Figuras 9A e B). Os resultados sugerem que, para a maioria dos peptídeos, a eficiência do isolamento é semelhante em várias amostras de tecido. Por outro lado, a eficiência do isolamento varia de peptídeo para peptídeo. Isso sugere que a eficiência de isolamento, embora tenha sido determinada em poucas amostras de tecidos, pode ser extrapolada para qualquer outra preparação de tecidos. Entretanto, é necessário analisar cada TUMAP individualmente, pois a eficiência do isolamento de um peptídeo pode não ser extrapolável para outros.

[00113] Em alguns poucos casos, a eficiência de isolamento é alta demais e pouco realista ou apresenta variações acentuadas, por exemplo, para o peptídeo NCAPG-001 (Figura 9A). Nos casos em que a eficiência não pôde ser determinada, por exemplo, devido a dificuldades de quantificação de peptídeos específicos (por exemplo, LIQ elevado para os peptídeos CCNB1-002 e ASPM-001) ou a eficiência calculada ultrapassou 100%, os inventores supuseram que a eficiência de isolamento foi de 100%. Essa abordagem é conservadora e provavelmente sobrestima a eficiência do isolamento, fazendo, em última análise, com que o número de cópias de peptídeo por célula seja subestimado.

[00114] Para estimar a variação da eficiência do isolamento de TUMAPs, os coeficientes de variação (CV em %) do isolamento de TUMAPs individuais de 6 a 8 amostras foram apresentados em um gráfico (Figura 9C). Ao todo, a variação média dos TUMAPs de A*02 foi de 24% e a de TUMAPs de A*24 32%.

Determinação de contagens celulares em tecidos sólidos congelados

[00115] Outro fator essencial para calcular o número de cópias de peptídeos por célula é a estimativa da contagem total de células em

amostras teciduais usadas para isolar TUMAPs. Os inventores optaram por empregar análise de conteúdo de DNA, pois este método pode ser aplicado a diversos tipos de amostras de origens diferentes e, especialmente, a amostras congeladas (Forsey and Chaudhuri, 2009; Alcoser et al., 2011; Alcoser et al., 2011; Silva et al., 2013).

[00116] Devido à heterogeneidade intratumoral, a contagem celular precisa ser determinada em uma fração tecidual representativa da totalidade da amostra empregada para isolar TUMAPs. O lisado tecidual preparado durante o isolamento do TUMAP é uma amostra apropriada para análise de DNA, posto que é mais homogênea que uma fração do tecido sólido. Uma vez isolado o DNA, a concentração total de DNA foi quantificada em um ensaio baseado em fluorescência (Life Technologies, Qubit HS DNA Assay) e o conteúdo total de DNA das amostras foi calculado.

[00117] Para calcular as contagens de células a partir de uma determinada quantidade de DNA, os inventores consideraram dois métodos diferentes: Primeiro, o número de células pode ser estimado a partir da massa teórica do genoma humano, que foi estimada em cerca de 6,67 pg de DNA por genoma diploide (Alcoser et al., 2011; Konigshoff et al., 2003). Uma alternativa é empregar amostras com contagem de células conhecidas para preparar uma curva padrão de DNA empregando os mesmos métodos usados para as amostras de tecidos. Esse método compensa eventuais efeitos do procedimento de isolamento e quantificação do DNA, melhorando assim a exatidão dos resultados. Os inventores prepararam duas curvas padrão diferentes: uma de sete linhagens de células tumorais e a outra de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de seis doadores saudáveis.

[00118] Para comparar esses três métodos de avaliação (massa teórica de DNA e duas curvas padrão diferentes baseadas em

células), o número de células por grama de tecido foi calculado para várias amostras (Figura 10A). Os cálculos realizados usando a linhagem celular padrão indicaram contagens celulares significativamente menores (subestimadas em até 3,6 vezes) que o uso do padrão com CMSP. Isso era esperado, pois linhagens de célula Tumoraís geralmente possuem proporções mais elevadas de células aneuploides, cujo conteúdo de DNA é mais elevado, que CMSPs diploides saudáveis. Na literatura, a proporção de tumores gástricos diploides varia de 25% a 67%, dependendo do estudo (Hiyama et al., 1995; Tamura et al., 1991; Wiksten et al., 2008; Zhang et al., 2005; Sugai et al., 2005). Como a ploidia e a proporção de células aneuploides das amostras de tecido são desconhecidas, ambas as curvas padrão podem apresentar apenas uma estimativa da verdadeira contagem celular, sem considerar todas as propriedades de uma determinada amostra de tecido. Outras fontes de variabilidade são o desconhecimento do estado de proliferação da amostra de tecido e a presença de células necróticas. Em particular, a dobra do conteúdo de DNA em células em proliferação aumenta a quantidade de DNA em relação ao número de células, introduzindo, portanto, um viés na contagem de células. Em duas amostras de tecido gástrico normal, o número de células por grama de tecido calculado pelos inventores foi menor que nas amostras tumorais com qualquer das três técnicas.

[00119] Para adotar uma abordagem conservadora, os inventores decidiram usar a curva padrão de CMSP (Figura 10B). Isso pode sobrestimar a contagem celular em amostras de tecido obtidas de porções com alta proporção de células diploides, fazendo com que a contagem de cópias de peptídeos seja subestimada em tais amostras, mas nunca sobestima o número de cópias de peptídeo por célula em nenhuma amostra.

[00120] Para análise das amostras teciduais selecionadas para quantificação absoluta de TUMAPs, os inventores isolaram DNA de 2 a 3 alíquotas de lisado de tecido, e cada preparação de DNA foi quantificada 2 a 3 vezes em um ensaio baseado em fluorescência. As contagens de células (totais e por grama de tecido) foram calculadas a partir do conteúdo total de DNA usando a curva padrão de CMSP (Figura 11A). Para obter uma estimativa da variação global da análise das contagens celulares, o coeficiente de variação (%) foi determinado inicialmente ao nível de cada amostra ou, quando disponível, de uma réplica biológica (isto é, preparações independentes de lisado de tecido de partes diferentes de um mesmo tumor). Esse cálculo levou em conta a variação entre as alíquotas do lisado de tecido e também das mensurações em réplicas usando o ensaio fluorescente. Esses CVs são mostrados na Figura 11B, e a variação total foi determinada a partir da mediana dos CVs mostrados. A variabilidade pode ser explicada parcialmente por que os lisados de tecidos não foram inteiramente homogeneizados, isto é, restaram algumas partículas de tecido com células não dissociadas que elevaram a contagem de células individuais para réplicas de isolados individuais (ver, por exemplo, GC816T na Figura 11A).

Cópias de peptídeo por célula

[00121] A partir de dados de quantificação de peptídeos por nano-LC-MS/MS ("peptídeo total"), da eficiência do isolamento de TUMAP ("% de eficiência de isolamento") e da contagem celular de cada amostra de tumor disponível, pode-se calcular o número de cópias de TUMAP por célula de acordo com a seguinte fórmula:

[00122] A quantidade total de peptídeo foi calculada a partir dos resultados de 2 a 4 experimentos de nano-LC-MS/MS ("peptídeo/sequência [fmol]") usando as curvas de calibração mostradas nas Figuras 4 a 7.

$$\text{Total de peptídeo} = \left(\frac{\text{peptídeo}}{\text{sequência}} [\text{fmol}] \right) \times \frac{6,022 \times 10^{23} \left[\frac{1}{\text{mol}} \right]}{10^{15} \left[\frac{\text{fmol}}{\text{mol}} \right]} \times \frac{\text{peptídeo em eluato } [\mu\text{L}]}{\text{Amostra para MS por sequência} [\mu\text{L}]} \times$$

100%
% do lisado usado para isolar TUMAPs

(2)

[00123] Apenas medições de MS acima do LIQ, conforme definidas pelas curvas de calibração, são usadas para calcular os números absolutos de cópias de peptídeos. O LIQ refere-se à quantidade de TUMAPs em um ensaio de nano-LC-MS/MS ("LIQ/sequência [fmol]").

[00124] O número de cópias por célula para todos os peptídeos quantificáveis variou de 50 a 30.000 cópias por célula (ver Tabela 3).

Tabela 3: Visão geral do número de cópias por célula de TUMAPs de HLA-A-*02 e HLA-A-*24

[00125] TUMAPs de HLA-A*02 foram analisados em 8 amostras e de HLA-A*24 em 6 amostras. nq = não quantificado porque a quantidade de peptídeo estava abaixo do LIQ

Alelo de HLA	Código do peptídeo	Quantificado em n amostras (% das amostras analisadas)	Cópias por célula (intervalo de amostras individuais e replicados biológicos)
A*02	IGF2BP3-001	1 (13%)	350-450
A*02	FAP-003	1 (13%)	200-250
A*02	COL12A1-002	0 (0%)	nq
A*02	MXRA5-001	1 (13%)	450
A*02	NCAPG-001	1 (13%)	1000
A*02	COL6A3-002	0 (0%)	nq
A*02	WNT5A-001	1 (13%)	400
A*02	F2R-001	5 (63%)	50-300
A*02	HIF1A-001	3 (38%)	9000-30000
A*02	MET-001	2 (25%)	200-250
A*02	CCNB1-002	0 (0%)	nq
A*24	ASPM-002	0 (0%)	nq
A*24	SLC6A6-001	2 (33%)	1000-5000
A*24	MMP3-001	2 (33%)	100-250
A*24	CDC2-001	0 (0%)	nq
A*24	ASPM-001	0 (0%)	nq
A*24	ATAD2-001	2 (33%)	1500-6000
A*24	KIF2C-001	1 (17%)	3500
A*24	MET-006	3 (50%)	2500-13500
A*24	AVL9-001	4 (67%)	1000-10000
A*24	PPAP2C-001	5 (83%)	200-1500
A*24	UCHL5-001	1 (17%)	2500
A*24	UQCRB-001	1 (17%)	900

[00126] Para visualizar o LIQ no âmbito de cópias de "peptídeo por

célula", o "LIQ por célula" foi calculado para cada TUMAP de cada amostra usando as duas fórmulas apresentadas anteriormente. Como as amostras apresentavam contagens celulares diferentes, cada amostra apresenta um LIQ por célula diferente. (Ver Figuras 12 e 13 para TUMAPs de A*02 e 14 e 15 para TUMAPs de A*24.)

Estimativa do erro na quantificação absoluta de TUMAPs

[00127] Para estimar a variação da quantificação absoluta de TUMAPs, os inventores consideraram a variação relativa dos três principais resultados experimentais, conforme descrito anteriormente:

a) a quantidade de TUMAPs isolados, que apresentou desvio relativo de 1,8% (A*02) e 2,1% (A*24)

b) a eficiência do isolamento de TUMAPs, que apresentou desvio relativo de 24% (A*02) e 32% (A*24)

c) a contagem celular da amostra de tecido mostrou desvio relativo de 27%

[00128] Supondo que as variáveis apresentam distribuições normais, o erro relativo (σ) de "cópias por célula" pode ser calculado obtendo-se a raiz quadrada da soma dos erros relativos quadráticos de cada variável.

$$\sigma_{\text{cópias}} = \sqrt{(\sigma_{\text{contagem total de células}})^2 + (\sigma_{\text{total de peptídeo}})^2 + (\sigma_{\text{eficiência de isolamento}})^2}$$

[00129] Com os valores mencionados anteriormente, o coeficiente de variação para o número total de cópias de peptídeo por célula é de cerca de 36 % para peptídeos de HLA-A*02 e 42% para peptídeos de HLA-A*24. Para apresentar uma impressão da variabilidade dos resultados, foram calculados o erro absoluto e relativo de cópias de peptídeo por célula para um modelo de amostra e peptídeo. (Tabela 4).

Tabela 4: Exemplo de cálculo do erro absoluto e relativo na quantificação absoluta de TUMAPs para um peptídeo modelo

	valor	A*02		A*24	
		Erro relativo (%)	Erro absoluto	Erro relativo (%)	Erro absoluto
Contagem total de células por amostra	1x10 ⁸	27%	-	27%	-
Peptídeo total [fmol]	16,25	1,8%	-	2,1%	-
Eficiência do isolamento de peptídeos ligados a MHC	10%	24%	-	32%	--
Cópias de peptídeo por célula	1000	36%	360	42%	420

[00130] Esse modelo de cálculo sugere que, para a análise complexa e multietapa da quantificação absoluta, a variação dos resultados ainda se encontra em um intervalo aceitável. Para alguns TUMAPs individuais, o erro relativo pode se desviar do erro médio aqui calculado. O número de cópias de TUMAP por célula pode ser comparado quantitativamente entre TUMAPs diferentes para permitir que os TUMAPs sejam priorizados para seleção de anticorpos e/ou receptores solúveis de células T como alvos apropriados.

Comparação do método de TUMAP com outros métodos conhecidos e publicados

[00131] Nunca havia sido demonstrada uma abordagem exata para quantificação absoluta do número de cópias de peptídeos associados a MHC por célula. Mais importante, os métodos publicados anteriormente para quantificação de peptídeos ligados ao MHC empregando análise de MS não consideraram a perda antigênica que ocorre durante a preparação da amostra (Tan et al., 2011; Hogan et al., 2005). O grupo de Peter A. von Velen publicou recentemente um método para "quantificação exata de peptídeos ligados a MHC" (Hassan et al., 2014). Nessa nota técnica, foi usada uma abordagem para quantificar dois antígenos de histocompatibilidade menores —

LB-NISCH-1A e LB-SSR1-1S — em células EBV-LCL JYpp65. Entretanto, as etapas específicas desse experimento são bastante diferentes, conforme mostrado nas tabelas a seguir.

Tabela 5: Comparação dos métodos de quantificação de TUMAPs de Hassan et al. e da presente invenção

	Hassan et al.	Presente invenção
Curvas de calibração de peptídeos	Usadas apenas para determinar o intervalo linear, pressupondo-se que todos os peptídeos apresentam a mesma correlação entre quantidade de peptídeo e sinal de MS (inclinação = 1).	Para determinar o intervalo linear e o LIQ e quantificar os peptídeos, deve-se considerar a correlação específica para cada peptídeo entre quantidade e sinal de MS.
Quantificação de peptídeos	Calibração com um ponto: sinal em relação ao padrão com peptídeo replicado	Método padrão interno, baseado na curva de calibração específica para o peptídeo e quantificação de amostras próximas do LIQ.
Eficiência do isolamento	Complexos MHC-peptídeo replicados em lisado após lise por 2 horas e depuração por centrifugação, desconsiderando-se a perda de peptídeo nessas etapas.	Complexos MHC-peptídeo replicados diretamente após homogeneização do tecido, isto é, no momento mais precoce do isolamento de peptídeos.
Amostras	Linhagem celular	Tecido de tumores sólidos
Preparação de amostras	Etapa adicional de cromatografia em C18 antes da nano-LC-MS/MS final, etapa realizada para reduzir a complexidade da amostra.	Uso imediato de um imunoprecipitado e amostra filtrada para nano-LC-MS/MS
Determinação do número de células	Contagem de células durante a preparação do "pellet" (aglomerado) celular.	Análise do conteúdo de DNA de lisados de tecidos sólidos
Cálculo do erro	Considera apenas a variação de replicados de MS (CV 0,1% a 7,1%), mas não a variação do isolamento de peptídeos ligantes de MHC (26% e 91% respectivamente) e da contagem celular.	As variações em replicados de MS (CV médio de 1,8% a 2,1%), a eficiência do isolamento de peptídeos ligantes de MHC (CV médio de 24% a 32%) e a determinação da contagem celular (CV médio de 27%) foram consideradas.

[00132] Os dois peptídeos analisados por Hassan et al. apresentaram números de cópias entre 800 a 5300 (desvio relativo 74%) no primeiro e 3000 a 12.000 (desvio relativo 60%) cópias no

segundo replicado biológico. O motivo dessa variação não foi discutido claramente, mas ela pode ter sido causada pelo uso de instrumentos de espectrometria de massa diferentes.

[00133] Em resumo, espera-se que o método mais refinado da presente invenção permita obter resultados mais exatos e confiáveis.

Quantificação de peptídeos com poucas cópias

[00134] Os dados apresentados na tabela a seguir foram gerados para demonstrar a capacidade do método da invenção. Alguns peptídeos identificados apresentavam pouquíssimas cópias, tais como o PDE11-001. Pode-se observar que o método permite a determinação de a partir de 10 cópias do peptídeo por célula.

Tabela 6: Quantificação de peptídeos com poucas cópias

[00135] CP: Câncer de próstata; a sequência PDE11-001 é ALLESRVNL (SEQ N°. 25)

Código do peptídeo	Cópias por célula			N°. de amostras			Fonte/HLA
	Mín.	Mediana	Máx.	> LIQ	> LD	avaliável	
Peptídeo 1	20	20	20	1	5	16	NSCLC/A*02
Peptídeo 2	10	30	300	13	16	17	NSCLC/A*02
Peptídeo 3	10	30	50	4	10	18	NSCLC/A*02
Peptídeo 4	10	30	100	17	17	19	NSCLC/A*02
Peptídeo 5	20	20	90	7	8	11	NSCLC/A*02
Peptídeo 6	10	20	50	6	6	10	NSCLC/A*02
Peptídeo 7	< 10	30	200	9	12	15	PC/A*02
PDE11-001	< 10	10	30	8	9	10	PC/A*02

[00136] O PDE11-001 é um peptídeo ligante de HLA-A*02 derivado da fosfodiesterase 11A (PDE11A), que catalisa a hidrólise de cAMP e cGMP e regula negativamente as respectivas vias de sinalização. Mutações da PDE11A já foram associadas com hiperplasia adrenocortical e com formas familiares de tumores testiculares de células germinativas. O peptídeo foi detectado em amostras de câncer de próstata e também em carcinoma hepatocelular, pancreático e de

células renais, mas não em outros tecidos.

Referências conforme citadas

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

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

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

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

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

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

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

Prasad B, Unadkat JD (2014). Comparison of Heavy Labeled (SIL)

Peptide versus SILAC Protein Internal Standards for LC-MS/MS Quantification of Hepatic Drug Transporters. *Int. J Proteomics*. 2014, 451510.

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICAÇÕES

1. Método de quantificação absoluta de pelo menos um peptídeo ligante de MHC em uma célula, sendo que o referido método é **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a) preparar células que apresentam o referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC a partir de uma amostra biológica compreendendo células selecionadas dentre uma amostra de tecido, amostra de sangue, amostra de tumor ou uma amostra de um tecido infectado compreendendo as ditas células, compreendendo digestão enzimática de tecidos e/ou lises celular;

b) determinar a contagem celular da referida preparação da etapa a) compreendendo um método selecionado dentre contagem de núcleos celulares, determinação fotométrica de DNA, determinação fluorimétrica de DNA ou PCR quantitativa;

c) adicionar uma quantidade conhecida do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC e/ou complexo peptídeo-MHC a ser quantificado à referida preparação da etapa a) diretamente após homogeneização de tecido ("adição I");

d) isolar pelo menos um peptídeo ligante de MHC da referida preparação da etapa c) a fim de obter um eluato de peptídeo;

e) adicionar uma quantidade conhecida de pelo menos um peptídeo ligante de MHC a ser quantificado ao referido eluato de peptídeo ("adição II");

f) realizar uma análise de espectrometria de massa do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC para gerar pelo menos um:

aa) sinal da eficiência do isolamento na etapa d);

bb) sinal da quantidade conhecida do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC conforme adicionado na etapa e); e

cc) sinal do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC das

referidas células preparadas na etapa a); e

g) quantificar o referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC com base em uma comparação de sinais conforme obtidos na etapa f) com

aa) a contagem celular conforme obtida;

bb) a quantidade conhecida do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC e/ou complexo peptídeo-MHC a ser quantificado conforme adicionado na etapa c); e

cc) a quantidade conhecida do referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC a ser quantificado conforme adicionado na etapa e); em que a quantificação compreende gerar uma curva de calibração específica de peptídeo e determinar o limite inferior de quantificação (LLOQ) para o referido pelo menos um ligante de peptídeo de MHC a ser quantificado;

pelo que uma quantificação absoluta de pelo menos um peptídeo ligante de MHC em uma célula é obtido para o referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC se a quantidade quantificada estiver acima do LLOQ como determinado.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido pelo menos um peptídeo ligante de MHC é selecionado de um peptídeo associado a tumor (AAT) ou peptídeo associado à doença (AAD).

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a determinação da quantidade de pelo menos um tipo de molécula do HLA na referida preparação da etapa a).

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um complexo peptídeo-MHC conforme adicionado e/ou pelo menos um peptídeo ligante de MHC conforme adicionado são marcados e, preferivelmente, marcados diferencialmente por isótopos.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4,

caracterizado pelo fato de que o isolamento consiste em cromatografia, tal como cromatografia por afinidade.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a seleção para análise de peptídeos ligantes de MHC super apresentados, superexpressos e/ou específicos para tumores.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o referido método é capaz de ser realizado ou é realizado em uma base de alto rendimento.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido método consiste nas etapas (a) a (g) conforme nela definida.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que a(s) referida(s) amostra(s) biológicas é(são) derivadas de um único indivíduo ou de um grupo de indivíduos que sofrem da mesma condição médica.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a etapa de geração de um perfil personalizado de ligante de MHC, preferivelmente um perfil personalizado de ligante de MHC específico para doença, com base nos referidos peptídeos ligantes de MHC quantificados.

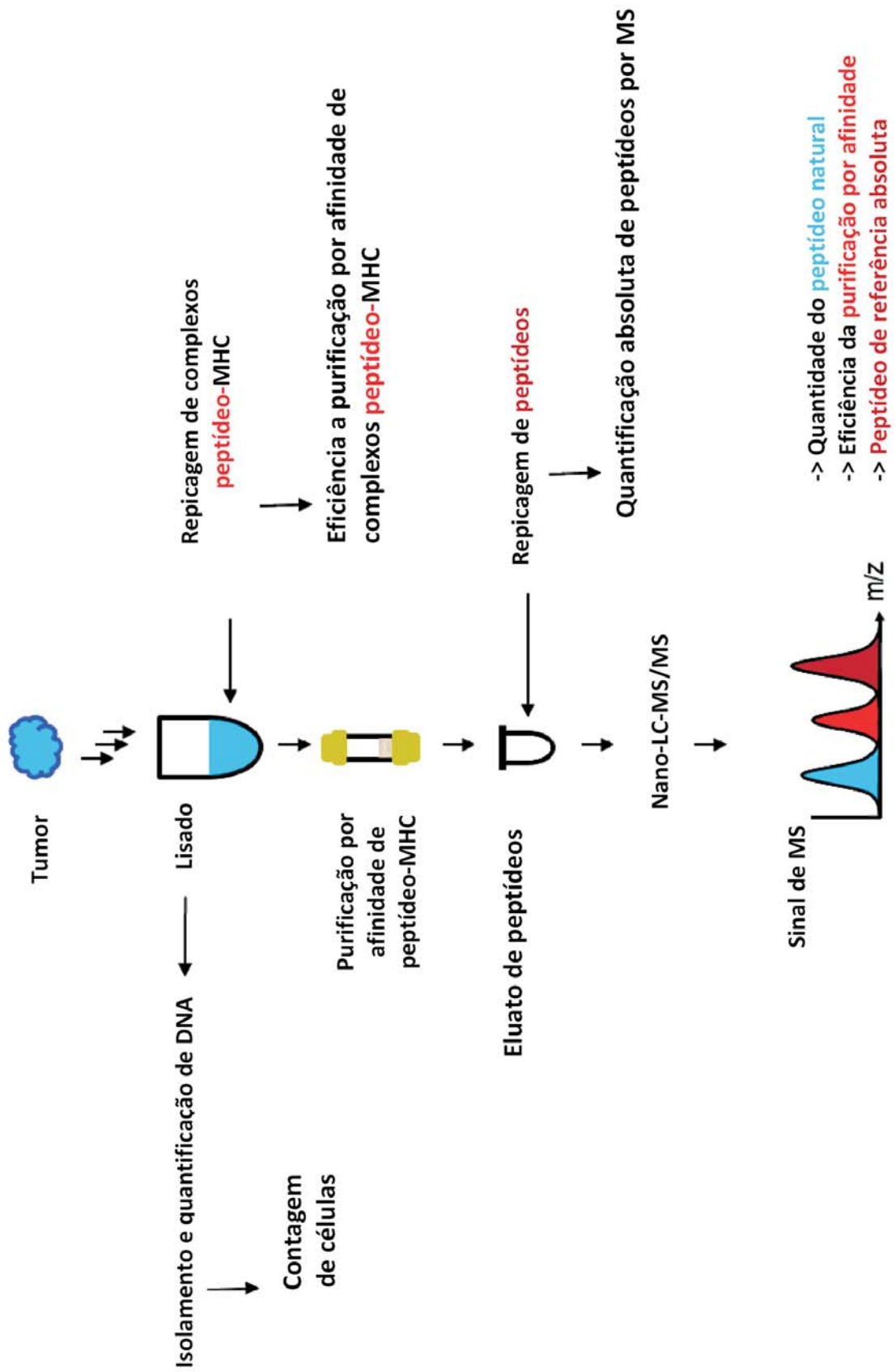


FIG. 1

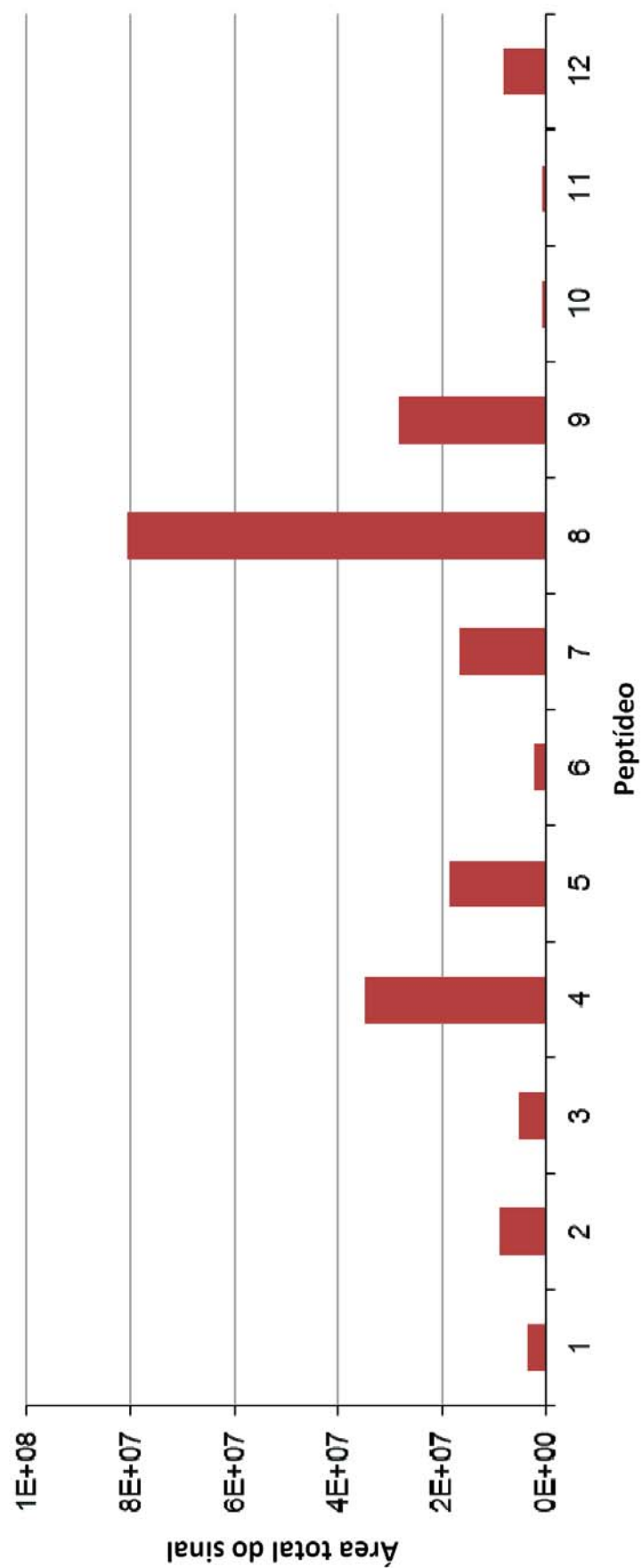
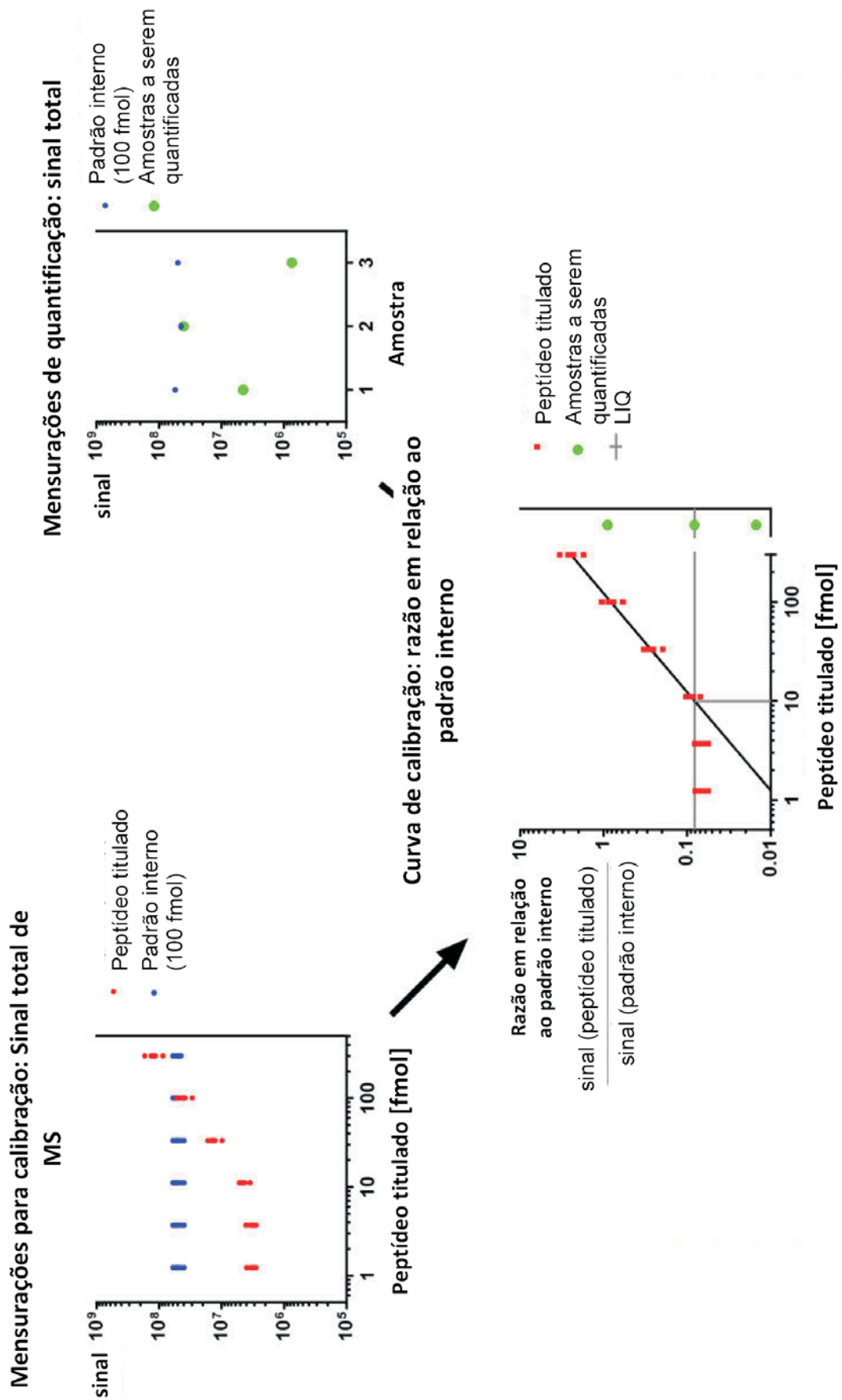


FIG. 2



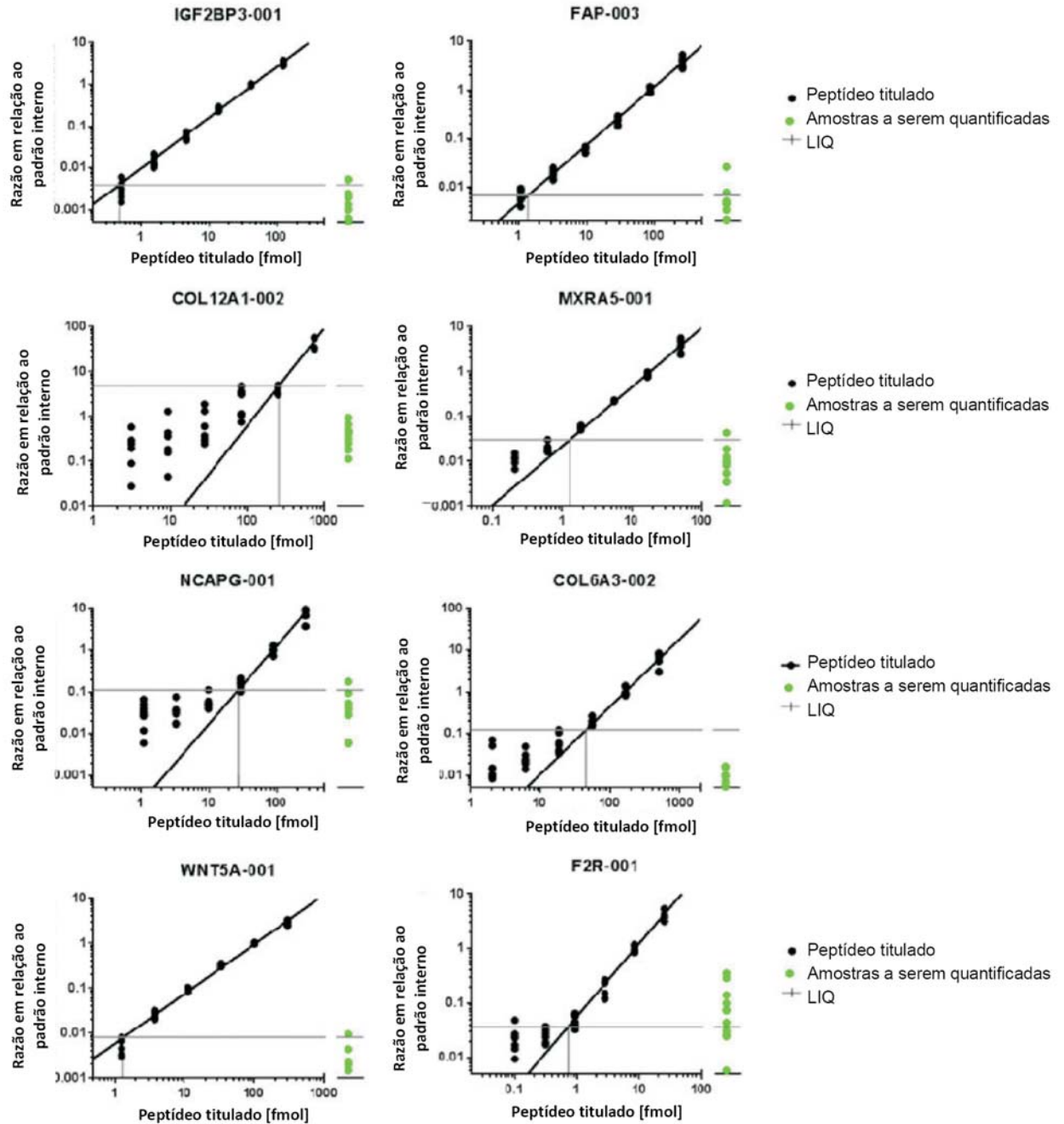


FIG. 4

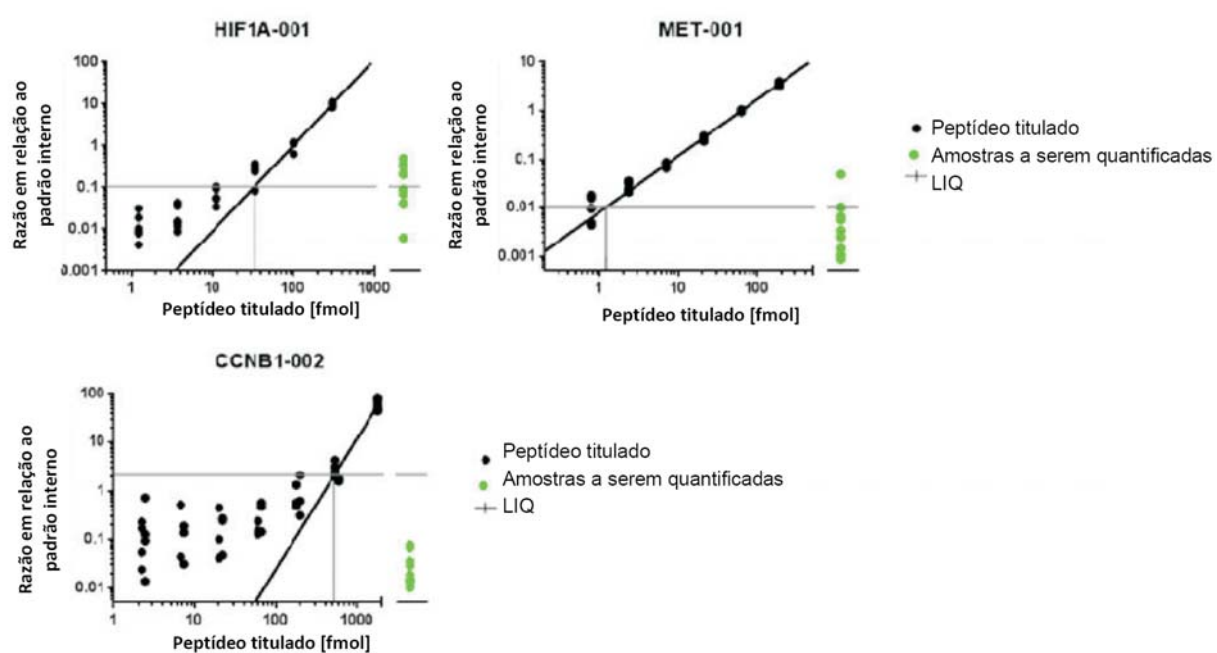


FIG. 5

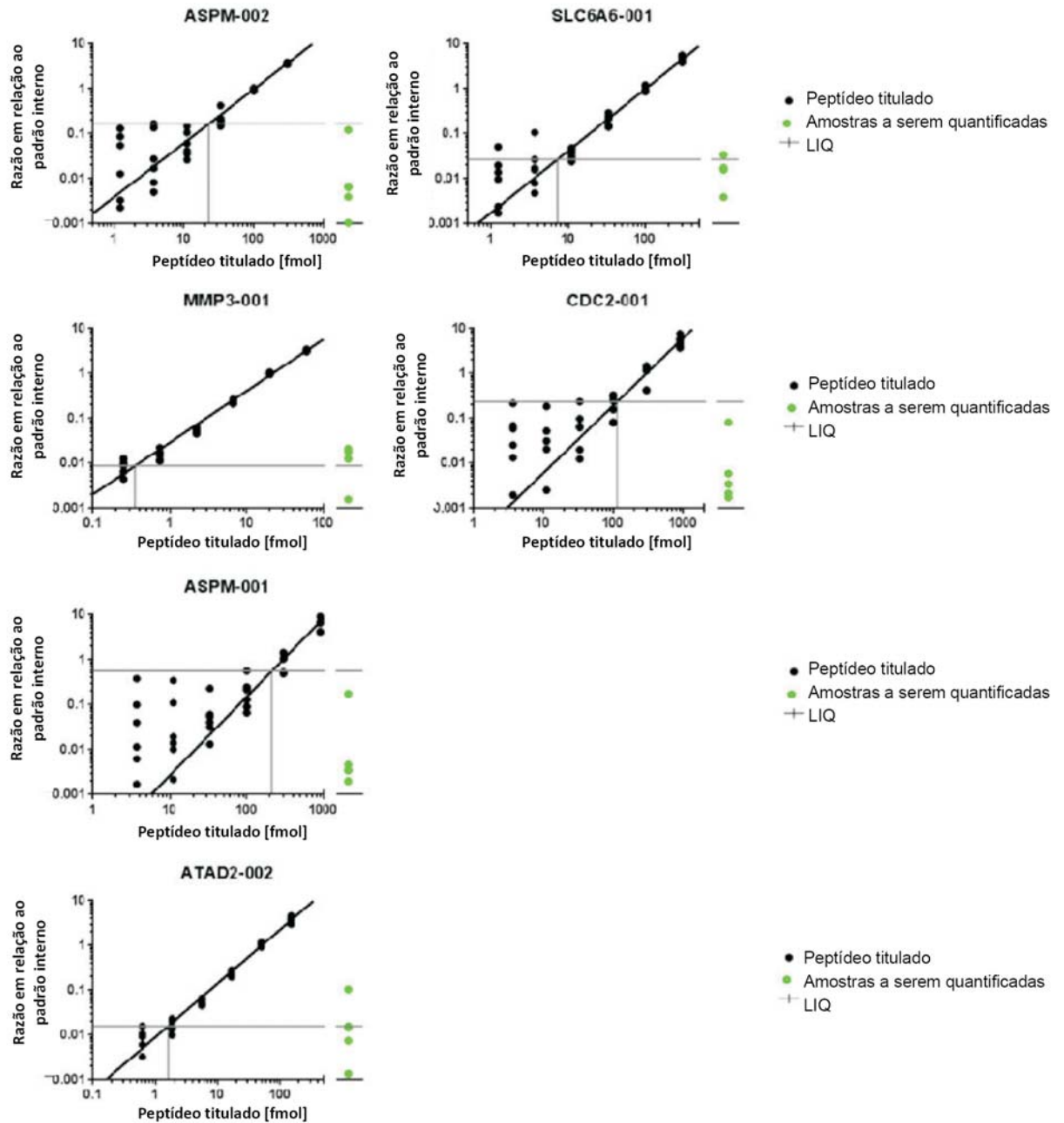


FIG. 6

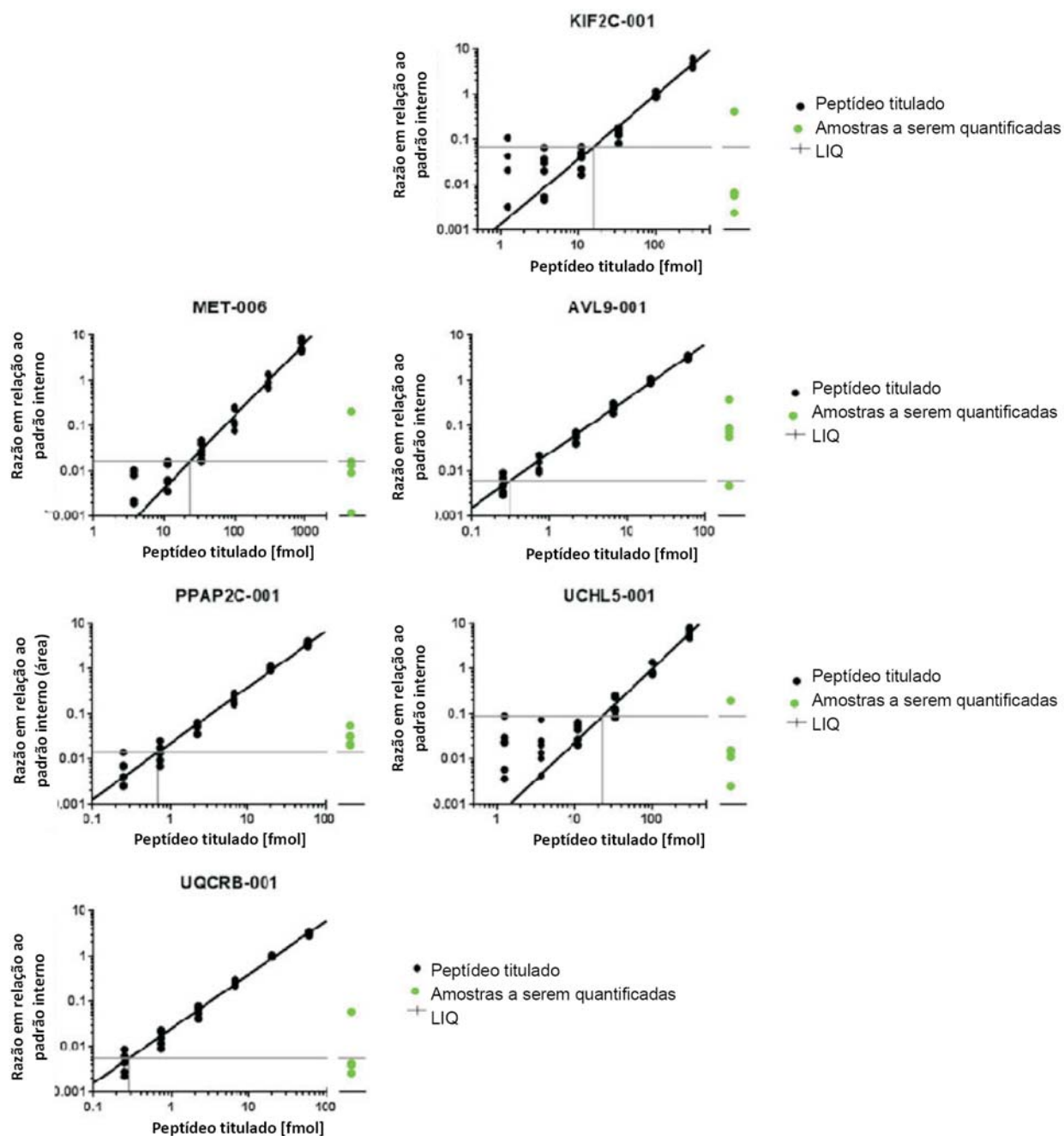


FIG. 7

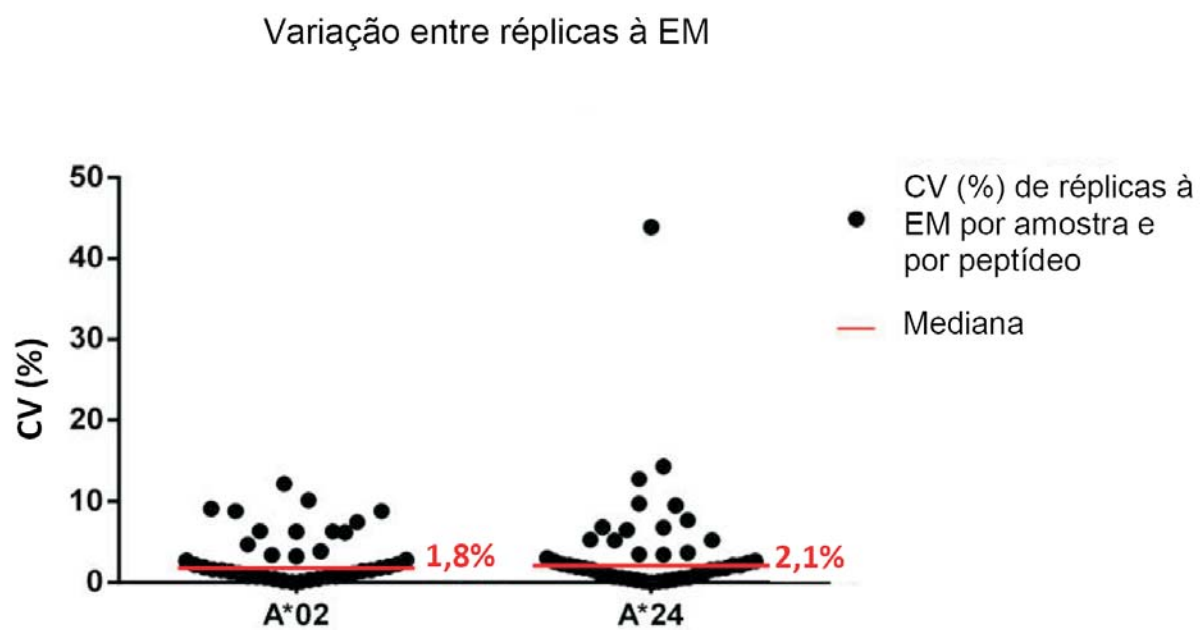


FIG. 8

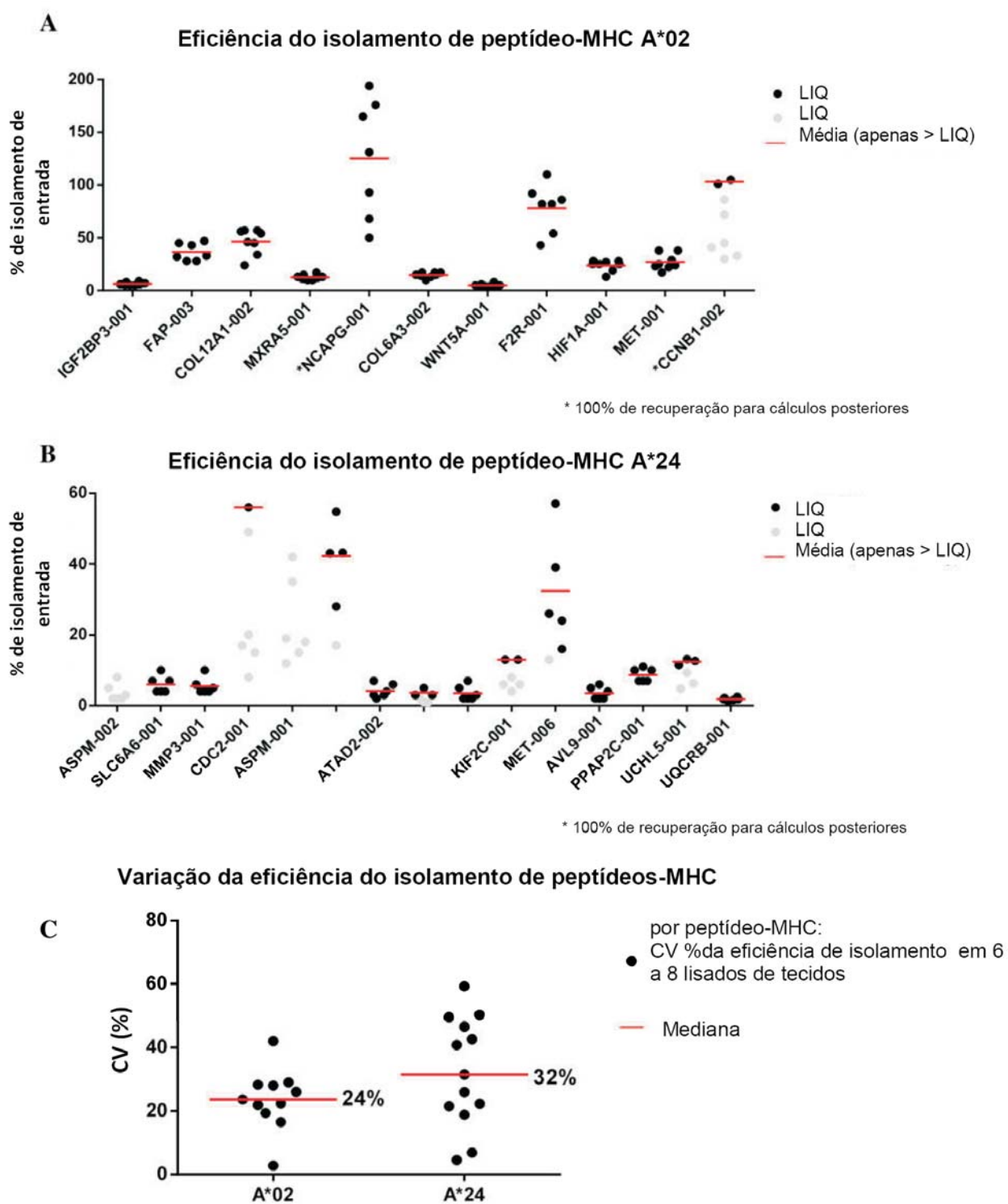


FIG. 9

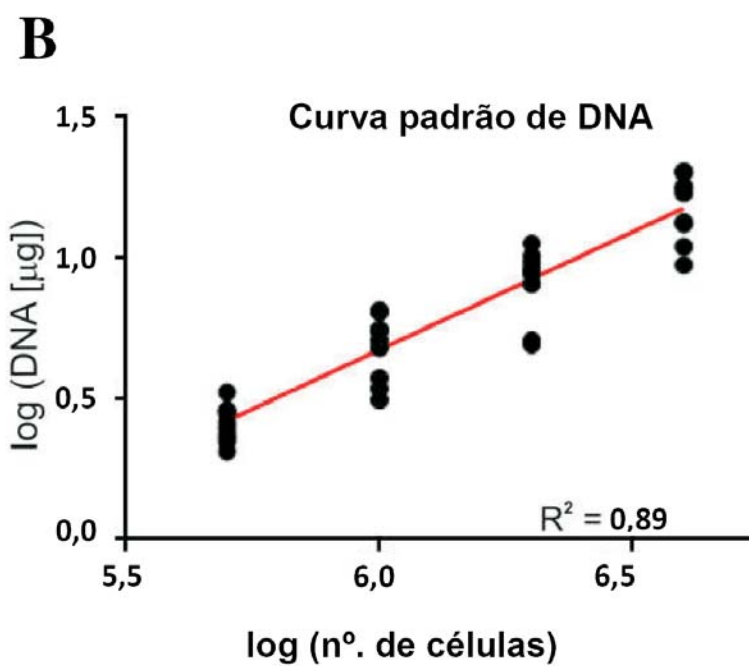
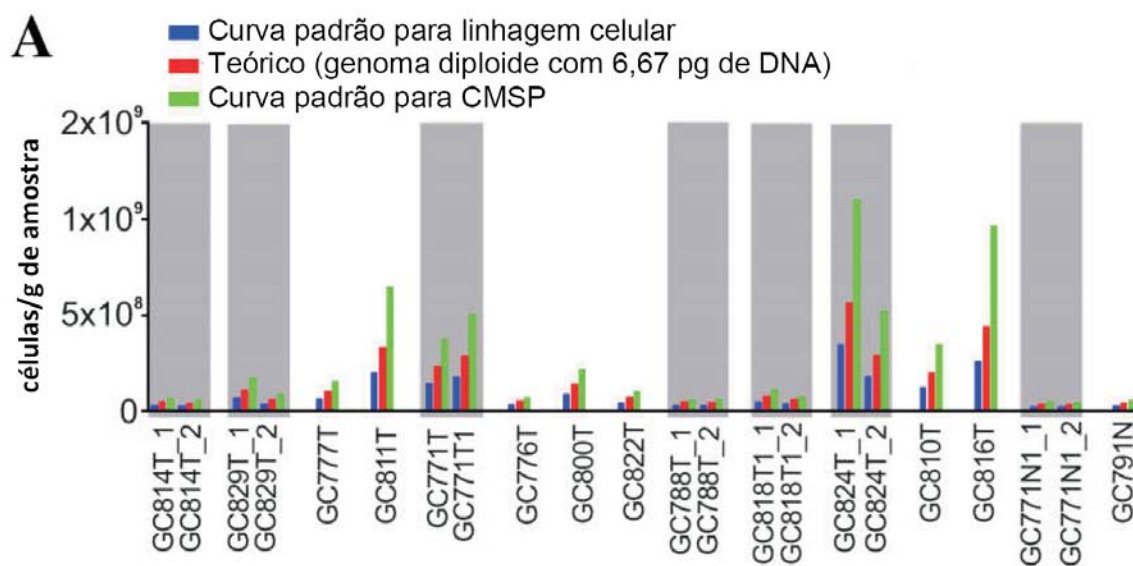
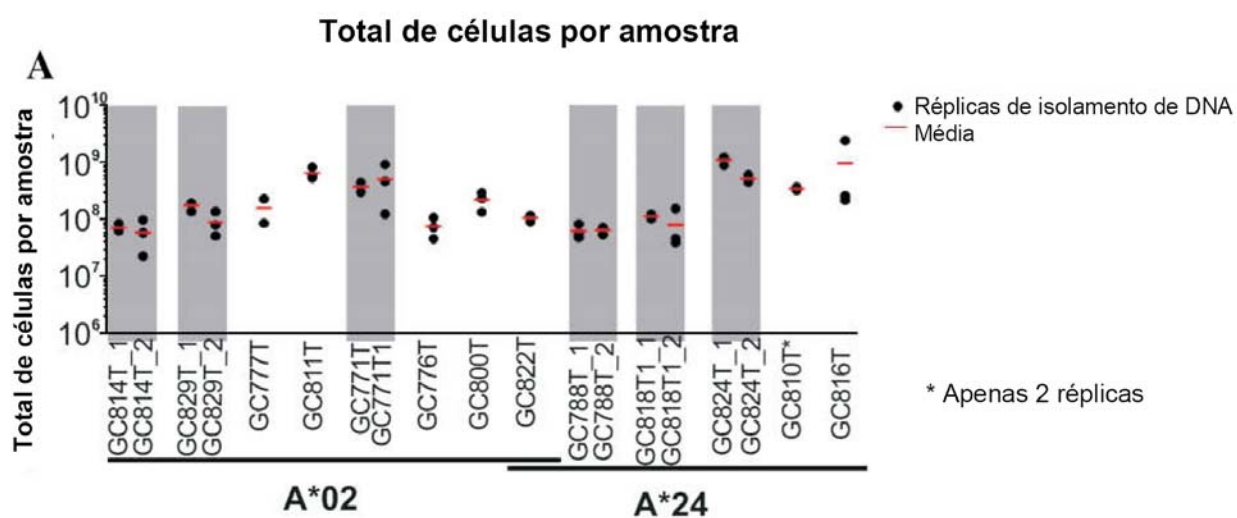


FIG. 10



B

Variação da análise de contagem celular

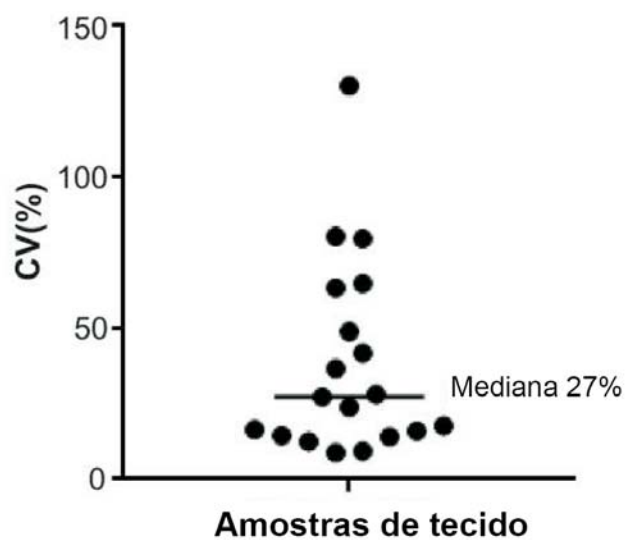


FIG. 11

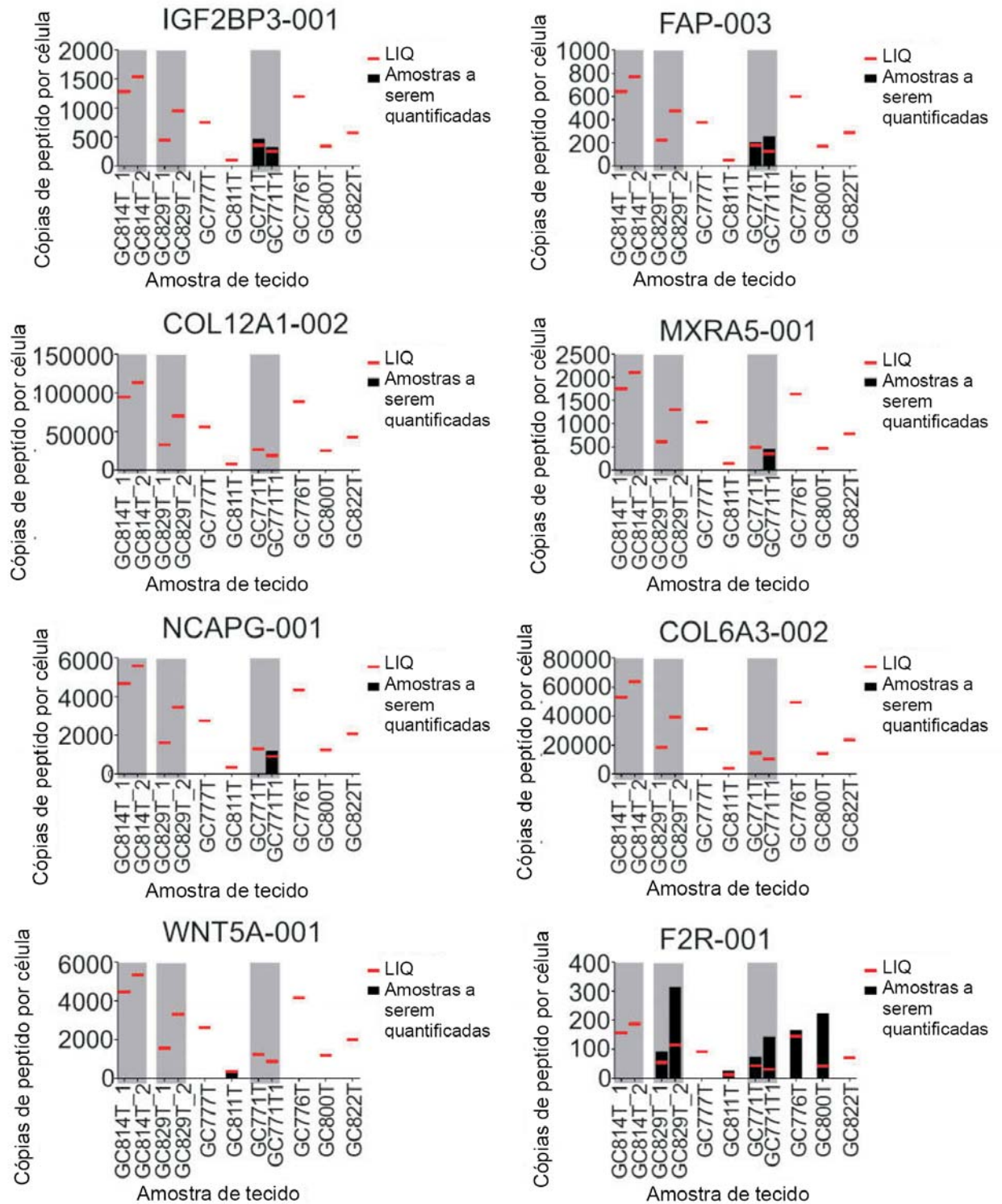


FIG. 12

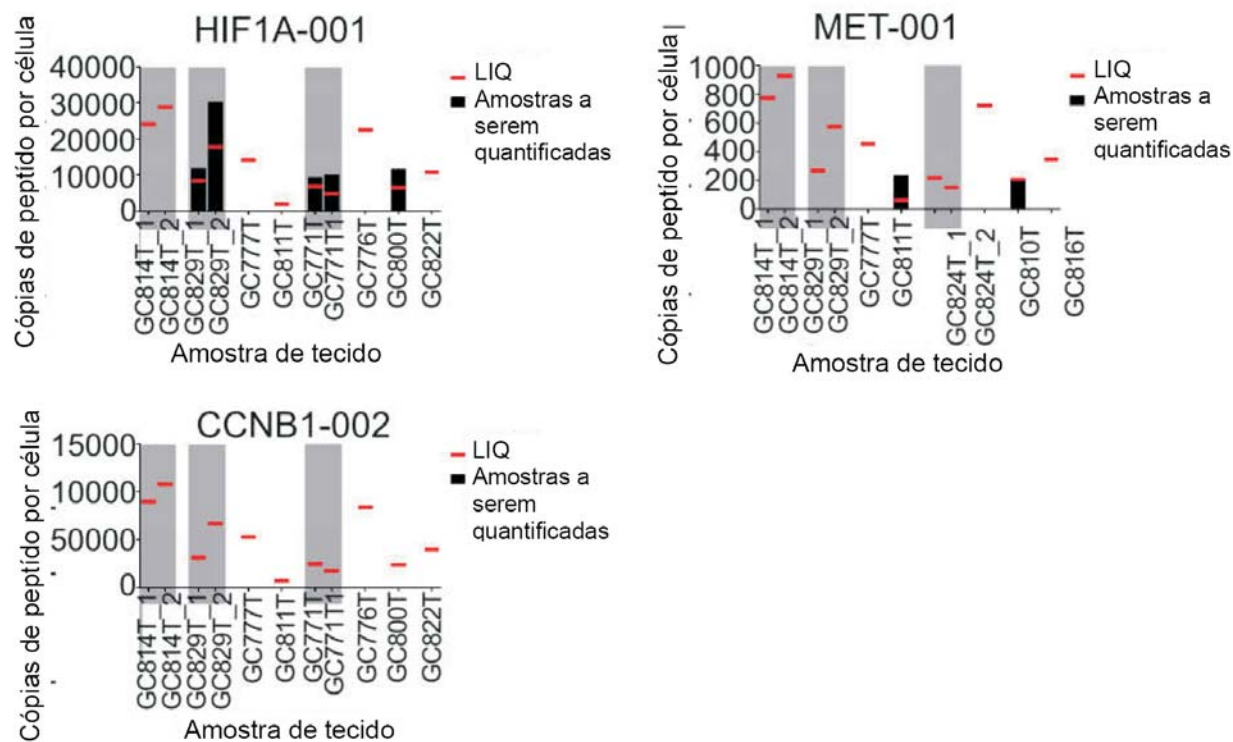


FIG. 13

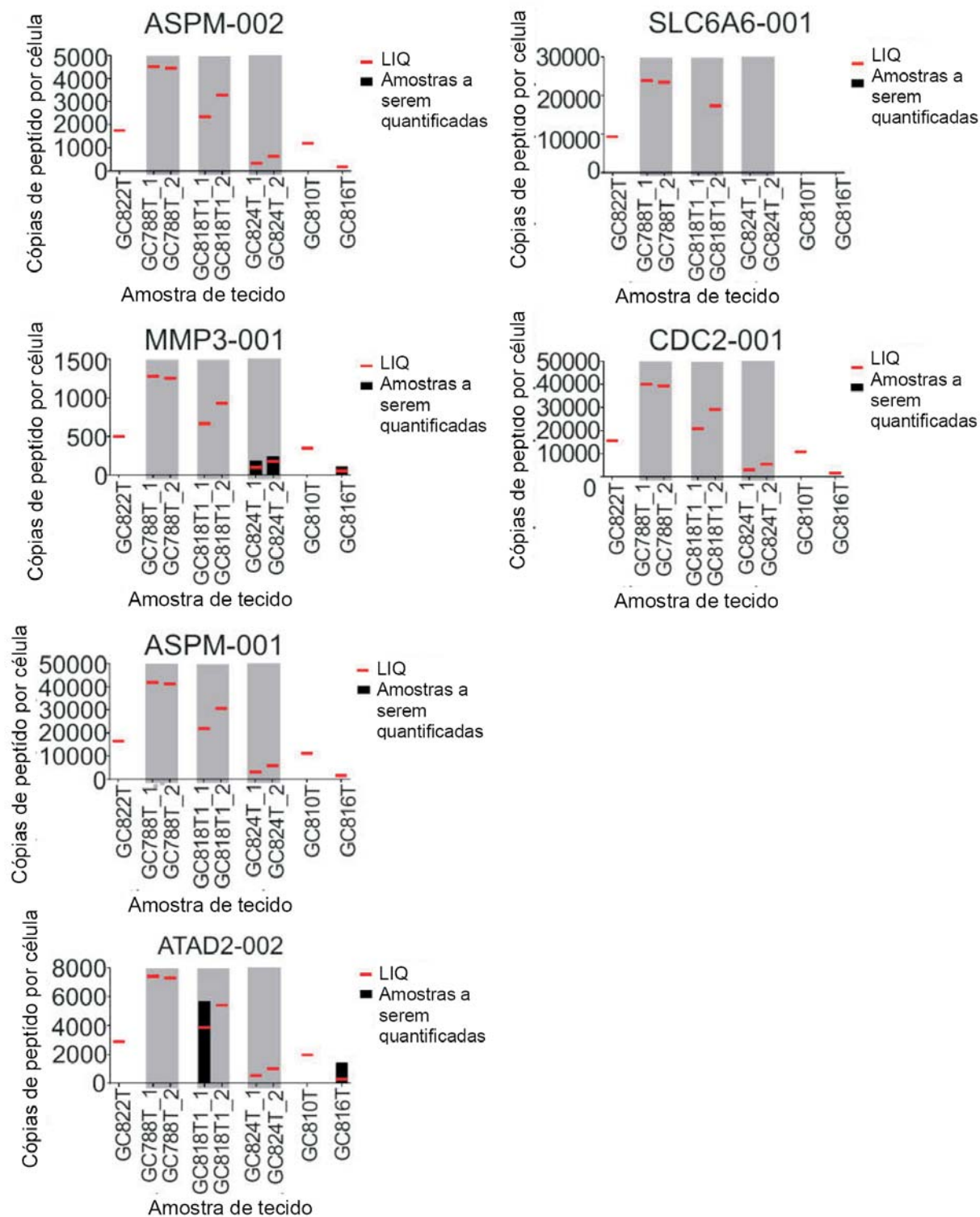


FIG. 14

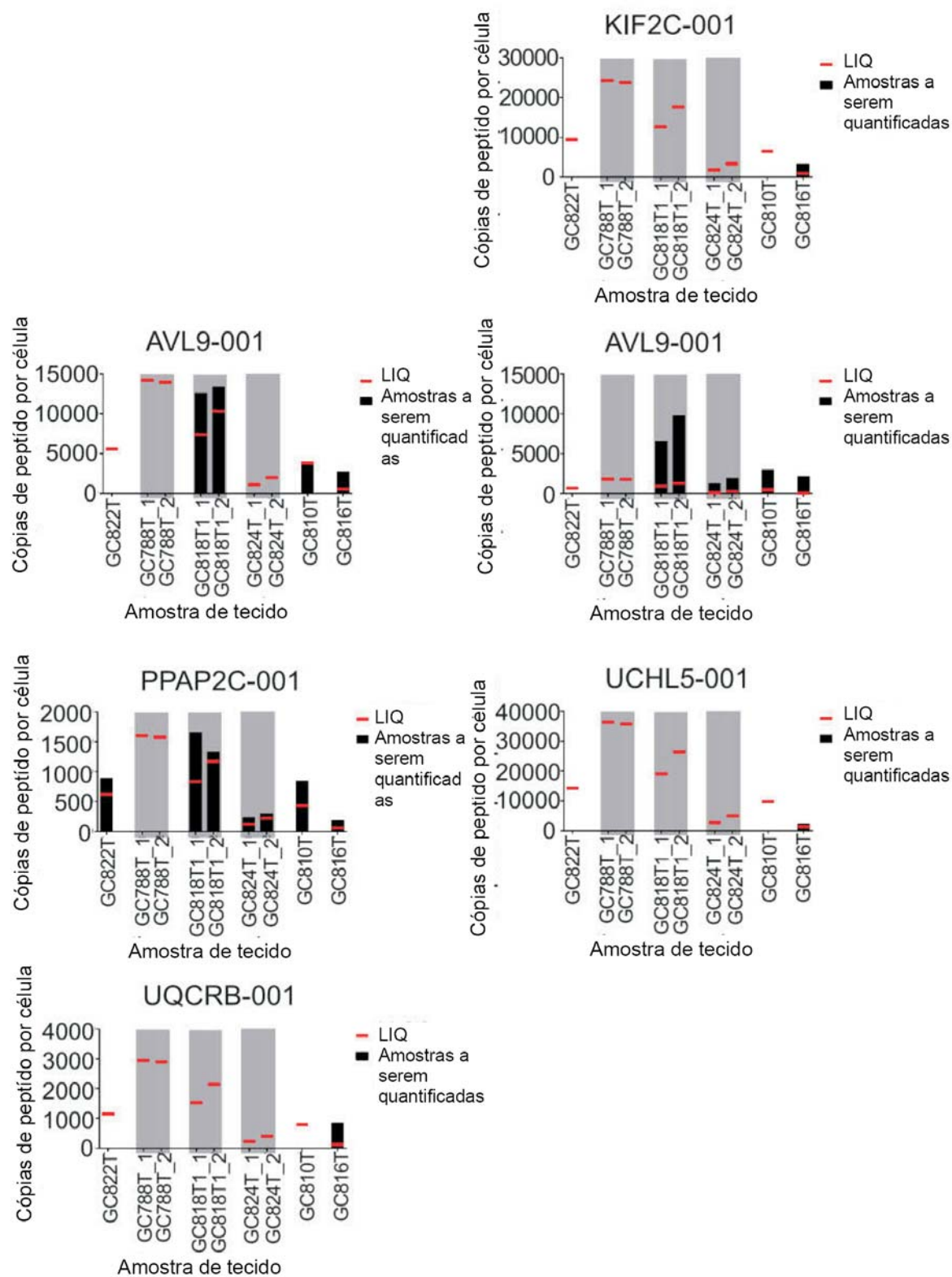


FIG. 15

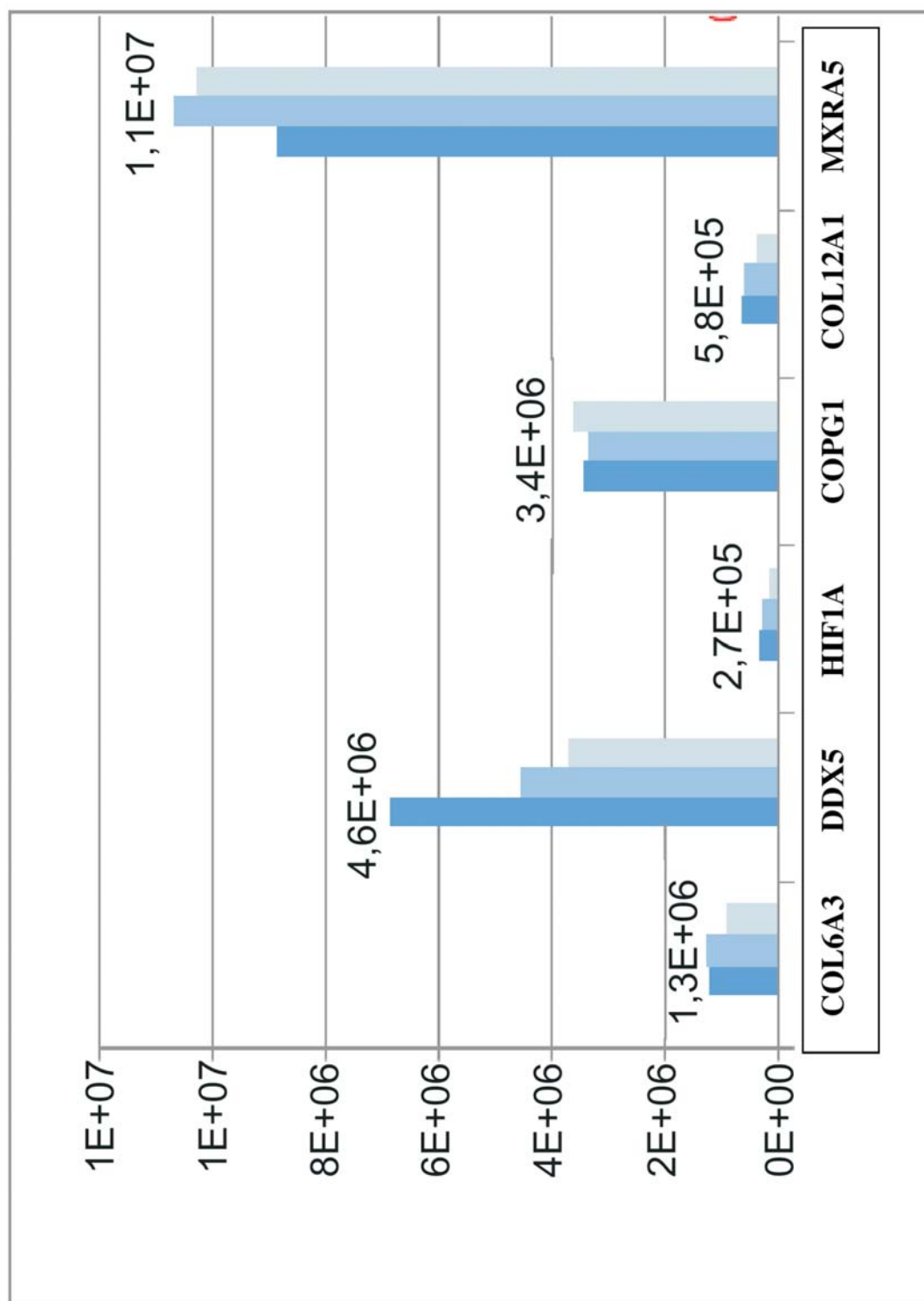


FIG. 16

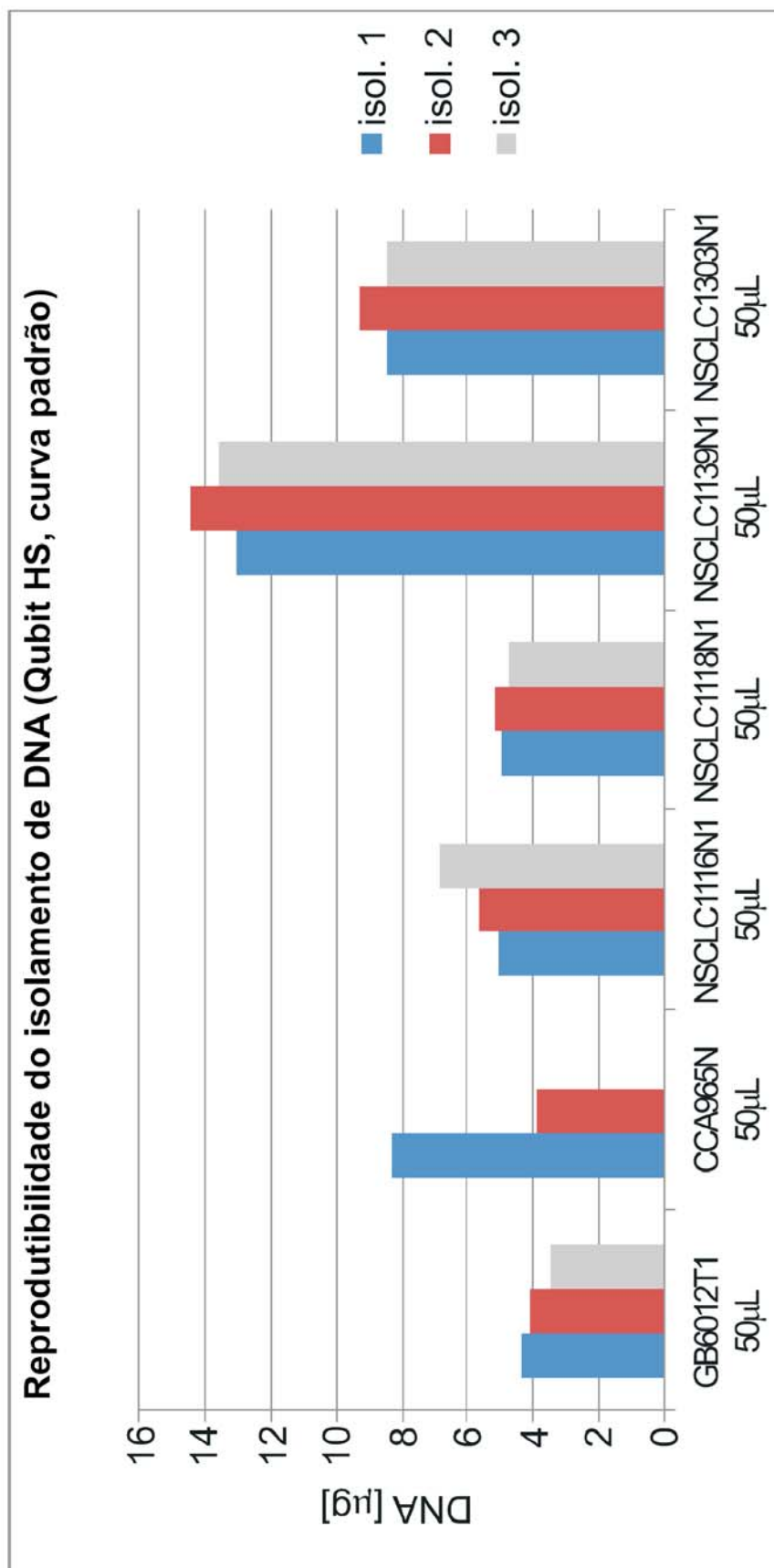


FIG. 17