



MD/EP 3241026 T2 2021.07.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3241026 (13) T2

(51) Int. Cl.:G01N 33/68 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2017 0252 (22) Data de depozit: 2015.12.15 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 15822924.5, 2015.12.15 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3241026, 2017.11.08 (31) Numărul cererii prioritare: 201423361; 201462097994 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2014.12.30; 2014.12.30 (33) Țara cererii prioritare: GB; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 07/2021, 2021.07.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 15/2021, 2021.04.14 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 01/2018, 2018.01.31
(71) Solicitant: IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH, DE (72) Inventatori: WEINSCHENK Toni, DE; LEIBOLD Julia, AT (73) Titular: IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH, DE (74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin	

(54) Metodă pentru cuantificarea absolută a peptidelor de cancer restricționate de HLA procesate natural

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la o metodă de cuantificare absolută a peptidelor de cancer restricționate de HLA procesate natural, adică determinarea numărului de copii ale peptidelor prezentate per celulă. Prezenta invenție nu poate fi utilizată numai pentru dezvoltarea de terapii cu anticorpi sau vaccinuri peptidice, însă este, de asemenea, extrem de valoroasă pentru o imunomonitorizare definită molecular și este utilă în procesele de identificare a unor

2

noi antigeni peptidici pentru strategii imunoterapeutice, cum ar fi vaccinurile respective, terapii bazate pe anticorpi sau abordări privind transferul adoptiv de celule T în cancer, boli infecțioase și/sau boli autoimune.

Secvențe: 25

Revendicări: 10

Figuri: 17

MD/EP 3241026 T2 2021.07.31

(54) Method for the absolute quantification of naturally processed HLA-restricted cancer peptides

(57) Abstract:

1

The present invention relates to a method for the absolute quantification of naturally processed HLA-restricted cancer peptides, i.e. the determination of the copy number of peptide(s) as presented per cell. The present invention can not only be used for the development of antibody therapies or peptide vaccines, but is also highly valuable for a molecularly defined immuno-monitoring, and

2

useful in the processes of identifying of new peptide antigens for immunotherapeutic strategies, such as respective vaccines, antibody-based therapies or adoptive T-cell transfer approaches in cancer, infectious and/or autoimmune diseases.

Sequences: 25

Claims: 10

Fig.: 17

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Prezenta invenție se referă la o metodă de cuantificare absolută a peptidelor de cancer restricționate de HLA procesate natural, adică determinarea numărului de copii ale peptidelor prezentate per celulă. Prezenta invenție nu poate fi utilizată numai pentru dezvoltarea de terapii cu anticorpi sau vaccinuri peptidice, însă este, de asemenea, extrem de valoroasă pentru o imunomonitorizare definită molecular și este utilă în procesele de identificare a unor noi antigeni peptidici pentru strategii imunoterapeutice, cum ar fi vaccinurile respective, terapii bazate pe anticorpi sau abordări privind transferul adoptiv de celule T în cancer, boli infecțioase și/sau boli autoimune.

Domeniul invenției

Dezvoltarea imunoterapeuticii anticanceroase și a imunoterapiilor pentru boli autoimune și infecțioase care vizează inducerea brațului de celule T al sistemului imunitar pentru a lupta împotriva cancerului ar putea fi îmbunătățită substanțial printr-o cunoaștere profundă a nivelurilor de prezentare ale peptidelor legate de antigenul leucocitar uman (HLA) pe țesuturi bolnave primare. Aceste informații sunt relevante pentru terapii bazate pe anticorpi sau vaccinuri peptidice în special, precum și pentru orice alt tip de vaccin cu celule T bazat pe entități moleculare precum proteine, ADN sau ARN. Acest tip de date cantitative nu a fost disponibil anterior pentru țesut derivat de la pacient pe o copie absolută per scară celulară.

O metodă de identificare a peptidelor precum cea de mai sus, care evită problema asociată cu „imunologia inversă” a fost descrisă în EP1508047B1. După cum s-a descris mai sus, această metodă nu poate fi utilizată pentru cuantificarea peptidelor menționate. O altă metodă care utilizează o strategie de marcare a fost descrisă în WO 2005/076009, care a permis o anumită cuantificare, însă nu la o scară absolută. Au fost descriși alți marcatori, de exemplu, în WO 03/025576 sau de către Martin et al. în Proteomics 2003, 3, 2208-2220.

O altă metodă a fost descrisă de Fortier et al. (The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome, JEM, Vol.205, No. 3, March 17, 2008, 595-610). Această metodă are dezavantajul că necesită disecția peptidelor legate de MHC din peptidele care nu se leagă de MHC datorită eluției acide. Aceasta se realizează folosind linii celulare b2m-knockout: Astfel, această metodă nu poate fi utilizată pentru materialele primare tumorale de la pacient. În metodă, timocitele murine primare au fost comparate cu linia celulară murină EL4. Cantitățile inițiale au fost ajustate prin măsurarea moleculelor MHC I. Acest lucru în sine este o restricție puternică a metodei descrise de Fortier et al. Mai mult, nu a fost aplicată o normalizare, așa cum ar fi necesară pentru țesuturi primare de diferite dimensiuni și origine tisulară. În schimb, s-au folosit materiale de pornire echilibrate, normalizarea devenind depășită. Cu toate acestea, normalizarea este absolut necesară pentru materialele primare (de la pacient).

WO2011/128448 descrie o metodă pentru identificarea cantitativă a antigenilor peptidici legați de HLA relevante din probe de țesut primar la scară largă, fără abordări de marcare. Metoda cuprinde etapele de furnizare a cel puțin unui eșantion de țesut primar bolnav și a cel puțin unui eșantion de țesut primar sănătos, de preferință corespunzător țesutului bolnav, prin izolarea liganzilor peptidici MHC din eșantioanele menționate, efectuarea unei analize HPLC-MS pe peptidele ligand MHC menționate, extragerea (zonei) de intensitate a semnalului ionic precursor pentru fiecare semnal, așa cum rezultă din analize, identificarea secvențelor peptidelor ligand MHC menționate și a pașilor de normalizare și pașilor de control al calității datelor pentru a cuantifica relativ liganzii peptidici MHC menționați fără marcare.

Hassan et al. (in: 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>) descriu o abordare în care se prepară monomeri peptidă-MHC (hpMHC) marcați cu izotopi și aceștia se adaugă direct după liza celulară, adică înainte de procesarea obișnuită a eșantionului. Folosindu-se această abordare, se pot lua în considerare toate pierderile din timpul procesării eșantionului și se permite determinarea exactă a liganzilor specifici prezentați de MHC de clasă I. Studiul identifică precis etapa de imunopurificare ca fiind originea pierderilor destul de extreme în timpul pretratării eșantionului și oferă o soluție pentru luarea în considerare a acestor pierderi. Strategia prezentată poate fi utilizată pentru a obține o imagine fiabilă a numărului de copii ale epitopului și, deci, se consideră că permite îmbunătățirea designului vaccinului și a strategiilor pentru imunoterapie.

Stimularea unui răspuns imunitar depinde de prezența unor antigeni recunoscuți ca străini de către sistemul imunitar al gazdei.8 Descoperirea existenței antigenilor asociați tumorilor și bolilor a creat posibilitatea de a folosi sistemul imunitar al gazdei pentru a interveni asupra

creșterii tumorale. În prezent, imunoterapia cancerului explorează diferite mecanisme de valorificare a ambelor componente, umorală și celulară, ale sistemului imunitar.

Elemente specifice ale răspunsului imunitar celular sunt capabile de a recunoaște și distruge în mod specific celulele tumorale. Izolarea celulelor T citotoxice (CTL) din populațiile celulare care infiltrază tumorile sau din sângele periferic sugerează că aceste celule au un rol important în reacția imunitară naturală împotriva cancerului. Celule T CD8- pozitive (T-CD8⁺) în special, care recunosc peptide legate de molecule de clasă I ale complexului major de histocompatibilitate (MHC). Aceste peptide, de obicei de 8 până la 12 reziduuri aminoacidice, sunt derivate din proteine sau produse ribozomale defecte (DRIPS) localizate în citosol și joacă un rol important în acest răspuns. Moleculele MHC umane sunt desemnate, de asemenea, ca antigeni leucocitari umani (HLA).

Există două clase de molecule MHC: moleculele MHC de clasă I, care se pot găsi pe majoritatea celulelor care prezintă un nucleu. Moleculele MHC sunt compuse dintr-un lanț greu alfa și din beta-2 microglobuline (receptori MHC de clasă I) sau, respectiv, dintr-un lanț alfa și un lanț beta (receptori MHC de clasă II). Conformația lor tridimensională prezintă o incizură de legare care este folosită pentru interacțiuni necovalente cu peptide. MHC de clasă I prezintă peptide care rezultă din clivajul proteolitic al proteinelor predominant endogene, DRIP și peptide mai mari. Moleculele MHC de clasă II se pot găsi numai pe celulele „profesioniști” prezentatoare de antigen (APC) și prezintă inițial peptidele unor proteine exogene sau transmembranare captate de APC prin endocitoză și care sunt procesate ulterior. Complexele de peptide și moleculele MHC de clasă I sunt recunoscute de limfocitele T citotoxice CD8- pozitive purtătoare de TCR (receptor de celule T) adecvat, în timp ce complexele de peptidă și molecule MHC de clasă II sunt recunoscute de celule T helper CD4- pozitive cu TCR adecvat. Este bine cunoscut faptul că TCR, peptida și MHC sunt prezente în raport stoechiometric 1:1:1.

Pentru ca o peptidă să declanșeze (inducă) un răspuns imun celular, trebuie să se lege de o moleculă MHC. Acest proces depinde de alelele moleculei MHC și de polimorfismele specifice ale secvenței de aminoacizi ai peptidei. Peptidele care leagă MHC de clasă I au de obicei o lungime de 8-12 resturi de aminoacizi și conțin două resturi conservate („ancore”) în secvența acestora, care interacționează cu incizura de legare corespunzătoare a moleculei MHC. Astfel, fiecare alelă MHC are un motiv de legare care controlează capacitatea peptidei de a se lega specific la incizura de legare.

În cazul reacțiilor imune dependente de MHC de clasă I, peptidele nu numai că se pot lega de anumite molecule MHC de clasă I exprimate de celulele tumorale, dar trebuie să fie și recunoscute de celulele T care prezintă receptori specifici pentru celulele T (TCR).

Antigenii care sunt recunoscuți de limfocitele T citotoxice specifice tumorii, adică epitopii acestora, pot fi molecule derivate din toate categoriile de proteine, cum ar fi enzimele, receptorii, factorii de transcriere etc. care sunt exprimate și care, comparativ cu celulele nemodificate cu aceeași origine, sunt reglate pozitiv în celulele respectivei tumorii.

Clasificarea curentă a antigenilor asociați tumorii sau bolii cuprinde următoarele grupe principale:

Antigeni de cancer testicular: primii TAA [antigeni asociați tumorii; antigenii asociați bolii sunt abreviați DAA] identificați vreodată care pot fi recunoscuți de către celulele T aparțin acestei clase și au fost denumiți inițial antigeni de cancer testicular (CT), deoarece exprimarea membrilor clasei se face în diferite tumori umane diferite din punct de vedere histologic și, la nivelul țesuturilor naturale, are loc numai în spermatocite/spermatogoniile din testicul și, ocazional, în placentă. Deoarece celulele testiculare nu exprimă molecule HLA de clasă I și II, acești antigeni nu pot fi recunoscuți de celulele T în țesuturi normale și prin urmare pot fi considerați specifici tumorii din punct de vedere imunologic specifice tumorii. Exemple bine cunoscute de antigeni CT sunt membrii familiei MAGE sau NY-ESO-1.

Antigeni de diferențiere: aceste TAA sunt împărțite între tumori și țesuturi normale din care provin tumorile; majoritatea sunt identificate în melanoame și melanocite normale. Multe dintre aceste proteine derivate din melanocite sunt implicate în biosinteza melaninei și prin urmare nu sunt specifice tumorii, dar sunt totuși folosite pe scară largă pentru imunoterapia cancerului. Exemplele includ, fără a se limita la, tirozinază și Melan-A/MART-1 pentru melanom sau PSA pentru cancer prostatic.

TAA-uri supraexprimate: Genele care codifică TAA-uri larg exprimate au fost depistate în tipuri histologice diferite de tumori precum și în multe țesuturi normale, în general cu niveluri reduse de exprimare. Este posibil ca mulți dintre epitopii procesați și posibil prezentați de țesuturile normale să fie sub nivelul prag pentru recunoașterea de către celulele T, în timp ce supraexprimarea lor în celulele tumorale poate declanșa un răspuns anticanceros prin încălcarea

toleranței anterior stabilite. Exemplele cunoscute pentru această clasă de TAA-uri sunt Her-2/neu, survivina, telomeraza sau WT1.

Antigeni specifici tumorii: Aceste TAA unice apar din mutații ale genelor normale (cum ar fi β -catenina, CDK4 etc.). Unele dintre aceste modificări moleculare sunt asociate cu transformări neoplazice și/sau progresie. Antigenii specifici tumorii sunt în general capabile să inducă un răspuns imunitar puternic fără a purta riscul unor reacții autoimune împotriva țesuturilor normale. Pe de altă parte aceste TAA sunt în majoritatea cazurilor relevante numai tumorii exacte din care au fost identificate și de obicei nu sunt comune mai multor tipuri individuale de tumori.

TAA-uri care apar prin modificări anormale post-translație: Aceste TAA pot apărea din proteine care nu sunt nici specifice, nici supraexprimate în tumori, dar care devin totuși asociate tumorii prin procese post-translaționale active în mod principal în tumori. Exemplele pentru aceste clase apar din tipare de glicozilare alterată, care duc la epitopi noi în tumori cum ar fi pentru MUC1 sau evenimente de tip scindarea proteinei în timpul degradării, care pot sau nu să fie specifice tumorii.

Proteine oncovirale: aceste TAA sunt proteine virale care pot juca un rol critic în procesul oncogen și acestea, deoarece sunt străine (nu au origine umană) pot evoca un răspuns al celulelor T. Exemple de astfel de proteine sunt proteinele papilomavirusului uman de tip 16, E6 și E7, care sunt exprimate în carcinomul cervical.

Pentru ca proteinele să fie recunoscute de limfocitele T citotoxice ca antigeni specifici tumori sau asociați tumorii ori antigeni specifici bolii sau asociați bolii și pentru a putea fi utilizate în terapie, trebuie îndeplinite anumite condiții prealabile. Antigenul trebuie să fie exprimat în principal de celule tumorale sau celule infectate și deloc sau numai în cantități comparativ mici de țesuturi sănătoase normale, de exemplu mai puțin cu factorul 5, 10 sau mai mult.

În bolile infecțioase există două posibilități: în primul rând, celulele infectate exprimă un antigen care nu este exprimat de celule sănătoase – asociat direct cu infecția – sau celulele infectate supraexprimă un antigen exprimat numai în cantități foarte mici de celule sănătoase – supraexprimarea a unui antigen găsit în mod normal în peptidomul unei celule sănătoase.

Este, de asemenea, de dorit ca respectivul antigen să nu fie prezent într-un singur tip de tumoare, infecție sau tulpină și să fie prezent în concentrații mari (de exemplu, număr de copii per celulă pentru respectiva peptidă). Antigenii specifici tumorii și asociați tumorii și antigenii specifici bolii sau asociați bolii sunt adesea derivați din proteine implicate direct în transformarea unei celule normale într-o celulă tumorală/infectată datorită unei funcții, de exemplu în controlul ciclului celular sau suprimarea apoptozei.

În cazul cancerului, țintele suplimentare din aval ale proteinelor care cauzează direct o transformare pot fi reglate în sens crescător și, prin urmare, pot fi asociate indirect tumorii. Acești antigeni asociați indirect tumorii pot fi de asemenea ținta unei abordări de tip vaccinare (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). În ambele situații este esențială prezența epitopilor în secvența de aminoacizi a antigenului, deoarece această peptidă („peptidă imunogenă”) derivată din antigenul asociat tumorii sau asociat bolii trebuie să inducă un răspuns *in vitro* sau *in vivo* al celulelor T.

În principiu, orice peptidă care se poate lega de o moleculă MHC poate funcționa ca epitop al celulei T. Cerința prealabilă pentru inducerea unui răspuns al celulelor T, *in vitro* sau *in vivo*, este prezența unei celule cu TCR corespunzător și absența toleranței imunologice pentru acest anumit epitop.

Prin urmare TAA și DAA sunt un punct de plecare pentru dezvoltarea unui vaccin tumoral. Metodele pentru identificarea și caracterizarea TAA și DAA sunt bazate pe utilizarea de CTL care se pot izola de la pacienți sau subiecți sănătoși sau sunt bazate pe generarea de profiluri de transcripție diferențiate sau tipare de exprimare diferențiate pentru peptide între tumori și țesuturi normale.

Cu toate acestea, identificarea genelor supraexprimate în țesuturi tumorale sau linii celulare tumorale umane sau exprimate selectiv în astfel de țesuturi sau linii celulare nu asigură informații precise asupra utilizării antigenilor care se transcriu din aceste gene într-un tratament imunitar. Aceasta deoarece numai o subpopulație individuală de epitopi ai acestor antigeni este adecvată pentru o astfel de aplicație deoarece o linie de celule T cu TCR corespunzător trebuie să fie prezentă iar toleranța imunologică pentru acest anumit epitop trebuie să fie absentă sau minimală. Este prin urmare important să se selecționeze numai acele peptide ale proteinelor supraexprimate sau exprimate selectiv care sunt prezente în conexiune cu moleculele MHC împotriva cărora se pot identifica celule T funcționale. Astfel de celule T funcționale sunt definite ca celule T care, la stimularea cu un anumit antigen, pot fi extinse clonal și pot executa funcții efectoare („celule T efectoare”).

Celulele T helper joacă un rol important în modularea rolului efector al CTL în imunitatea anti-tumorală. Epitopii celulelor T care declanșează un răspuns din partea celulelor T helper de tip TH1 susțin funcțiile efectorii ale celulelor T killer CD8-pozitive, care includ funcții citotoxice îndreptate împotriva celulelor tumorale care prezintă pe suprafața celulară complexe MHC/peptide asociate tumorii. Astfel, epitopii peptidei unei celule T helper asociate tumorii, singuri sau asociați cu alte peptide asociate tumorii, pot servi ca ingredient farmaceutic activ al formulărilor de vaccin care ar stimula răspunsul imun anti-tumoral.

Cunoașterea numărului exact de copii ale liganzilor HLA de clasă I sau de clasă II prezentați este importantă în imunologia fundamentală și clinică. În prezent, cele mai bune determinări ale numărului de copii se bazează pe spectrometria de masă, utilizând monitorizarea reacției unice (SRM) în combinație cu o cantitate cunoscută de peptidă marcată izotopic. Totuși, aceste abordări nu sunt încă suficient de precise pentru a putea fi utilizate în mod eficient în abordările de mai sus.

Având în vedere cele de mai sus, prin urmare, obiectivul prezentei invenții este de a furniza o metodă pentru determinarea absolută a numerelor de copii ale liganzilor HLA de clasă I sau de clasă II prezentați care să fie precisă, eficientă, ușor de manipulat și, de asemenea, care poate fi efectuată la un nivel de „randament ridicat”. Alte obiecte și avantaje ale prezentei invenții vor deveni cu ușurință evidente pentru specialist atunci când studiază următoarea descriere, așa cum este furnizată.

Intr-un prim aspect al prezentei invenții, obiectul invenției este rezolvat printr-o metodă de cuantificare absolută a unui ligand peptidic MHC pe o celulă, respectiva metodă cuprinzând

a) prepararea de celule care prezintă ligandul peptidic MHC menționat dintr-un eșantion biologic selectat dintr-un eșantion de țesut, un eșantion de sânge, un eșantion tumoral sau un eșantion de țesut infectat care cuprinde celulele menționate, cuprinzând digestia enzimatică a țesuturilor și/sau liza celulară,

b) determinarea numărului de celule al preparatului menționat la pasul a) cuprinzând o metodă selectată din numărarea nucleilor celulari, determinarea fotometrică a ADN-ului, determinarea fluorimetrică a ADN-ului sau PCR-ul cantitativ,

c) adăugarea unei cantități cunoscute de ligand peptidă-MHC și/sau de complex peptidă-MHC pentru a fi cuantificată la preparatul menționat la pasul a) direct după omogenizarea țesutului („adiționare I”),

d) izolarea ligandului peptidic MHC din preparatul menționat la pasul c) pentru a obține un eluat peptidic,

e) adăugarea unei cantități cunoscute de cel puțin un ligand peptidic MHC pentru a fi cuantificat la eluatul peptidic menționat („adiționare II”) drept calibrant intern,

f) efectuarea unei analize de spectrometrie de masă pe respectivul ligand peptidic MHC pentru a genera

aa) un semnal pentru eficiența izolării de la pasul d),

bb) un semnal pentru calibrantul intern de la pasul e),

și

cc) semnalul pentru respectivul ligand peptidic MHC din respectivele celule preparate la pasul a) și

g) cuantificarea ligandului peptidic MHC menționat pe baza unei comparări a semnalelor obținute la pasul f) cu

aa) numărul de celule obținut,

bb) cantitatea cunoscută de ligand peptidă-MHC și/sau complex de ligand peptidă-MHC menționat pentru a fi cuantificată ca adăugată la pasul c) și

cc) cantitatea cunoscută de cel puțin un ligand peptidic MHC care urmează să fie cuantificată ca adăugată la pasul e), în care cuantificarea cuprinde calcularea unui raport între semnalul calibrantului intern de la pasul e) și semnalul ligandului peptidic MHC izolat și compararea raportului cu o curbă de calibrare stabilită a ligandului peptidic MHC și în care cuantificarea cuprinde în continuare generarea unei curbe de calibrare specifice peptidei bazate pe un raport cu calibrantul intern utilizat la aceeași cantitate și determinarea celui mai scăzut nivel de cuantificare (LLOQ) pentru ca respectivul ligand peptidic MHC să fie cuantificat, prin care se realizează o cuantificare absolută a ligandului peptidic MHC pe o celulă pentru ligandul peptidic MHC dacă acea cantitate cuantificată este peste LLOQ, așa cum a fost determinat.

Intr-o metodă în conformitate cu prezenta invenție, în care mai multe eșantioane sunt analizate în paralel, pasul c) de mai sus poate fi omis odată ce eficiența de izolare a fost stabilită, deoarece eficiența pentru un eșantion poate fi utilizată pentru a estima eficiența izolării pentru un al doilea ligand peptidic MHC și/sau complex de ligand peptidic MHC (adică poate fi utilizat ca valoare de referință încrucișată).

Metoda utilizează semnalul obținut de la calibrarea internă (adiționare II) în e) ca o referință (de control) constantă și păstrată pentru semnalul obținut de la cel puțin un ligand peptidic MHC prin calcularea unui raport între aceste două semnale. Acest raport este comparat cu curba de calibrare stabilită, care include, de asemenea, calibrantul intern în aceeași cantitate, de preferință utilizându-se o parte alicotă identică a unui astfel de calibrant intern. Curba de calibrare descrie apoi relația dintre aceste rapoarte și cantitățile de peptidă. Vezi și Figura 3 și legenda acesteia.

În mod surprinzător, în contextul prezentei invenții, inventatorii au constatat că, prin combinarea pașilor de analiză de mai sus, pentru prima dată devine posibilă cuantificarea absolută *directă* a nivelurilor de peptide restricționate de MHC, de preferință restricționate de HLA, pe cancer sau alte țesuturi infectate, în comparație cu diferite țesuturi necanceroase sau țesuturi neinfectate și organe neinfectate.

În contextul prezentei invenții, „adiționare” se referă la adăugarea unei cantități sau concentrații cunoscute de cel puțin un ligand peptidic MHC cunoscut, de exemplu ligand peptidic MHC nelegat („liber”), pentru a fi cuantificat la un eșantion, cum ar fi, de exemplu, un preparat (denumit aici „adiționare I”) sau un eluat peptidic (denumit aici „adiționare II”). Cantitățile/concentrațiile de peptidă (peptide) care trebuie adăugate pot fi ușor ajustate și depind, cel puțin parțial, de eșantionul care trebuie adăugat și de metoda utilizată pentru analiză.

Este preferată o metodă în conformitate cu prezenta invenție în care cel puțin un ligand peptidic MHC este selectat dintre o peptidă asociată tumorii (TAA) sau o peptidă asociată bolii (DAA).

În metoda în conformitate cu prezenta invenție în care respectivul eșantion biologic cuprinzând celule este selectat dintr-un eșantion de țesut, un eșantion de sânge, un eșantion de tumoare sau un eșantion de țesut infectat. În contextul prezentei invenții, eșantioanele care sunt derivate direct de la subiecți, de exemplu pacienți, sunt denumite eșantioane „primare”, cum ar fi eșantioanele primare de țesut sau de tumoare, spre deosebire de eșantioanele de linii celulare, cum ar fi, de exemplu, liniile celulare tumorale stabilite. Probele pot fi proaspete sau conservate (de exemplu, congelate sau preparate), atât timp cât sunt adecvate pentru metoda în conformitate cu invenția. De preferat este un eșantion biologic care nu include linii celulare permanente.

Ca exemplu preferat, seturile de peptide HLA din eșantioanele de țesut (primar) congelat prin șoc pot fi obținute prin precipitarea imună din țesuturi solide utilizându-se, de exemplu, anticorpii HLA-A, -B, -C-specific w6/32 sau anticorpii HLA-A*02-specific BB7.2 cuplat cu sefaroză CNBr-activată, urmată de tratament acid și ultrafiltrare. Pentru diferite alele HLA pot fi utilizați alți anticorpi cunoscuți în domeniu, deoarece există, de exemplu, GAP-A3 pentru A*03, B1.23.2 pentru alele B. Există metode corespunzătoare pentru a obține peptide MHC de clasă I pentru alte mamifere care sunt bine cunoscute în domeniu.

Metoda în conformitate cu invenția poate fi utilizată, de asemenea, în contextul bolilor infecțioase, cum ar fi infecțiile virale sau bacteriene, de exemplu febra dengue, Ebola, virusul Marburg, tuberculoza (TB), meningita sau sifilisul; de preferat, metoda este utilizată pe tulpini de organisme infecțioase rezistente la antibiotice, boli autoimune, cum ar fi artrita, infecții parazitare, cum ar fi malaria și alte boli, cum ar fi MS și boala Parkinson, atât timp cât fragmentul vizat este o peptidă legată de MHC de clasă I.

Exemple pentru boli autoimune (inclusiv boli care nu sunt declarate oficial boli autoimune) sunt boala pulmonară obstructivă cronică, spondilita anchilozantă, boala Crohn (unul dintre cele două tipuri de boală intestinală inflamatorie („IBD”) idiopatică), dermatomiozita, diabetul zaharat de tip 1, endometrioza, sindromul Goodpasture, boala Graves, sindromul Guillain-Barre (GBS), boala Hashimoto, hidradenita supurativă, boala Kawasaki, nefropatia IgA, purpura trombocitopenică idiopatică, cistita interstițială, lupusul eritematos, boala mixtă a țesutului conjunctiv, morfeea, miastenia gravă, narcolepsia, neuromiotonia, pemfigus vulgar, anemia pernicioasă, psoriazisul, artrita psoriazică, polimiozita, ciroza biliară primară, policondrita recidivantă, poliartrita reumatoidă, schizofrenia, sclerodermia, sindromul Sjogren, sindromul persoanei rigide, arterita temporală (arterita cu celule gigante), colita ulcerativă (unul dintre cele două tipuri de boală intestinală inflamatorie („IBD”) idiopatică), vasculita, vitiligo și granulomatoza Wegener.

Prezenta invenție nu se limitează la bolile umane, ci poate fi utilizată pentru mamifere, de exemplu vaci, porci, cai, pisici, câini, rozătoare (șobolani, șoareci), capre și alte animale domestice.

Metoda în conformitate cu prezenta invenție cuprinde prepararea celulelor cu, cel puțin parțial, digestie enzimatică a țesuturilor și/sau liză celulară.

Numărul de celule se determină utilizându-se o metodă selectată din numărarea nucleilor celulari, determinarea fotometrică a ADN-ului, determinarea fluorimetrică a ADN-ului (cum ar fi, de exemplu, utilizându-se tehnologia Qubit®) și PCR-ul cantitativ.

5 Preferată este și o metodă în conformitate cu prezenta invenție care cuprinde în plus determinarea cantității de cel puțin un tip de moleculă HLA în prepararea menționată de la pasul a). Determinarea cantității se poate face utilizând metode comune în domeniu, cum ar fi metodele care implică anticorpi specifici, de exemplu într-un ELISA, geluri, sortare celulară și/sau cromatografie.

10 Preferată este și o metodă în conformitate cu prezenta invenție în care cel puțin un complex peptidă-MHC ca adăugat și/sau cel puțin un ligand peptidic MHC ca adăugat sunt marcate și, de preferință, sunt marcate diferențial. Marcatorii respectivi sunt cunoscuți specialiștilor în domeniu și includ marcatori izotopici, marcatori radioactivi și neradioactivi, enzime și alte grupuri de mase preferabil diferite. De preferință, marcarea este specifică pentru peptidele specifice care trebuie cuantificate. Cel mai preferat este un TAA/TUMAP dublu marcat,

15 de exemplu în situații în care sunt necesare două adăunări marcate diferențial în același experiment (vezi exemplele de mai jos).

Este preferată o metodă în conformitate cu prezenta invenție în care izolarea cuprinde cromatografie, cum ar fi cromatografia de afinitate. Astfel, liganzii MHC/HLA izolați pot fi separați în funcție de hidrofobia lor prin cromatografie în fază inversă (de exemplu, sistemul nanoAcquity UPLC, Waters) urmată de detectarea într-un spectrometru de masă hibrid Orbitrap (ThermoElectron). Fiecare eșantion se analizează, de preferință, prin achiziție de rulări LCMS

20 replicate (de exemplu). Datele LCMS se procesează apoi prin analiza datelor Tandem-MS (MS/MS).

Spectrele tandem-MS înregistrate într-un mod țintit, concentrându-se pe valorile m/z ale peptidelor care urmează a fi cuantificate, se evaluează, de preferință, de un software care extrage intensitățile ionilor fragmentari preselectați ai tranzițiilor predefinite. Un exemplu de astfel de software este 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>), o aplicație pentru analiza datelor de

25 spectrometrie de masă ale experimentelor de achiziție independentă de date (DIA) pentru monitorizarea reacțiilor paralele (MS/MS țintit PRM). Acest software poate fi utilizat în ceea ce privește peptida marcată cu izotop coeluant în scopuri de specificitate, precum și pentru a extrage intensitățile de tranziție unice pentru procesare ulterioară.

Comparabilitatea grupelor peptidice restricționate la aceeași alelă HLA între eșantioane diferite este posibilă pe baza unui anticorp alelă-specific comun utilizat pentru purificare, dacă este disponibil, sau, alternativ, pe baza atribuirii de secvențe alelelor HLA comune prin intermediul modelelor de aminoacizi ancoră.

35

Din motive statistice, este preferată o metodă în conformitate cu prezenta invenție în care se efectuează cel puțin două rulări de spectrometrie de masă replicate pentru fiecare cel puțin o peptidă ligand MHC.

40

Astfel, încă un alt aspect al prezentei invenții se referă la o metodă în conformitate cu prezenta invenție care cuprinde în plus selectarea de liganzi peptidici MHC suprareprezențați, supraexprimați și/sau specifici tumorii pentru analiză.

Încă un alt aspect al prezentei invenții se referă la o metodă în conformitate cu prezenta invenție în care metoda menționată este capabilă de a fi realizată sau este realizată pe o bază de randament ridicat, de preferință analizarea în paralel a 50 până la 100 de liganzi peptidici.

45

Intr-o altă concretizare preferată a metodei în conformitate cu prezenta invenție, pașii metodei menționate se efectuează în ordinea indicată în revendicările anexate sau ca mai sus. Într-o altă concretizare preferată a metodei în conformitate cu prezenta invenție, respectiva metodă constă din pașii indicați mai sus și aici.

50

Intr-o altă concretizare preferată a metodei în conformitate cu prezenta invenție, respectiva metodă se referă la terapia și diagnosticul personalizate. Pentru aceasta, eșantionul (eșantioanele) analizate este (sunt) derivat(e) de la un individ sau dintr-un grup de indivizi care suferă de aceeași afecțiune descrisă aici. De asemenea, se poate genera un profil de ligand MHC personalizat, de preferință un profil de ligand MHC cuantificat personalizat specific bolii, pe baza liganzilor peptidici MHC menționați cuantificați pe baza metodei în conformitate cu prezenta invenție, așa cum este descrisă aici.

55

Cel mai preferabil, metoda în conformitate cu prezenta invenții se realizează *in vitro*.

Este descrisă o metodă care cuprinde în plus etapa de sintetizare, de preferință sintetizare chimică, a respectivului ligand peptidic MHC cuantificat, prin metoda menționată, pe un sintetizator sau manual. Este descrisă o metodă pentru prepararea unei peptide imunoreactive cu

60

care o peptidă este cuantificată conform metodei descrise și peptida menționată este sintetizată chimic *in vitro* sau *in vivo*. Peptidele pot fi preparate prin legare chimică a aminoacizilor prin metode standard cunoscute în domeniu.

5 Peptidele pot fi preparate *in vitro*, de exemplu în sisteme fără celule, și *in vivo*, utilizându-se celule. Peptidele pot fi formulate conform descrierii din, de exemplu, EP2111867 (Lewandrowski et al.).

10 Este descrisă o metodă în care se efectuează un pas suplimentar, în care se detectează prezența limfocitelor T. Folosind această metodă, este posibil să se detecteze în mod specific în ce măsură limfocitele T ținute către peptidele izolate și identificate sunt preexistente la pacienți. Prin efectuarea acestui pas este posibil să se aplice sub formă de vaccin numai acele peptide împotriva cărora limfocitele T sunt deja preexistente la pacienți. Peptidele pot fi apoi utilizate pentru a activa aceste limfocite T specifice.

15 Este descrisă o metodă în care detectarea limfocitelor T preexistente specifice se realizează prin marcarea leucocitelor cu complexe reconstituite de molecule prezentatoare de antigen și peptida antigenică.

Este descrisă o metodă în care metoda menționată exclude, în plus, utilizarea de celule, linii celulare sau celule animale knock-out.

20 Este descris un control automat al calității bazat pe molecule adiționale în eșantioane în cantități definite.

Cu metoda descrisă, este posibil, de asemenea, să se identifice peptidele specifice pacientului, adică este posibil să se potrivească cu precizie peptidele care urmează a fi utilizate ca vaccin la pacient pentru a induce un răspuns imun specific.

25 În prezenta descriere, invenția este descrisă folosindu-se ca exemplu cancerul. Cu toate acestea, metoda inventivă se poate aplica și pentru boli infecțioase, boli autoimune și infecții parazitare, atât timp cât răspunsul imun respectiv implică MHC de clasă I.

Invenția va fi descrisă în continuare în exemplele următoare, fără a se limita, totuși, la acestea. În figurile însoțitoare și lista de secvențe, Figura 1 prezintă o imagine de ansamblu schematică asupra abordării experimentale în conformitate cu prezenta invenție.

30 Figura 2 arată o analiză MS comparativă a unui amestec TUMAP cu 10 fmol per TUMAP din Tabelul 1. Fiecare peptidă are ca rezultat un semnal MS diferit care arată detectabilitatea dependentă de peptidă. Peptida 5 nu este enumerată în Tabelul 1, adică secvențele 1–4 din Tabelul 1 corespund cu numerele 1–4 din Figura 2, iar secvențele 5–11 din Tabelul 1 corespund cu numerele 6–12 din Figura 2.

35 Mai mult, peptidele 19, 21 și 22 din Figura 2 nu sunt enumerate în Tabelul 2, adică secvențele 13–18 din Figura 2 corespund cu numerele 12–17 din Tabelul 2, secvența 20 din Figura 2 corespunde cu numărul 18 din Tabelul 2, iar secvențele 23–28 din Figura 2 corespund cu numerele 19–24 din Tabelul 2.

40 Figura 3 arată principiul metodei standard interne. Este generată o curbă de calibrare prin titrarea unei versiuni marcate cu izotop (reprezentată cu gri deschis) a TUMAP. Pentru toate măsurătorile MS, o cantitate constantă de altă versiune marcată cu izotop a peptidei standard interne TUMAP (reprezentată cu gri închis) este adiționată în eșantioanele MS. Este calculată o funcție de curbă de calibrare din raportul semnalelor MS prin regresie logistică. LLOQ este definit prin examinare vizuală și luând în considerare abaterea de la liniaritate. „Eșantioanele de cuantificare” (reprezentate cu verde) reprezintă intensitățile semnalului măsurate în eșantioane tumorale selectate pentru cuantificarea absolută a numerelor de TUMAP.

45 Figura 4 arată curbe de calibrare ale TUMAP-urilor HLA-A*02 selectate pentru cuantificare absolută. Rezultatele SM ale TUMAP-urilor respective în eșantioanele de țesut tumoral utilizate pentru analiza numerelor absolute de TUMAP-uri per celulă („eșantioane de cuantificare”) sunt incluse în fiecare diagramă.

50 Figura 5 arată curbe suplimentare de calibrare ale TUMAP-urilor HLA-A*02 selectate pentru cuantificare absolută. Rezultatele SM ale TUMAP-urilor respective în eșantioanele de țesut tumoral utilizate pentru analiza numerelor absolute de TUMAP per celulă („eșantioane de cuantificare”) sunt incluse în fiecare diagramă.

55 Figura 6 arată curbe de calibrare ale TUMAP-urilor HLA-A*24 selectate pentru cuantificare absolută. Rezultatele SM ale TUMAP-urilor respective în eșantioanele de țesut tumoral utilizate pentru analiza numerelor absolute de TUMAP per celulă („eșantioane de cuantificare”) sunt incluse în fiecare diagramă.

60 Figura 7 arată curbe suplimentare de calibrare ale TUMAP-urilor HLA-A*24 selectate pentru cuantificare absolută. Rezultatele SM ale TUMAP-urilor respective în eșantioanele de țesut

tumoral utilizate pentru analiza numerelor absolute de TUMAP per celulă („eșantioane de cuantificare”) sunt incluse în fiecare diagramă.

Figura 8 arată variația estimată a măsurătorilor MS replicate pentru toate TUMAP-urile analizate. Fiecare punct reprezintă coeficientul de variație (CV în %) pentru măsurătorile MS replicate pentru un TUMAP individual într-un eșantion de țesut specific. Mediana valorilor CV pentru toate TUMAP-urile este considerată o variație medie a măsurătorilor MS replicate.

Figura 9 arată eficiența izolării pentru peptide-MHC. Eficiența izolării pentru peptide-MHC a fost determinată în opt eșantioane A*02-pozitive pentru TUMAP-uri A*02 (A) și în șase eșantioane A*24-pozitive pentru TUMAP-uri A*24 (B). Eficiența izolării variază în medie cu 24% pentru TUMAP-urile A*02 și, respectiv, cu 32% pentru TUMAP-urile A*24 (C).

Figura 10 prezintă metodele de evaluare a analizei conținutului de ADN. A. Comparatie a trei metode diferite pentru interpolarea unui număr de celule dintr-o anumită cantitate de ADN: folosind o curbă standard pregătită din linii celulare tumorale (gri închis), din PBMC de la donatori sănătoși (gri) și folosind greutatea teoretică a unui genom diploid uman (gri deschis). Replicile biologice, adică preparate de lizate tisulare independente din diferite părți ale aceleiași tumori, sunt evidențiate cu gri. B. Diagrama curbei standard PBMC, care a fost utilizată pentru a determina numărul total de celule ale eșantionelor de țesut analizate în cuantificarea absolută a TUMAP-urilor.

Figura 11 arată determinarea numărului de celule din eșantioane de țesut solide, congelate. Analiza numărului de celule a eșantionelor tumorale A*02-pozitive și A*24-pozitive (A) și variația estimată a analizei numărului de celule (B). Replicile biologice sunt evidențiate cu gri.

Figura 12 arată rezultate pentru copii peptidice per celulă pentru TUMAP-uri HLA-A*02. Au fost analizate opt tumori de GC (cancer gastric) diferite, trei dintre ele în duplicate (duplicatele biologice sunt grupate și evidențiate cu gri). LLOQ se referă la intervalul de cuantificare într-un experiment MS și este extrapolat la un LLOQ specific eșantionului și specific TUMAP, adică cel mai mic număr de copii cuantificabil într-un eșantion specific pentru un TUMAP specific (descriș cu gri).

Figura 13 arată rezultate suplimentare pentru copii peptidice per celulă pentru TUMAP-uri HLA-A*02. Au fost analizate opt tumori de cancer gastric diferite, trei dintre ele în duplicate (duplicatele biologice sunt grupate și evidențiate cu gri). LLOQ se referă la intervalul de cuantificare într-un experiment MS și este extrapolat la un LLOQ specific eșantionului și specific TUMAP, adică cel mai mic număr de copii cuantificabil într-un eșantion specific pentru un TUMAP specific (descriș cu gri).

Figura 14 arată rezultate pentru copii peptidice per celulă pentru TUMAP-uri HLA-A*24. Au fost analizate șase tumori de cancer gastric diferite, trei dintre ele în duplicate (duplicatele biologice sunt grupate și evidențiate cu gri). LLOQ se referă la intervalul de cuantificare într-un experiment MS și este extrapolat la un LLOQ specific eșantionului și specific TUMAP, adică cel mai mic număr de copii cuantificabil într-un eșantion specific pentru un TUMAP specific (descriș cu gri).

Figura 15 arată rezultate suplimentare pentru copii peptidice per celulă pentru TUMAP-uri HLA-A*24. Au fost analizate șase tumori de cancer gastric diferite, trei dintre ele în duplicate (duplicatele biologice sunt grupate și evidențiate cu gri). LLOQ se referă la intervalul de cuantificare într-un experiment MS și este extrapolat la un LLOQ specific eșantionului și specific TUMAP, adică cel mai mic număr de copii cuantificabil într-un eșantion specific pentru un TUMAP specific (descriș cu gri).

Figura 16 arată testarea unei influențe a adăugării probelor folosindu-se 500 fmol de peptide libere în preparatul de monomer MHC/peptidă. Peptida liberă din analiză nu are o influență substanțială pentru peptidele indicate.

Figura 17 arată rezultatele testelor pentru reproductibilitatea izolării ADN-ului utilizandu-se Qubit HS (fluorescență) în raport cu o curbă standard. Eșantioanele (eșantioane de cancer, cum ar fi NSCLC (cancer pulmonar non-microcelular)) arată omogenitate suficientă. ADN-ul a fost izolat din părți alicote de 3 x 50 µl.

SEQ ID NO 1–24 prezintă peptidele din Tabelul 1 și Tabelul 2 care au fost selectate pentru cuantificare absolută conform exemplor.

Exemple:

Următoarele exemple descriu metoda inventivă în contextul TAA-uri/cancer. Invenția nu se limitează la exemple, deoarece acestea sunt doar o variantă concretizată a invenției.

Tabelul 1: TUMAP-uri HLA-A*02 selectate pentru cuantificare absolută
 Au fost selectate unsprezece peptide pentru cuantificare absolută.

Nr.	Cod peptidă	Secvență
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	ILIDWLQVQV

Tabelul 2: TUMAP-uri HLA-A*24 selectate pentru cuantificare absolută

- 5 Au fost selectate paisprezece peptide pentru cuantificare absolută. Proprietățile unei peptide (PLK4-001) s-au dovedit a fi inadecvate pentru alte experimente. Pentru restul de 13 peptide au fost finalizat experimente de cuantificare absolută.

Nr.	Cod peptidă	Secvență
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

- 10 Cuantificarea copiilor de TUMAP per celulă în eșantioane tumorale solide necesită (sub)cuantificarea

- a) TUMAP-ului izolat,
- b) pierderea TUMAP-ului în timpul izolării și
- c) numărul de celule din eșantionul de țesut analizat.

O imagine de ansamblu a abordării experimentale în conformitate cu prezenta invenție este dată în Figura 1.

Cuantificarea peptidelor prin nanoLC-MS/MS

Pentru o cuantificare precisă a peptidelor prin spectrometrie de masă (MS), sunt necesare mai întâi cunoștințele de bază despre corelația specifică peptidelor dintre cantitatea de peptide și semnalul MS. De exemplu, măsurarea prin MS a unui amestec de peptide cu 10 fmol per peptidă arată că există diferențe mari specifice peptidelor în semnalul MS (Figura 2). Acest lucru implică, de asemenea, că intervalul în care o peptidă poate fi cuantificată în mod fiabil prin MS depinde de caracteristicile individuale ale peptidei.

În plus, o corelație liniară între cantitatea unei peptide specifice și semnalul MS poate fi de așteptat numai într-un anumit interval. Prin urmare, inventatorii au decis să determine o curbă de calibrare individuală pentru fiecare peptidă. Intervalul fiecărei curbe de calibrare a fost selectat pentru a reflecta nu numai intervalul individual de cuantificare al peptidei, ci și intervalul de semnale MS pentru fiecare peptidă din eșantioanele tumorale analizate anterior. Scopul a fost ca fiecare curbă de calibrare să cuprindă intervalul de semnal MS specific peptidei de cel puțin 80% din eșantioanele noastre de rutină.

Generarea curbelor de calibrare exacte necesită un standard sintetic, care trebuie cuantificat cu o metodă independentă și are aceleași caracteristici ca și TUMAP-ul natural. Inventatorii au folosit versiuni marcate dublu cu izotop ale TUMAP-ului, adică au fost incluși doi aminoacizi marcați cu izotop în timpul sintezei TUMAP-ului. Versiunile marcate dublu pot fi distinse de TUMAP-ul natural printr-o diferență de masă de 12–18 Dalton în funcție de aminoacidul marcat. În afară de masă, marcarea cu izotop nu modifică proprietățile peptidei în MS, adică peptidele cu același rezultat de secvență, însă cu marcaje cu izotop diferite duc la aceleași intensități ale semnalului MS (Anderson et al., 2012). După sinteză, TUMAP-urile marcate dublu au fost cuantificate cu precizie prin analiza azotului pentru a permite o corelație exactă între cantitatea de peptide și semnalul MS.

Curbele de calibrare au fost preparate în cel puțin trei matrice diferite, adică peptida HLA eluează din probe naturale similare cu probele pentru MS de rutină și fiecare preparat a fost măsurat rulări de MS duplicate. Pentru a compensa eventualele variații tehnice între ciclurile de MS, a fost inclusă o peptidă standard internă în toate măsurătorile. Raportul semnalelor MS ale peptidei titrate la standardul intern fix a fost reprezentat grafic, iar curba de calibrare a fost calculată prin regresie logistică (Figura 3). Limita inferioară de cuantificare (LLOQ) a fost determinată vizual luându-se în considerare abaterea de la liniaritate. Dacă abaterea de la liniaritate nu a fost evidentă, cum ar fi pentru peptida FAP-003 (Figura 4), pentru calcularea LLOQ a fost utilizat raportul mediu al celei mai mici cantități de peptide. Limita superioară de cuantificare, adică abaterea de la liniaritate la concentrații mai mari, nu a fost atinsă pentru nicio curbă de calibrare.

În experimentele de cuantificare propriu-zise, s-a adăugat aceeași cantitate din standardul intern la fiecare probă ca pentru generarea curbei de calibrare și s-a calculat raportul dintre peptida naturală și peptida standard internă. Această „metodă standard internă” este o metodă comună în cuantificarea proteinelor bazată pe MS, de exemplu pentru analiza biomarkerilor în eșantioane biologice (Sturm et al., 2012; Prasad și Unadkat, 2014; Sato et al., 2012). Curbele de calibrare și valorile măsurate în eșantioanele tumorale reale sunt arătate în Figura 4 și Figura 5 pentru HLA-A*02 și în Figura 6 și Figura 7 pentru HLA-A*24 pentru toate TUMAP-urile selectate pentru cuantificare absolută.

Pentru a se estima variația măsurătorilor cantitative prin MS, a fost calculat coeficientul de variație (CV în %) al conținutului de peptide pentru fiecare eșantion de MS. CV-urile per eșantion de MS au fost reprezentate grafic și variația generală a măsurătorilor prin MS a fost estimată ca CV median (Figura 8).

Eficacitatea izolării peptidelor/MHC-urilor

În ceea ce privește orice proces de purificare a proteinelor, izolarea proteinelor din probe de țesut este asociată cu o anumită pierdere a proteinei de interes. Pentru a determina eficiența izolării TUMAP-urilor, complexe peptidă-MHC au fost generate pentru toate TUMAP-urile selectate pentru cuantificare absolută. Pentru a putea discrimina complexe peptidă-MHC naturale de cele adăugate, s-au utilizat versiuni de TUMAP-uri marcate cu un singur izotop, adică în timpul sintezei TUMAP-urilor a fost introdus un aminoacid marcat cu izotop. Aceste complexe au fost adăugate în lizate de țesut proaspăt preparate, adică în cel mai timpuriu punct posibil al procedurii de izolare a TUMAP-urilor, și apoi au fost capturate precum

complexele peptidă-MHC naturale în următoarea purificare de afinitate. Prin urmare, măsurarea recuperării TUMAP-urilor marcate cu un singur izotop permite concluzii cu privire la eficiența izolării TUMAP-urilor naturale individuale.

5 Eficiența izolării a fost determinată în 13 eșantioane care au fost selectate pentru
 cuantificarea absolută a TUMAP-urilor (7 HLA-A*02-pozitive, 5 HLA-A*24-pozitive și 1 HLA-
 A*02/A*24 dublu-pozitiv). Pentru eficiența izolării au fost analizate opt eșantioane A*02-pozitive
 pentru TUMAP-uri A*02 și șase eșantioane A*24-pozitive pentru TUMAP-uri A*24 (Figura 9 A,
 B). Rezultatele sugerează că, pentru majoritatea peptidelor, eficiența izolării este comparabilă între
 10 diferite eșantioane de țesut. În schimb, eficiența izolării diferă între peptidele individuale. Acest
 lucru sugerează că eficiența izolării, deși este determinată doar la un număr limitat de probe de
 țesut, poate fi extrapolată la orice alt preparat tisular. Cu toate acestea, este necesar să se analizeze
 fiecare TUMAP individual, deoarece eficiența izolării nu poate fi extrapolată de la o peptidă la
 altele.

15 În câteva cazuri, eficiența izolării este nerealist de mare și/sau variază puternic, de
 exemplu pentru peptida NCAPG-001 (Figura 9 A). În cazurile în care eficiența nu a putut fi
 determinată, de exemplu din cauza dificultăților de cuantificare dependente de peptide (de
 exemplu, un nivel ridicat de LLOQ pentru peptidele CCNB1-002, ASPM-001) sau a fost calculată
 o eficiență mai mare de 100%, inventatorii au presupus o eficiență de izolare de 100%. Aceasta
 este o abordare conservatoare care, cel mai probabil, supraestimează eficiența izolării și, prin
 20 urmare, duce în cele din urmă la o subestimare a copiilor peptidice per celulă.

Pentru a estima variația eficienței izolării TUMAP-urilor, a fost reprezentat grafic
 coeficientul de variație (CV în %) pentru izolarea TUMAP-urilor individuale din 6–8 eșantioane
 (Figura 9 C). În ansamblu, variația medie pentru TUMAP-urile A*02 este de 24%, iar pentru
 TUMAP-urile A*24 de 32%.

25 Determinarea numărului de celule în țesut solid, congelat

Un alt factor critic pentru calcularea numărului de copii peptidice per celulă este
 estimarea numărului total de celule din eșantioanele de țesut utilizate pentru izolarea TUMAP-
 urilor. Inventatorii au decis să utilizeze analiza conținutului de ADN, deoarece această metodă este
 aplicabilă unei game largi de eșantioane de origine diferită și, cel mai important, de eșantioane
 30 congelate (Forsey și Chaudhuri, 2009; Alcoser et al., 2011; Alcoser et al., 2011; Silva et al., 2013).

Având în vedere eterogenitatea intratumorală, este necesar să se determine numărul de
 celule dintr-o fracțiune de țesut care este reprezentativă pentru eșantionul complet de țesut utilizat
 pentru izolarea TUMAP-urilor. Lizatul tisular preparat în timpul izolării TUMAP-urilor este un
 eșantion adecvat pentru analiza ADN-ului, deoarece este mai omogen în comparație cu o fracțiune
 35 din țesutul solid. După izolarea ADN-ului, concentrația totală de ADN a fost cuantificată într-un
 test pe bază de fluorescență (Life Technologies, Qubit HS DNA Assay) și a fost calculat conținutul
 total de ADN al eșantioanelor.

Pentru calcularea numerelor de celule dintr-o anumită cantitate de ADN, inventatorii au
 luat în considerare două metode diferite: În primul rând, numărul de celule poate fi calculat
 40 utilizându-se masa teoretică a unui genom uman, care a fost estimată a fi de aproximativ 6,67 pg
 de ADN per genom diploid. (Alcoser et al., 2011; Konigshoff et al., 2003). Alternativ, eșantioanele
 cu număr de celule cunoscut pot fi utilizate pentru pregătirea unei curbe standard de ADN cu
 aceleași metode ca cele utilizate pentru eșantioanele de țesut. Această metodă compensează deja
 orice impact al procedurii de izolare și cuantificare a ADN-ului, îmbunătățind astfel precizia
 45 rezultatelor noastre. Inventatorii au pregătit două curbe standard diferite, una din șapte linii
 celulare tumorale diferite și cealaltă din celule mononucleare din sânge periferic (PBMC) de la
 șase donatori sănătoși.

Pentru a compara toate cele trei metode de evaluare (masa teoretică a ADN-ului și două
 curbe standard bazate pe celule diferite), a fost calculat numărul de celule per 1 g de țesut pentru
 50 mai multe eșantioane (Figura 10 A). Calculele folosind standardul liniei celulare au ca rezultat un
 număr de celule substanțial mai mic (subestimare de maxim 3,6 ori) în comparație cu utilizarea
 standardului PBMC. Acest lucru era de așteptat având în vedere că liniile celulare tumorale tind să
 aibă porțiuni mai mari de celule aneuploide, cu un conținut mai mare de ADN în comparație cu
 PBMC-urile diploide sănătoase. În literatura de specialitate, proporția tumorilor gastrice diploide
 55 variază de la 25% la 67%, în funcție de studiu (Hiyama et al., 1995; Tamura et al., 1991; Wiksten
 et al., 2008; Zhang et al., 2005; Sugai et al., 2005). Deoarece ploidia și fracțiunea de celule
 aneuploide din eșantioanele de țesut sunt necunoscute, ambele curbe standard pot furniza doar o
 estimare a numărului real de celule, însă nu iau în considerare toate proprietățile unui eșantion
 individual de țesut. O altă sursă de variație este starea de proliferare necunoscută a eșantionului de
 60 țesut sau prezența celulelor necrotice. În special, dublarea conținutului de ADN în celulele
 proliferante crește cantitatea de ADN în raport cu numărul de celule și, astfel, va influența calculul

numărului de celule. În două eșantioane de țesut gastric normal, inventatorii au calculat, cu toate cele trei abordări, un număr mai mic de celule per 1 g de țesut în comparație cu probele tumorale.

Ca abordare conservatoare, inventatorii au decis să utilizeze curba standard PBMC (Figura 10 B), care poate duce la o supraestimare a numărului de celule din porțiunea de eșantioane de țesut hiperdiploide, ducând la o subestimare a copiilor peptidice per celulă în astfel de eșantioane, însă nu ar trebui niciodată să supraestimeze copii peptidice per celulă din niciun eșantion.

Pentru analiza probelor de țesut selectate pentru cuantificarea absolută a TUMAP-urilor, inventatorii au izolat ADN din 2–3 părți alicote de lizat de țesut și fiecare preparat de ADN a fost cuantificat în 2–3 replici în testul pe bază de fluorescență. Numărul total de celule și numărul de celule per 1 g de țesut au fost calculate din conținutul total de ADN utilizându-se curba standard PBMC (Figura 11 A). Pentru a obține o estimare a variației globale a analizei numărului de celule, coeficientul de variație (%) a fost determinat mai întâi la nivelul fiecărui eșantion sau, dacă a fost disponibilă, la nivelul fiecărei replici biologice (adică preparate de lizat tisular independente din diferite bucăți ale aceleiași tumori). Acest calcul a luat în considerare variația dintre părțile alicote de lizat tisular, precum și măsurătorile replicate în testul de fluorescență. Acești coeficienți CV sunt arătați în Figura 11 B, iar variația generală a fost determinată ca mediană a coeficienților CV descriși. Variabilitatea poate fi parțial explicată prin faptul că lizatele tisulare nu sunt complet omogenizate, adică particulele de țesut rămase care conțin celule nedisociate conduc la un număr mai mare de celule pentru replicile individuale de izolare (vezi, de exemplu, GC816T în Figura 11 A).

Copii de peptide per celulă

Cu date pentru cuantificarea peptidelor în rulări nanoLC-MS/MS („peptidă totală”), eficiența izolării TUMAP-urilor („% de eficiență a izolării”) și numărul de celule din fiecare eșantion tumoral disponibil, este posibil să se calculeze numărul de copii TUMAP per celulă conform următoarei formule:

Cantitatea de peptidă totală se calculează din rezultatul a 2–4 experimente nanoLC-MS/MS („peptidă/rulare [fmol]”) utilizându-se curbele de calibrare prezentate în Figurile 4–7.

$$\text{total peptide} = \left(\frac{\text{peptide}}{\text{run}} [\text{fmol}] \right) \times \frac{6.022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{mol}}{\text{mol}} \right)}{10^{15} \left(\frac{\text{fmol}}{\text{mol}} \right)} \times \frac{\text{peptide eluate} [\mu\text{L}]}{\text{MS sample per run} [\mu\text{L}]} \times \frac{100\%}{\% \text{ of lysate used for TUMAP isolation}} \quad (2)$$

total peptide

peptide

run

fmol

mol

peptide eluate

μL

MS sample per run

% of lysate used for TUMAP isolation

peptidă totală

peptidă

rulare

fmol

mol

eluat peptidic

μL

eșantion MS per rulare

% de lizat utilizat pentru izolarea TUMAP-urilor

Doar măsurătorile MS peste LLOQ, definite prin utilizarea curbelor de calibrare, sunt utilizate pentru calcularea numerelor absolute de copii peptidice. Acest LLOQ se referă la cantitatea de TUMAP-uri într-un experiment nanoLC-MS/MS („LLOQ/rulare [fmol]”).

Numărul de copii per celulă pentru toate peptidele, care ar putea fi cuantificate, variază de la 50 la 30000 de copii per celulă (vezi Tabelul 3).

Tabelul 3: Privire de ansamblu asupra numerelor de copii per celulă pentru TUMAP-uri HLA-A*02 și HLA-A*24

TUMAP-urile HLA-A*02 au fost analizate în opt eșantioane și TUMAP-urile HLA-A*24 în șase eșantioane; nq = necuantificat deoarece cantitatea de peptide a fost sub LLOQ

HLA-Alelă	Cod peptidă	Cuantificat în n eşantioane (% de eşantioane analizate)	Copii per celulă (interval de eşantioane individuale şi replici biologice)
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

Pentru a vizualiza LLOQ în contextul „copiilor peptidice per celulă”, s-a calculat „LLOQ per celulă” pentru fiecare TUMAP din fiecare eşantion folosindu-se cele două formule prezentate mai sus. Deoarece eşantioanele diferă în numărul total de celule, LLOQ per celulă este diferit pentru fiecare eşantion (vezi Figura 12 şi Figura 13 pentru TUMAP-uri A*02 şi Figura 14 şi Figura 15 pentru TUMAP-uri A*24).

5

Estimarea erorii în cuantificarea absolută a TUMAP-urilor

Pentru a estima variaţia cuantificării absolute a TUMAP-urilor, inventatorii au luat în considerare variaţia relativă a celor trei rezultate experimentale majore, aşa cum s-a descris mai sus:

10

- cantitatea de TUMAP-uri izolate: abatere relativă de 1,8% (A*02) şi de 2,1% (A*24)
- eficienţa izolării TUMAP-urilor: abatere relativă de 24% (A*02) şi de 32% (A*24)
- numărul de celule din eşantionul de ţesut: abatere relativă de 27%

Presupunand distribuția normală a valorilor variabilei, eroarea relativă (σ) a „copiilor per celulă” poate fi calculată ca rădăcina pătrată a sumei erorii relative pătrate a fiecărei variabile:

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

copies

total cell count

total peptide

isolation efficiency

copii

total celule

peptidă totală

eficiență izolare

- 5 Cu valorile date mai sus, coeficientul de variație pentru numărul absolut de copii peptidice per celulă este de aproximativ 36% pentru peptidele HLA-A*02 și 42% pentru peptidele HLA-A*24. Pentru a da o impresie asupra variației rezultatelor, s-a calculat eroarea absolută și eroarea relativă a copiilor peptidice per celulă pentru o peptidă model și un eșantion model (Tabelul 4).

- 10 Tabelul 4: Exemplu de calcul al erorii absolute și al erorii relative în cuantificarea absolută a TUMAP-urilor pentru o peptidă model

	valoare	A*02		A*24	
		eroare rel. (%)	eroare abs.	eroare rel. (%)	eroare abs.
Total celule/eșantion	1x10 ⁸	27%	-	27%	-
Total peptide [fmol]	16,25	1,8%	-	2,1%	-
Eficiență a izolării pentru peptidăMHC	10%	24%		32%	
Copii de peptide per celulă	1000	36%	360	42%	420

- 15 Acest calcul model sugerează că, pentru analiza complexă în mai mulți pași a cuantificării absolute, variația rezultatelor este încă într-un interval acceptabil. Pentru TUMAP-uri individuale, eroarea relativă se poate abate de la eroarea medie calculată aici. Numerele de copii de TUMAP-uri per celulă pot fi comparate cantitativ între diferite TUMAP-uri, permițând prioritizarea TUMAP-urilor pentru a alege anticorpii adecvați și/sau țintele solubile ale receptorilor de celule T. Compară între metoda de cuantificare a TUMAP-urilor și metodele publicate cunoscute

- 20 abordare precisă pentru cuantificarea absolută a numerelor de copii peptidice asociate MHC per celulă nu a fost arătată anterior. Cel mai important, metodele publicate anterior pentru cuantificarea peptidelor legate de MHC utilizand analiza MS nu au luat în considerare pierderea antigenului în timpul pregătirii eșantionului (Tan et al., 2011; Hogan et al., 2005). Grupul lui Peter A. von Velen a publicat recent o metodă pentru „cuantificarea exactă a peptidelor legate de MHC” (Hassan et al., 2014). În această notă tehnică, a fost utilizată o abordare pentru a cuantifica doi antigeni de histocompatibilitate minoră, LB-NISCH-1A și LB-SSR1-1S, pe celule EBV-LCL JYpp65. Cu toate acestea, pașii experimentali individuali diferă substanțial, ceea ce este rezumat în
- 25 tabelul de mai jos:

30

35

Tabelul 5: Comparație a metodelor pentru cuantificarea TUMAP-urilor între Hassan et al. și prezenta invenție

	Hassan et al.	prezenta invenție
Curbe de calibrare pentru peptide	Utilizată numai pentru a determina domeniul liniar, presupunând că toate peptidele au aceeași corelație a cantității de peptide cu semnalul MS (panta = 1)	Pentru a determina domeniul liniar, LLOQ și pentru a cuantifica peptidele; ia în considerare corelația, specifică peptidelor, a cantității și semnalului MS pentru fiecare peptidă individuală
Cuantificare a peptidelor	Calibrare într-un punct: raport al semnalului cu peptida standard adăugată	Metoda standard internă, bazată pe curba de calibrare specifică peptidelor, cuantificare a probelor în apropierea LLOQ
Eficiență a izolării	Complexe peptidă-MHC adăugate în lizat după 2 ore de liză și clearance prin centrifugare, ignorându-se pierderea de peptide în acești pași	Complexe peptidă-MHC adăugate direct după omogenizarea țesutului, adică cel mai timpuriu punct în izolarea peptidelor
Eșantioane	Linie celulară	Țesut tumoral solid
Pregătire a eșantionului	Pas suplimentar de cromatografie C18 înainte de nanoLC-MS/MS final, utilizat pentru a reduce complexitatea eșantionului	Utilizare imediată a unui eșantion imunoprecipitat și filtrat pentru nanoLC-MS/MS
Determinare a numărului de celule	Numărare a celulelor în timpul preparării peletelor celulare	Analiză a conținutului de ADN din lizat de țesuturi solide

	Hassan et al.	prezenta invenție
Calculare a erorii	Se ia în considerare numai variația replicărilor MS (CV 0,1%–7,1%), însă nu și variația izolării complexelor peptidă-MHC (26% și, respectiv, 91%) și a numărului de celule.	Se iau în considerare variațiile în replicările MS (CV mediu de 1,8%–2,1%), eficiența izolării complexelor peptidă-MHC (CV mediu de 24%–32%) și determinarea numărului de celule (CV mediu de 27%).

Numerele de copii ale celor două peptide analizate de Hassan et al. a variat de la 800 la 5300 (abatere relativă 74%) și, respectiv, de la 3000 la 12000 (abatere relativă 60%) de copii per celulă între replicile biologice. Motivul acestei variații nu a fost clar discutat, însă se poate datora utilizării unor instrumente de MS diferite.

- 5 În rezumat, se așteaptă ca metoda mai rafinată din prezenta invenție să contribuie la obținerea de rezultate mai precise și mai fiabile.

Cuantificarea peptidelor cu numere mici de copii

- 10 Pentru a arăta puterea metodei inventive, au fost generate datele prezentate în tabelul următor. Au fost identificate peptide care sunt prezente doar în numere foarte mici de copii, printre care se numără peptida PDE11-001. Se poate vedea că metoda permite determinarea a aproximativ 10 copii ale peptidei per celulă.

Tabelul 6: Cuantificarea peptidelor cu numere reduse de copii

PC – cancer de prostată – Secvența PDE11 -001 is ALLESRVNL (SEQ ID NO 25)

Cod peptidă	Copii per celulă			Număr de probe			Sursă/HLA
	Min.	Mediană	Max.	>LLOQ	>LOD	Evalua-bile	
Peptidă 1	20	20	20	1	5	16	NSCLC/A*02
Peptidă 2	10	30	300	13	16	17	NSCLC/A*02
Peptidă 3	10	30	50	4	10	18	NSCLC/A*02
Peptidă 4	10	30	100	17	17	19	NSCLC/A*02
Peptidă 5	20	20	90	7	8	11	NSCLC/A*02
Peptidă 6	10	20	50	6	6	10	NSCLC/A*02
Peptidă 7	<10	30	200	9	12	15	PC/A*02
PDE11-001	<10	10	30	8	9	10	PC/A*02

- 15 PDE11-001 este o peptidă de legare HLA-A*02 derivată din fosfodiesterază 11A (PDE11A), care catalizează hidroliza cAMP și cGMP, reglând astfel căile de semnalizare respective. Mutațiile din PDE11A au fost asociate cu hiperplazie adrenocorticală, precum și cu tumori cu celule germinale testiculare cu istoric familial. Peptida a fost detectată pe eșantioane de cancer de prostată, precum și în carcinom hepatocelular, pancreatic și cu celule renale și nu pe țesuturi normale.

Referințe citate

- 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.
- 5 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.*
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.

LISTARE SECVENȚE

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> METODĂ PENTRU CUANTIFICAREA ABSOLUTĂ A PEPTIDELOR
DE CANCER RESTRICȚIONATE DE HLA PROCESATE NATURAL

<130> I32727WO

<150> US61/097,994

<151> 2014-12-30

<150> GB1423361.3

<151> 2014-12-30

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Leu Ser Ser Ile Lys Val Glu Val
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Leu Leu Ser Tyr Ile Gln Ser Ile

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Leu Asp Gly Phe Val Met Val Leu

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ile Leu Ile Asp Trp Leu Val Gln Val
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Val Tyr Pro Asn Trp Ala Ile Gly Leu
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe
1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe
1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Tyr Leu Trp Ala Thr Val Thr Ile
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ile Tyr Asn Gly Lys Leu Phe Asp Leu Leu
1 5 10

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Phe Tyr Ile Ser Pro Val Asn Lys Leu
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu
1 5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Tyr Tyr Asn Ala Ala Gly Phe Asn Lys Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ala Leu Leu Glu Ser Arg Val Asn Leu
1 5

(56) Referințe bibliografice citate in raportul de documentare:

- HASSAN CHOPIE ET AL: "Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes", JOURNAL OF PROTEOMICS, vol. 109, 19 July 2014 (2014-07-19), pages 240-244, XP029080675, ISSN: 1874-3919, DOI: 10.1016/J.JPROT.2014.07.009 cited in the application & "Materials & Methods", , 19 July 2014 (2014-07-19), XP055253353, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391914003613/1-s2.0-S1874391914003613-mmc1.docx/276834/html/S1874391914003613/591921b7bebb581e481db9e08573089b/mmc1.docx> [retrieved on 2016-02-26] cited in the application
- WO-A1-2011/128448
- SUSANN MULLER ET AL: "Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities", FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, vol. 34, no. 4, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 554-587, XP055253409, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00214.x

(57) Revendicări:

1. O metodă pentru cuantificarea absolută a unui ligand peptidic MHC pe o celulă, metoda menționată cuprinzând

a) pregătirea celulelor care prezintă ligandul peptidic MHC menționat dintr-un eșantion biologic selectat dintr-un eșantion de țesut, un eșantion de sânge, un eșantion tumoral sau un eșantion dintr-un țesut infectat care cuprinde celulele menționate, cuprinzând digestia enzimatică a țesuturilor și/sau liza celulară,

b) determinarea numărului de celule al preparatului menționat la pasul a) cuprinzând numărarea nucleilor celulari, determinarea fotometrică a ADN-ului, determinarea fluorimetrică a ADN-ului sau PCR-ul cantitativ,

c) adăugarea unei cantități cunoscute de ligand peptidic MHC și/sau de complex peptidă-MHC pentru a fi cuantificată la preparatul menționat la pasul a) direct după omogenizarea țesutului („adiționare I”),

d) izolarea ligandului peptidic MHC din preparatul menționat la pasul c) pentru a obține un eluat peptidic,

e) adăugarea unei cantități cunoscute de ligand peptidic MHC pentru a fi cuantificat la eluatul peptidic menționat („adiționare II”) drept calibrant intern,

f) efectuarea unei analize de spectrometrie de masă pe respectivul ligand peptidic MHC pentru a genera aa) un semnal pentru eficiența izolării în pasul d),

bb) un semnal pentru calibrantul intern de la pasul e) și

cc) semnalul pentru respectivul ligand peptidic MHC din respectivele celule preparate la pasul a)

și

g) cuantificarea ligandului peptidic MHC menționat pe baza unei comparări a semnalelor obținute la pasul f) cu

aa) numărul de celule obținut,

bb) cantitatea cunoscută din ligandul peptidic MHC și/sau complexul peptidă-MHC menționat pentru a fi cuantificată ca adăugată la pasul c) și

cc) cantitatea cunoscută de ligand peptidic MHC care trebuie cuantificată așa cum este adăugată în pasul e), în care cuantificarea cuprinde calcularea unui raport între semnalele calibrantului intern din pasul e) și cele ale ligandului peptidic MHC izolat și compararea raportului cu o curbă de calibrare stabilită a ligandului peptidic MHC și

în care cuantificarea mai cuprinde generarea unei curbe de calibrare specifice peptidei pe baza unui raport cu calibrantul intern utilizat la aceeași cantitate și determinarea celui mai scăzut nivel de cuantificare (LLOQ) pentru respectivul ligand peptidic MHC care trebuie cuantificat, prin care o cuantificare absolută a ligandul peptidic MHC pe o celulă este realizată pentru ligandul peptidic MHC în cazul în care cantitatea cuantificată este peste LLOQ, așa cum a fost determinat.

2. Metoda în conformitate cu Revendicarea 1 în care ligandul peptidic MHC menționat este o peptidă asociată tumorii (TAA) sau o peptidă asociată bolii (DAA).

3. Metoda în conformitate cu Revendicarea 1 sau 2 care mai cuprinde determinarea cantității de cel puțin un tip de moleculă HLA în pregătirea de la pasul a).

4. Metoda în conformitate cu oricare dintre Revendicările 1–3, în care complexul peptidă-MHC adăugat și/sau ligandul peptidic MHC adăugat este/sunt marcat(e) și, de preferință, este/sunt marcat(e) diferențial prin izotopi.

5. Metoda în conformitate cu oricare dintre Revendicările 1–4, în care izolarea include cromatografie, cum ar fi cromatografia de afinitate.

6. Metoda în conformitate cu oricare dintre Revendicările 1–5, cuprinzând în plus selectarea liganzilor peptidici MHC supraexpresiați, supraexpresiați și/sau specifici tumorii pentru analiză.

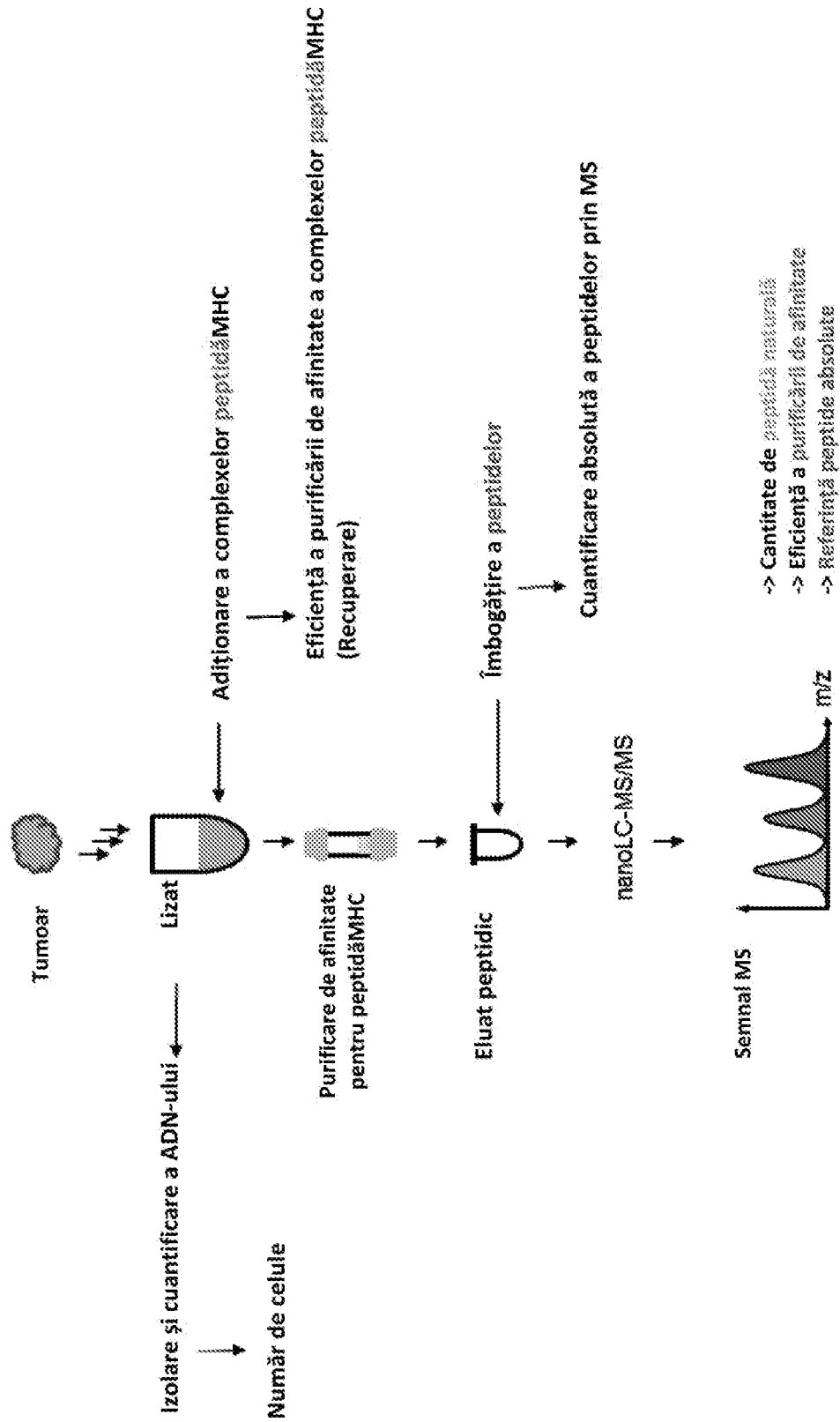
7. Metoda în conformitate cu oricare dintre Revendicările 1–6, în care respectiva metodă este realizată pe o bază de randament ridicat.

8. Metoda în conformitate cu oricare dintre Revendicările 1–7, în care respectiva metodă constă din pași indicați.

9. Metoda în conformitate cu oricare dintre Revendicările 1–8, în care eșantionul (eșantioanele) biologic(e) este/sunt derivate de la un individ sau un grup de indivizi care suferă de aceeași boală.

10. Metoda în conformitate cu Revendicarea 9, cuprinzând în plus pasul de generare a unui profil de ligand MHC personalizat, de preferință un profil de ligand MHC personalizat, specific bolii, pe baza liganzilor peptidici MHC cuantificați menționați.

Figura 1



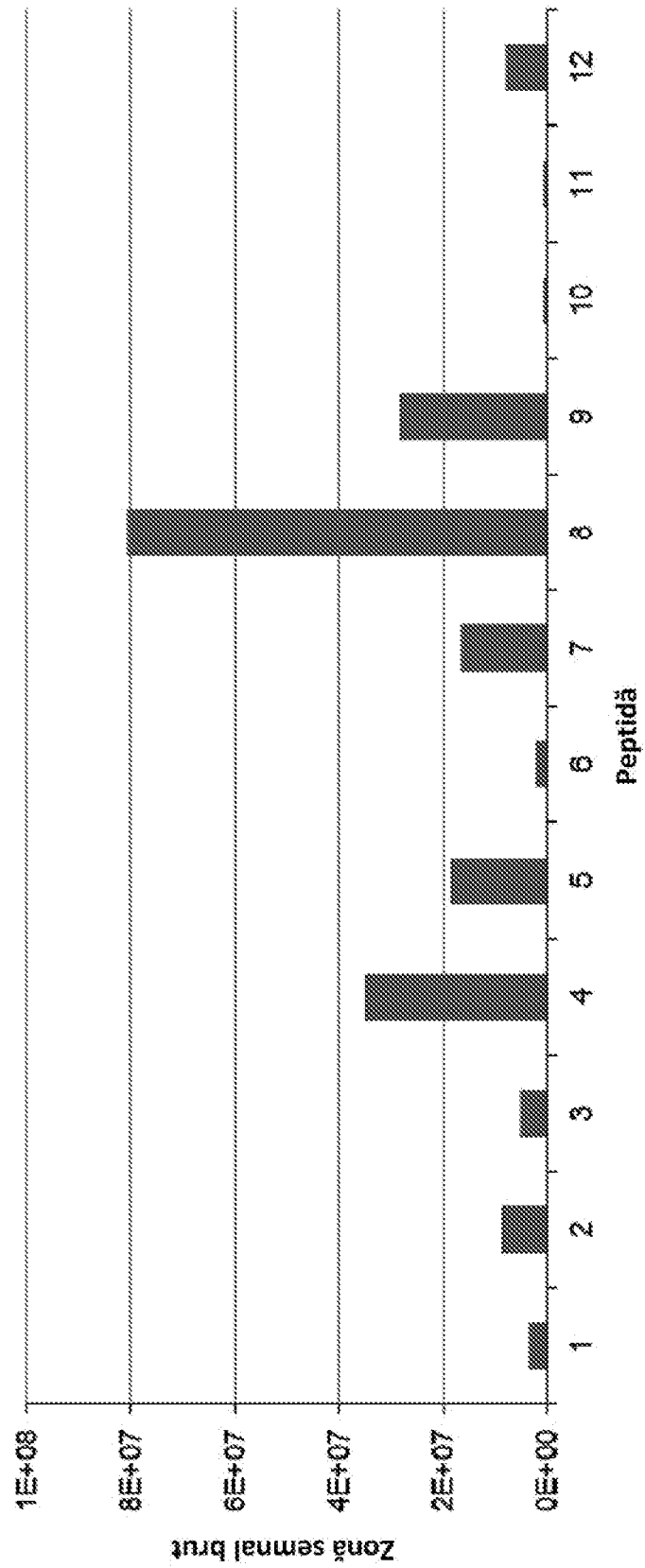


Figura 2

Figura 3

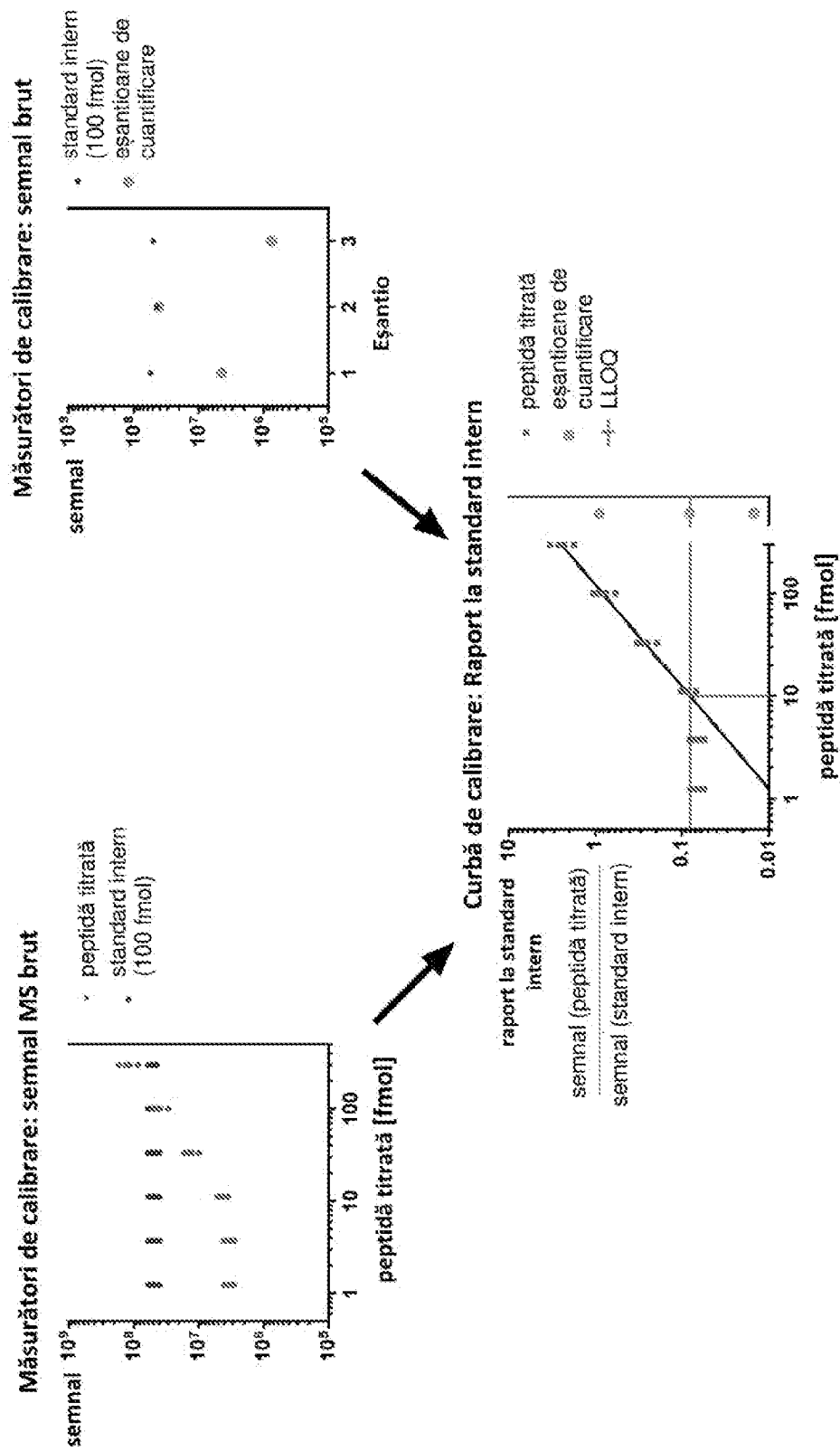


Figura 4

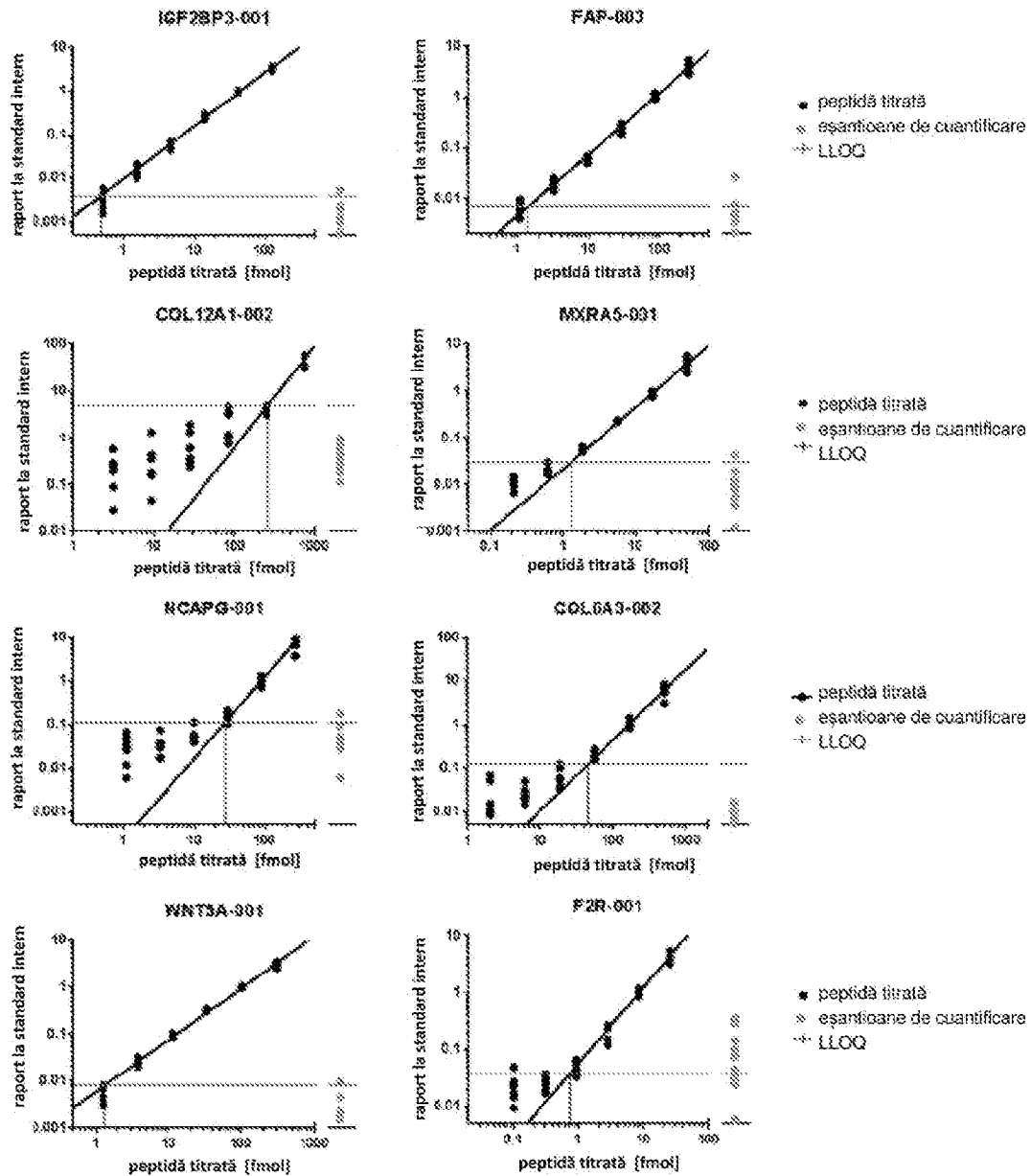


Figura 5

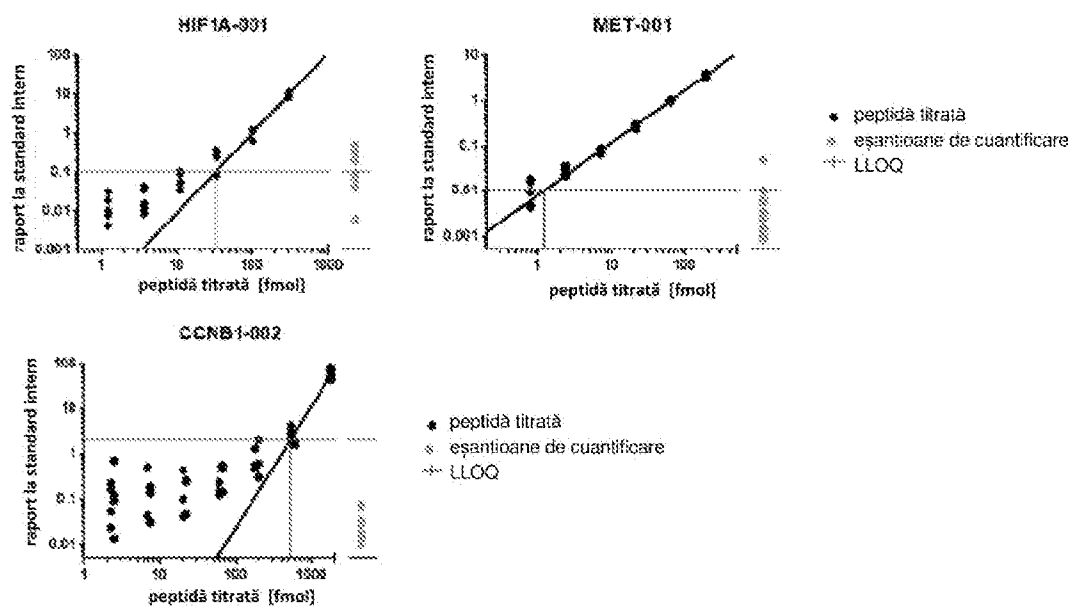


Figura 6

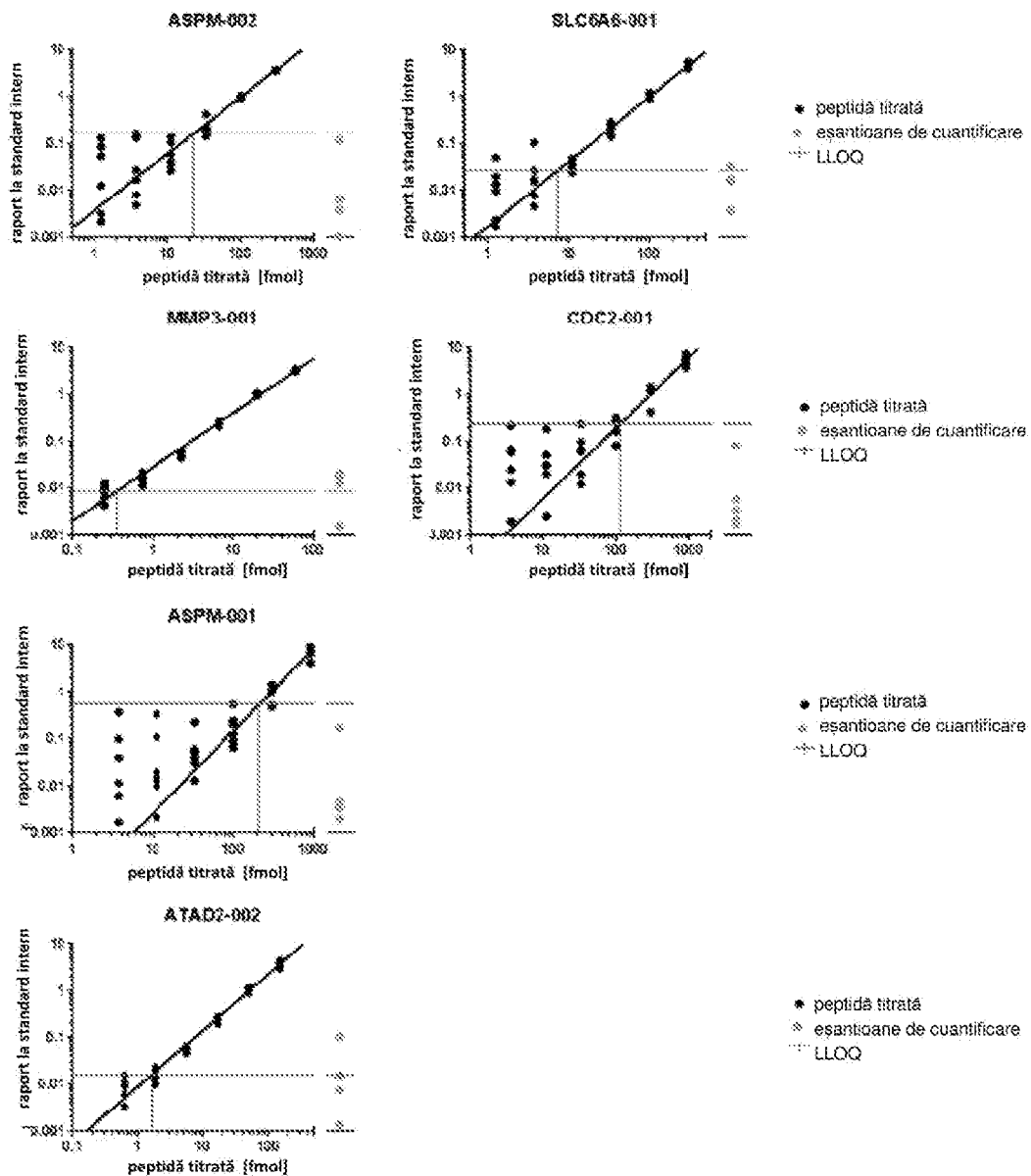


Figura 7

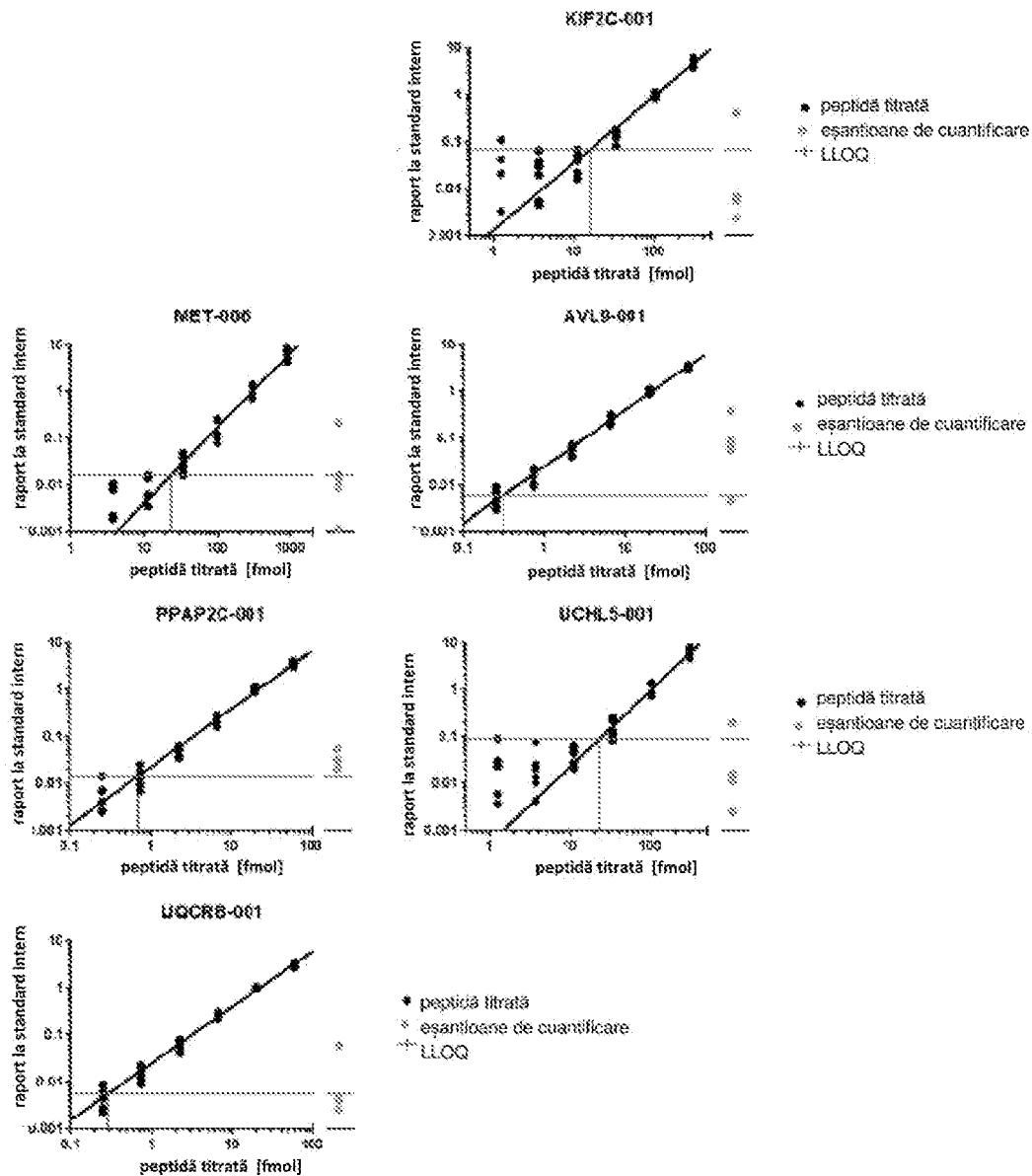


Figura 8

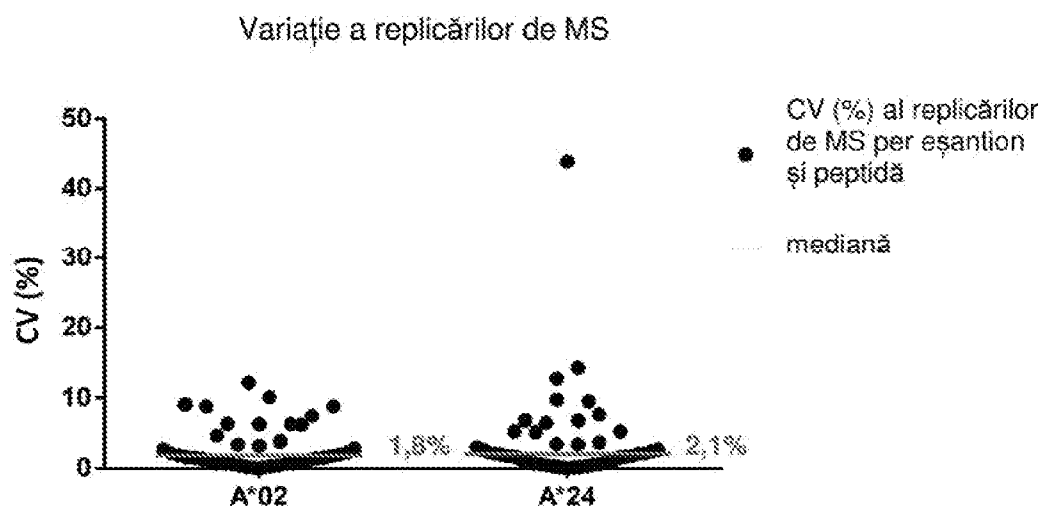


Figura 9

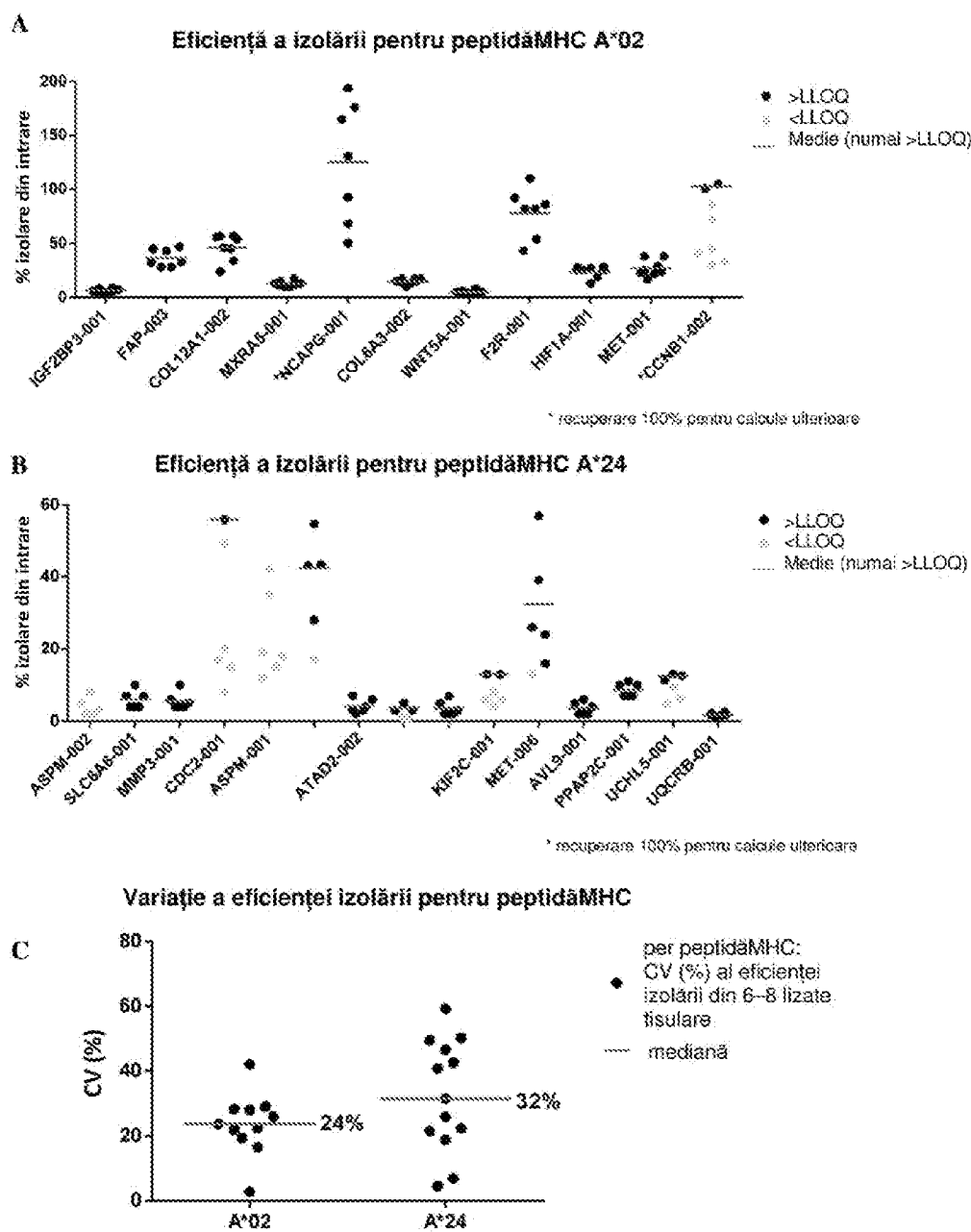


Figura 10

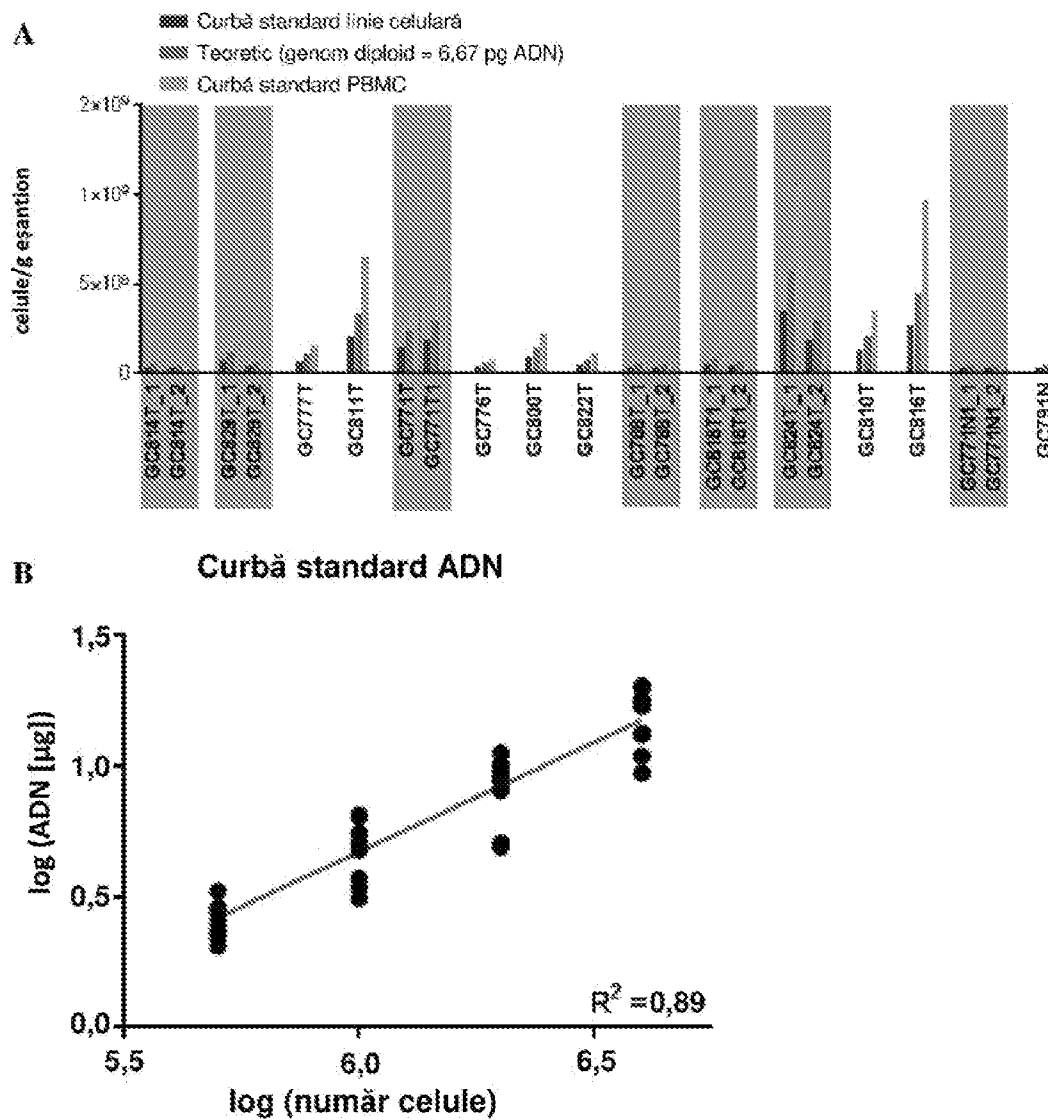
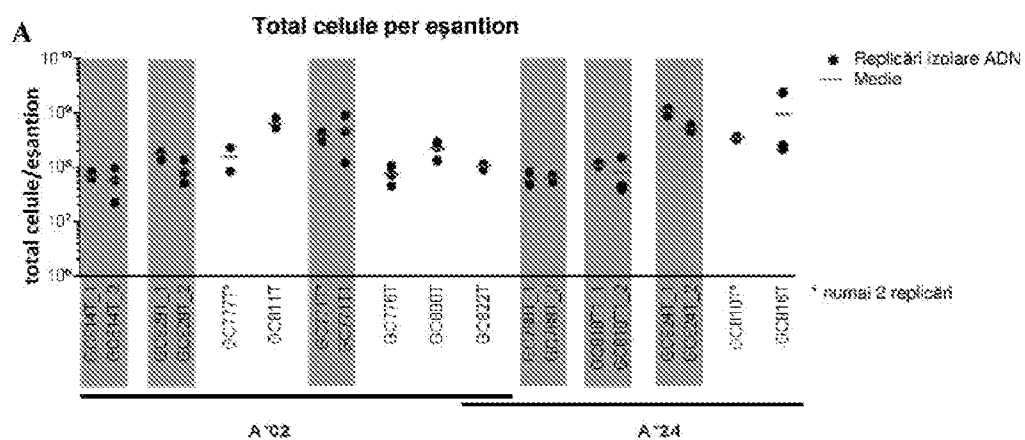


Figura 11



B Variație a analizei numărului de celule

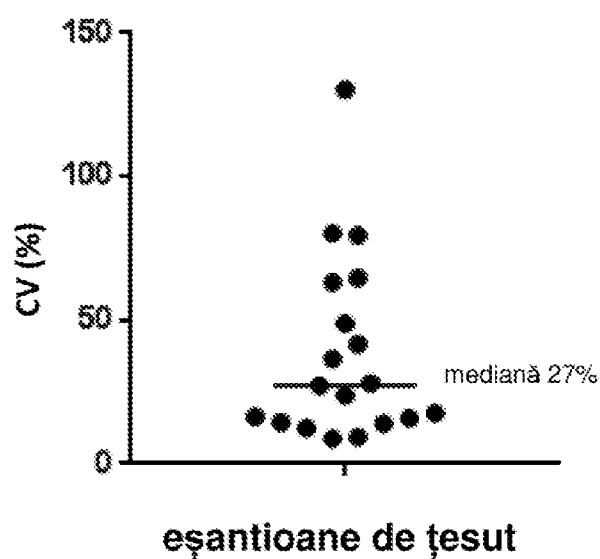


Figure 2 displays eight bar charts showing the number of copies of various peptides per cell for different cell lines. The charts are arranged in a 4x2 grid. Each chart has a y-axis labeled 'copii de peptide per celulă' and an x-axis labeled 'esantion de tesut'. The legend indicates that hatched bars represent 'LLOQ' and solid black bars represent 'esantioane de cuantificare'.

The cell lines and their corresponding peptides are:

- IGF2BP3-001
- FAP-003
- COL12A1-002
- MXRA5-001
- NCAPG-001
- COL6A3-002
- WNT5A-001
- F2R-001

The y-axis scale varies for each chart, reflecting the different ranges of peptide concentrations. The x-axis labels represent different tissue samples (esantion de tesut).

Figura 13

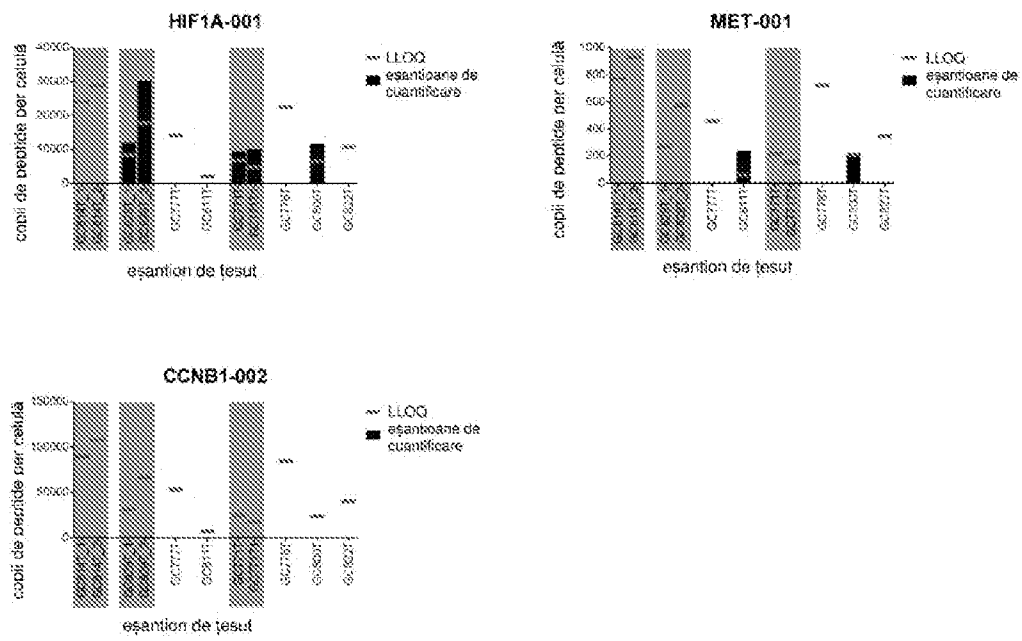


Figura 14

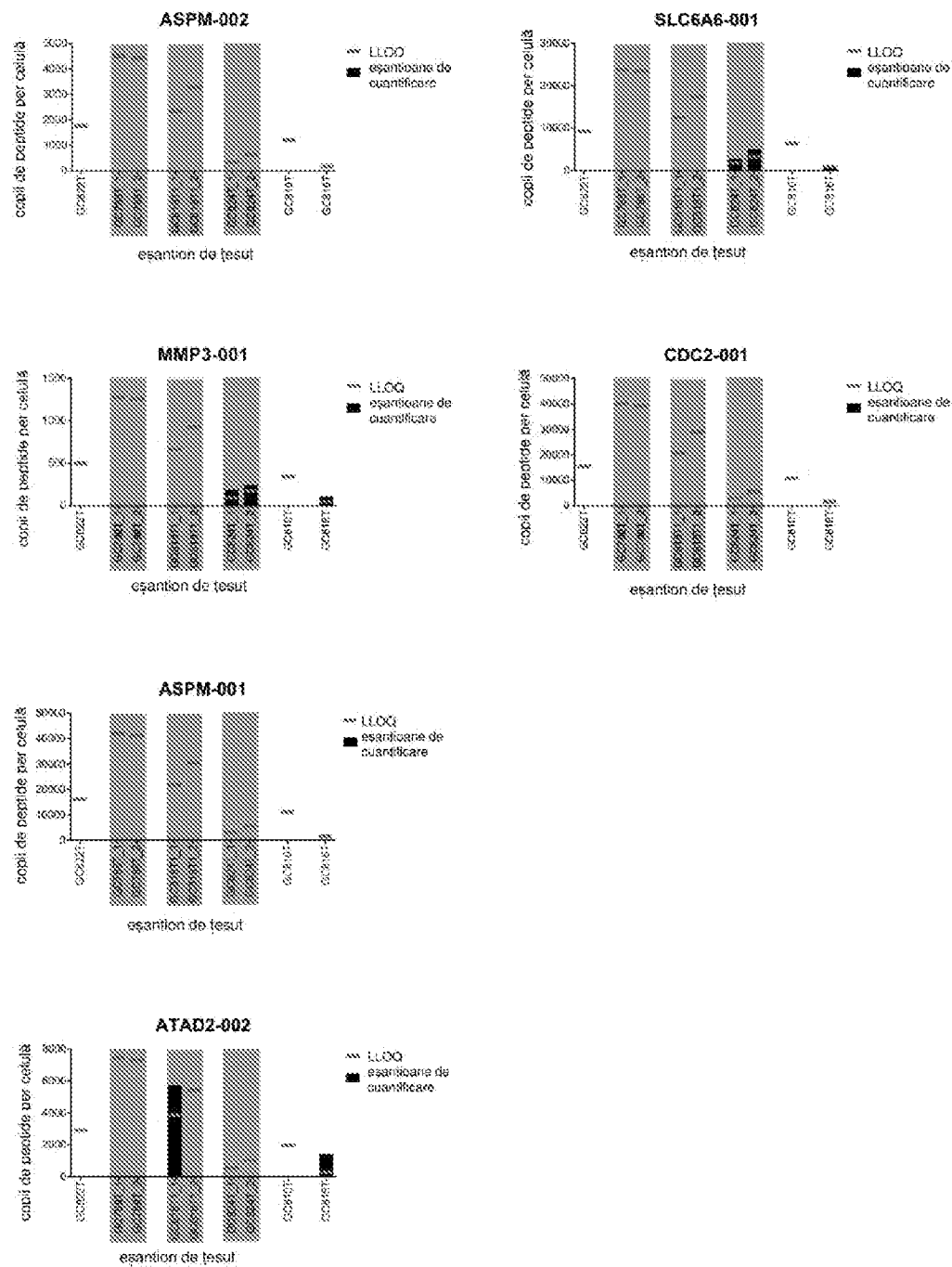


Figura 16

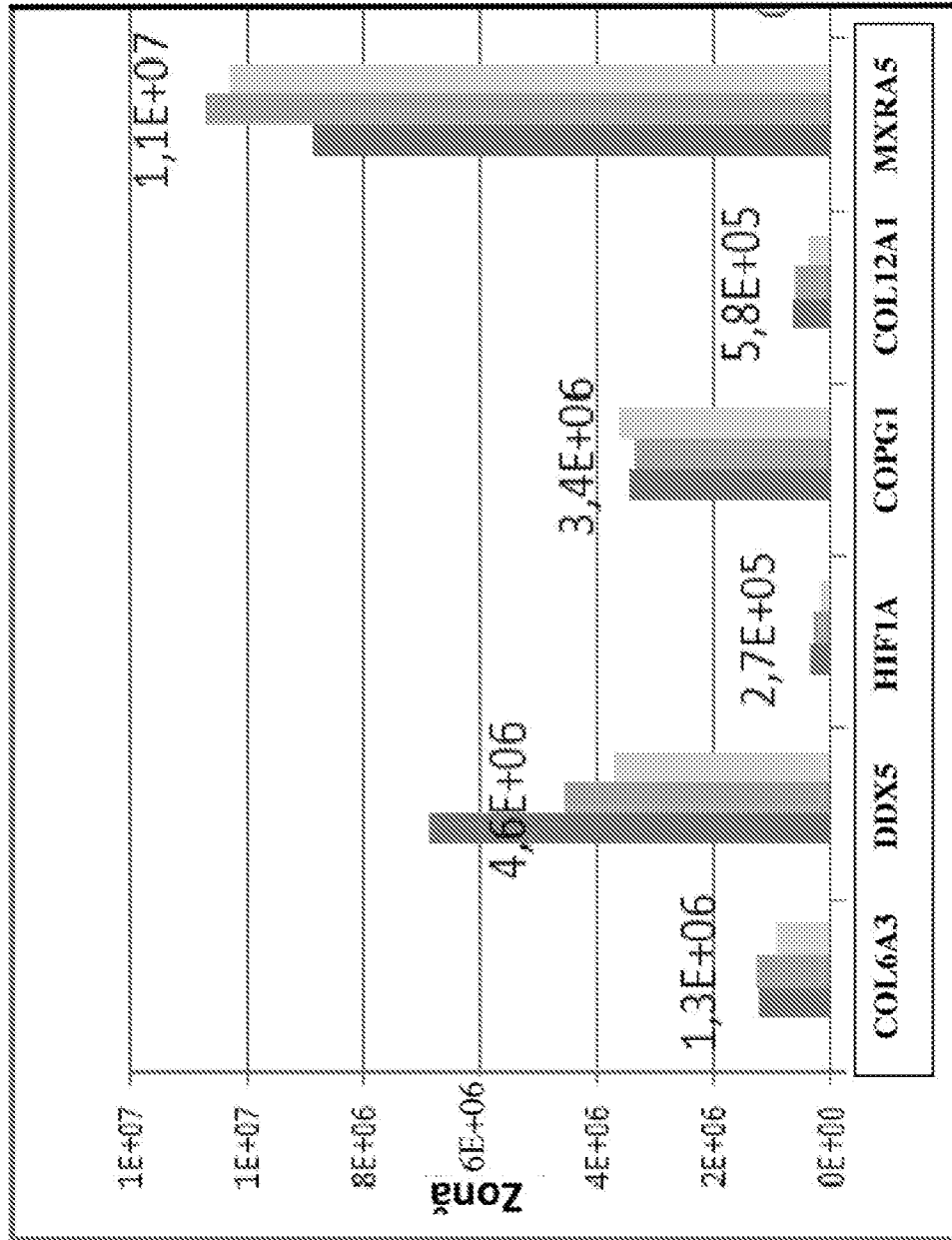


Figura 17

