



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122774** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2017 01977	(72) Винахідник(и): Вайншенк Тоні (DE), Лейболд Юлія (AT)
(22) Дата подання заявки: 15.12.2015	(73) Володілець (володільці): ІММАТІКС БІОТЕКНОЛОДЖІС ГМБХ, Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 07.01.2021	(74) Представник: Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 1423361.3, 62/097,994	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2011128448 A1, 20.10.2011 HASSAN CHOPIE et al. Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes. Journal of proteomics, 2014, Vol. 109, P. 240 – 244
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 30.12.2014, 30.12.2014	
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку: GB, US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.01.2018, Бюл.№ 2	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 06.01.2021, Бюл.№ 1	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/EP2015/079873, 15.12.2015	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АБСОЛЮТНИХ КІЛЬКОСТЕЙ HLA-РЕСТРИКТОВАНИХ РАКОВИХ ПЕПТИДІВ, ЩО УТВОРЮЮТЬСЯ В РЕЗУЛЬТАТІ ПРИРОДНОГО ПРОЦЕСИНГУ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу визначення абсолютних кількостей HLA-рестригованих ракових пептидів, що утворюються в результаті природного процесингу, тобто визначення кількості копій пептиду(ів), що презентується(ються) однією клітиною. Цей винахід не тільки можна використовувати для розробки методів лікування з застосуванням антитіл або пептидних вакцин, але він також є цінним для імунного моніторингу на молекулярному рівні і може застосовуватися у процесах ідентифікації нових пептидних антигенів для імунотерапевтичних підходів, таких як застосування відповідних вакцин, лікарських засобів на основі антитіл або адоптивного перенесення Т-клітин для лікування раку, інфекційних і (або) аутоімунних захворювань.

UA 122774 C2

Цей винахід стосується способу визначення абсолютних кількостей HLA-рестрикованих ракових пептидів, що утворюються в результаті природного процесингу, тобто визначення кількості копій пептиду(-ів), що презентується (презентуються) однією клітиною. Цей винахід не тільки можна використовувати для розробки методів лікування з застосуванням антитіл або пептидних вакцин, але він також є цінним для імунного моніторингу на молекулярному рівні і може застосовуватися у процесах ідентифікації нових пептидних антигенів для імунотерапевтичних підходів, таких як застосування відповідних вакцин, лікарських засобів на основі антитіл або адоптивного перенесення Т-клітин для лікування раку, інфекційних і (або) аутоімунних захворювань.

Область винаходу

Розробка імунотерапевтичних препаратів і імунотерапевтичних підходів у лікуванні аутоімунних і інфекційних захворювань, направлених на індукування відповіді Т-клітинної ланки імунної системи, спрямованої проти раку, може суттєво покращитися в результаті отримання глибоких знань рівнів презентації пептидів, зв'язаних з лейкоцитарним антигеном людини HLA, у тканинах, уражених первинним захворюванням. Ця інформація має відношення до методів лікування з застосуванням антитіл або зокрема до пептидних вакцин, а також до будь-якого іншого типу Т-клітинних вакцин на основі таких молекулярних компонентів як білок, ДНК або РНК. Кількісні дані такого типу щодо абсолютної кількості копій на одну клітину для тканин, отриманих від пацієнтів, досі були відсутні.

Спосіб ідентифікації пептидів, як описано вище, що дозволяє уникнути зв'язаних із "зворотною імунологією" проблем, був розкритий у заявці EP1508047B1. Як описано вище, цей спосіб не може використовуватися для кількісного визначення згаданих пептидів. Інший спосіб, у якому використовується стратегія мічення, розкритий у заявці WO 2005/076009, дозволяє зробити деякі кількісні оцінки, але не в абсолютному масштабі. Інші мітки розкриті, наприклад, у заявці WO 03/025576 або у роботі Martin і співавт. у журналі *Proteomics* 2003, 3, 2208-2220.

Інший спосіб був розкритий Fortier і співавт. (*The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome*, JEM, Vol. 205, № 3, March 17, 2008 595-610). Цей спосіб має той недолік, що він потребує відділення пептидів, зв'язаних із молекулами MHC від пептидів, не зв'язаних з MHC, внаслідок кислотної елюції. Це виконується з використанням клітинних ліній, нокаутних за b2m. Таким чином, цей спосіб не може використовуватись для первинного матеріалу, тобто матеріалу, який походить з пухлин пацієнтів. У цьому способі первинні тимоцити мишей порівнювали з клітинною лінією мишачої лімфоми EL4. Вихідні кількості були відкориговані шляхом вимірювань кількості молекул MHC I класу. Навіть один цей чинник сильно обмежує застосування способу, розкритого Fortier і співавт. Більш того, нормалізацію, яка була б необхідною для первинних тканин різного розміру і походження, не було виконано. Замість цього використовували збалансований початковий матеріал, що зробило нормалізацію зайвою. Однак нормалізація є абсолютною необхідною для первинних матеріалів (від пацієнта).

У заявці WO2011/128448 розкритий спосіб кількісної ідентифікації відповідних пептидних антигенів, зв'язаних з молекулами HLA, отриманих із первинних зразків тканин у великих масштабах без застосування підходів, що пов'язані з міченням. Спосіб включає етапи отримання принаймні одного первинного зразка хворої тканини і принаймні одного первинного зразка здорової тканини, яка переважно відповідає хворій тканині, виділення пептидних лігандів MHC із згаданого(-их) зразка(-ів), проведення аналізу методом ВЕРХ-МС згаданих пептидних лігандів MHC, виділення інтенсивності (площі) сигналу іона-прекурсора із кожного сигналу, що отриманий в аналізах, ідентифікацію послідовності згаданих пептидів-лігандів MHC, і етапи нормалізації і контролю якості даних з метою відносного кількісного визначення згаданих пептидних лігандів MHC без мічення.

Hassan і співавт. (у статті 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>) розкрили підхід, у якому мічені ізотопами мономерні комплекси пептид-MHC (hpMHC) були приготовані і додані безпосередньо після лізису клітин, тобто до звичайного процесингу зразка. Використовуючи цей підхід, можливо врахувати всі втрати під час процесингу зразка, що дозволить правильно визначити вміст конкретних лігандів, презентованих молекулами MHC I класу. Це дослідження точно визначає етап імуноочищення як джерело доволі значних втрат під час попередньої обробки зразка і пропонує рішення для врахування цих втрат. Запропонований підхід може використовуватися для отримання надійної точки зору на кількість копій епітопів і нібито дозволить покращити дизайн вакцини і стратегії імунотерапії.

Стимуляція імунної відповіді залежить від присутності антигенів, що сприймаються імунною системою хазяїна як чужорідні. Відкриття пухлино-асоційованих і пов'язаних із захворюванням

антигенів зробило можливим використання імунної системи хазяїна для втручання в ріст пухлини. Зараз вивчається можливість використання для імунотерапії раку різних механізмів задіяння як гуморальної, так і клітинної ланки імунної системи.

Специфічні елементи клітинної імунної відповіді здатні специфічно розпізнавати та знищувати пухлинні клітини. Виділення цитотоксичних Т-клітин (ЦТЛ) із популяції пухлино-інфільтруючих клітин або з периферичної крові говорить про те, що такі клітини відіграють важливу роль у природному імунному захисті проти раку. CD8-позитивні Т-клітини (T-CD8⁺) зокрема, які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС) I класу. Ці пептиди, що складаються зазвичай із 8–12 амінокислотних залишків, походять із білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP), що містяться у цитозолі, і відіграють важливу роль у цій відповіді. Молекули МНС людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

Існує два класи молекул МНС. Молекули МНС I класу можна виявити в більшості клітин, що мають ядро. Молекули МНС складаються з альфа-важких ланцюгів і бета-2-мікроглобуліну (рецептори МНС I класу) або альфа- і бета-ланцюгів (рецептори МНС II класу), відповідно. Їхня тримірна конформація приводить до утворення зв'язувальної щілини, що використовується для нековалентної взаємодії з пептидами. Молекули МНС I класу презентують пептиди, які утворюються в результаті розщеплення протеолітичними ферментами переважно ендегенних білків, продуктів DRIP та більших пептидів. Молекули МНС II класу містяться головним чином на професійних антигенпрезентуючих клітинах (АПК) і презентують головним чином пептиди екзогенних або трансмембранних білків, які поглинаються АПК в ході ендоцитозу і згодом процесуються. Комплекси пептидів і молекул МНС I класу розпізнаються CD8-позитивними цитотоксичними Т-лімфоцитами, що несуть відповідний Т-клітинний рецептор (ТКР), в той час як комплекси пептиду і молекул МНС II класу розпізнаються CD4-позитивними Т-хелперами, що несуть відповідний ТКР. Загальновідомо, що ТКР, пептид і МНС, таким чином, є присутніми у стехіометричних кількостях у співвідношенні 1:1:1.

Щоб пептид ініціював (викликав) клітинну імунну відповідь, він має зв'язатися з молекулою МНС. Цей процес залежить від алеля молекули МНС і специфічних поліморфізмів амінокислотної послідовності пептиду. Пептиди, що зв'язуються з молекулами МНС I класу, зазвичай мають 8–12 амінокислотних залишків у довжину і зазвичай містять у своїй послідовності два консервативні залишки ("якорі"), які взаємодіють з відповідною зв'язувальною щілиною молекули МНС. У такий спосіб кожний алель МНС має зв'язувальний мотив, що визначає, які пептиди зможуть специфічно зв'язатися зі зв'язувальною щілиною.

В імунній реакції, залежній від молекул МНС I класу, пептиди не тільки мають бути здатними зв'язатися з певними молекулами МНС I класу, що експресуються клітинами пухлини, але вони також мають розпізнаватися Т-клітинами, що несуть специфічний Т-клітинний рецептор (ТКР).

Антигенами, які розпізнаються пухлино-специфічними цитотоксичними Т-лімфоцитами, тобто їхніми епітопами, можуть бути молекули, що отримані з усіх класів білків, таких як ферменти, рецептори, фактори транскрипції тощо, які експресуються і активність яких, у порівнянні з незміненими клітинами того ж походження, підвищена у клітинах відповідної пухлини.

Сучасна класифікація пухлино-асоційованих або асоційованих з захворюванням антигенів охоплює наступні головні групи:

Раково-тестикулярні антигени: перші будь-коли ідентифіковані ТАА (пухлино-асоційовані антигени; асоційовані з захворюванням антигени позначають скороченням DAA), які можуть бути розпізнані Т-клітинами, належать до цього класу, вони були спочатку названі раково-тестикулярними (СТ) антигенами завдяки експресії його представників у гістологічно різних пухлинах людини і, серед нормальних тканин, тільки в сперматocyтах/сперматогоніальних клітинах яєчок і іноді в плаценті. Оскільки клітини яєчок не експресують молекули HLA I та II класу, ці антигени не можуть розпізнаватися Т-клітинами у нормальних тканинах і таким чином, з точки зору імунології можуть вважатися пухлино-специфічними. Добре відомими прикладами СТ антигенів є члени сімейства MAGE або NY-ESO-1.

Антигени диференціації: ці ТАА розподілені між пухлинами та нормальними тканинами, з яких виникла пухлина, більшість з них знайдена в меланомах і нормальних меланоцитах. Багато цих білків, пов'язаних із диференціацією у меланоцити, беруть участь у біосинтезі меланіну і тому не є пухлино-специфічними, але, тим не менше, широко застосовуються для імунотерапії раку. Приклади включають, але не обмежуються ними, тирозиназу і Melan-A/MART-1 для меланоми або ПСА для раку передміхурової залози.

Надмірно експресовані ТАА: Гени, що кодують ТАА, які широко експресуються, були виявлені в гістологічно різних типах пухлин, а також у багатьох нормальних тканинах, загалом з

нижчими рівнями експресії. Можливо, що багато епітопів, що були процесовані і, можливо, презентовані нормальними тканинами, присутні у кількості, що нижча за пороговий рівень розпізнання Т-клітинами, в той час як їх надекспресія в пухлинних клітинах може запустити антиракову реакцію, порушивши раніш встановлену толерантність. Відомими прикладами для цього класу ТАА є Her-2/neu, сурвівін, теломераза або WT1.

Пухлино-специфічні антигени: ці унікальні ТАА утворюються в результаті мутацій нормальних генів (таких як бета-катенін, CDK4 тощо). Деякі з цих молекулярних змін зв'язані з неопластичною трансформацією і (або) прогресуванням пухлини. Пухлино-специфічні антигени загалом можуть викликати сильні імунні відповіді, не спричиняючи ризику аутоімунних реакцій проти нормальних тканин. З іншого боку, ці ТАА у більшості випадків мають відношення тільки до певної пухлини, на якій вони були ідентифіковані, і зазвичай не є спільними для багатьох окремих пухлин.

ТАА, що виникають в результаті аномальних посттрансляційних модифікацій: Такі ТАА можуть виникати з білків, які не є ані специфічними, ані надмірно експресованими у пухлинах, але, незважаючи на це, стають асоційованими з пухлинами в результаті посттрансляційних процесів, первинно активних у пухлинах. Прикладами ТАА цього класу є антигени, що виникають в результаті змін характеру глікозилювання, що приводить до утворення у пухлинах нових епітопів, таких як MUC1, або таких подій як білковий сплайсинг під час деградації, які можуть бути пухлино-специфічними, а можуть і не бути.

Онковірусні білки: Ці ТАА є вірусними білками, які можуть відігравати вирішальну роль в онкогенному процесі і, оскільки вони є чужорідними (не походять від людини), вони можуть викликати відповідь Т-клітин. Прикладами таких білків є білки вірусу папіломи людини типу 16, E6 і E7, які експресуються клітинами карциноми шийки матки.

Для того, щоб білки розпізнавалися цитотоксичними Т-лімфоцитами як пухлино-специфічні або пухлино-асоційовані, або специфічні для захворювання або асоційовані із захворюванням антигени, та щоб їх було можливо застосовувати в терапії, необхідно створити особливі передумови. Антиген має експресуватися головним чином пухлинними клітинами або інфікованими клітинами і взагалі не експресуватися або експресуватися у порівняно невеликих кількостях нормальними здоровими тканинами, наприклад, менше у 5, 10 або більше разів.

При інфекційних захворюваннях існують дві можливості, перша, коли інфіковані клітини експресують антиген, що не експресується здоровими клітинами – безпосередньо зв'язані з інфекцією, або інфіковані клітини надмірно експресують антиген, що експресується здоровими клітинами лише у дуже невеликих кількостях – надмірна експресія антигену, який зазвичай знаходиться у пептидомі здорових клітин.

До того ж бажано, щоб відповідний антиген не тільки був присутнім у пухлині, інфекції або штаму певного типу, але також був присутнім у високих концентраціях (тобто як декілька копій відповідного пептиду на одну клітину). Пухлино-специфічні та пухлино-асоційовані антигени або специфічні для захворювання або асоційовані із захворюванням антигени часто отримують із білків, які беруть безпосередню участь у трансформації нормальної клітини в пухлинну/інфіковану клітину, завдяки їх функції, наприклад, в контролі клітинного циклу або пригніченні апоптозу.

Крім цього, у випадку раку додаткові низхідні мішені білків, що є безпосередньою причиною трансформації, можуть мати підвищену експресію і, таким чином, можуть бути опосередковано пухлино-асоційованими. Такі опосередковані пухлино-асоційовані антигени також можуть бути мішенями вакцинаційного підходу (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). В обох випадках важливо, щоб в амінокислотній послідовності антигену були присутні епітопи, оскільки такий пептид ("імуногенний пептид"), отриманий із пухлино-асоційованого антигену або асоційованого з захворюванням антигену, має приводити до відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

По суті, будь-який пептид, здатний зв'язуватися з молекулою МНС, може відігравати роль епітопу Т-клітини. Передумовою індукції відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo* є присутність Т-клітин із відповідним ТКР і відсутність імунологічної толерантності до цього конкретного епітопу.

Таким чином, ТАА і ДАА є стартовою точкою для розробки протипухлинних вакцин. Способи ідентифікації та визначення характеристик ТАА і ДАА базуються на використанні ЦТЛ, які можна виділити з організму пацієнтів або здорових суб'єктів, або вони ґрунтуються на генерації різних профілів транскрипції або різному характері експресії пептидів тканинами пухлин і нормальними тканинами.

Проте ідентифікація генів, які надмірно експресуються пухлинними тканинами або лініями пухлинних клітин людини, або селективно експресуються в таких тканинах або клітинних лініях, не дає точної інформації щодо використання антигенів, що кодуються цими генами, в імунній

терапії. Причиною цього є те, що тільки окрема субпопуляція епітопів цих антигенів придатна для такого застосування, оскільки має бути присутня Т-клітина з відповідним ТКР, і імунологічна толерантність по відношенню до цього епітопу повинна бути відсутньою або мінімальною. Таким чином, важливо вибрати тільки такі пептиди з надмірно експресованих або селективно експресованих білків, які презентуються зв'язаними з молекулами МНС, проти яких можливо знайти функціонуючу Т-клітину. Така функціонуюча Т-клітина визначається як Т-клітина, яка за стимуляції специфічним антигеном може бути клонована і здатна виконувати функції ефектору ("ефекторна Т-клітина").

Т-хелперні клітини відіграють важливу роль в регуляції ефекторної функції ЦТЛ у протипухлинному імунітеті. Епітопи Т-хелперів, які запускають реакцію цих клітин типу Т_{H1}, підтримують ефекторні функції CD8-позитивних Т-кілерів, котрі включають цитотоксичні функції, спрямовані проти пухлинних клітин, що експонують комплекси пухлино-асоційованого пептиду/МНС на поверхнях своїх клітин. У такий спосіб епітопи пухлино-асоційованих пептидів Т-хелперних клітин, самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованих пептидами, можуть служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції.

Точне знання кількості копій лігандів, презентованих молекулами HLA I або II класів, є важливим для теоретичної і клінічної імунології. У даний час найкращі способи визначення кількості копій ґрунтуються на мас-спектрометрії, у якій використовується моніторинг вибраної реакції (SRM) у комбінації з відомою кількістю мічених ізотопами пептидів. Тим не менш, ці підходи все ж недостатньо точні для того, щоб ефективно використовуватися у вищезгаданих стратегіях.

З огляду на викладене вище, метою цього винаходу є розробка способу визначення абсолютної кількості копій лігандів, презентованих молекулами HLA I або II класів, який буде точним, ефективним і легким у виконанні, а також який можливо здійснити на "високопродуктивному" рівні. Інші цілі і переваги цього винаходу стануть зрозумілими фахівцеві у цій галузі з наведеного нижче опису

Згідно з першим аспектом цього винаходу, мета цього винаходу досягається способом визначення абсолютної кількості принаймні одного пептидного ліганду МНС на клітині, де згаданий спосіб включає:

а) приготування клітин, що презентують згаданий принаймні один пептидний ліганд МНС, із біологічного зразка, що містить клітини,

б) визначення числа клітин у згаданому препараті за етапом а),

с) додавання відомої кількості згаданого принаймні одного пептидного ліганду МНС і (або) комплексу пептидного ліганду з МНС, який необхідно визначити, до згаданого препарату за етапом а) ("добавка I"),

д) виділення принаймні одного пептидного ліганду МНС зі згаданого препарату за етапом с) для отримання пептидного елюату,

е) додавання відомої кількості принаймні одного пептидного ліганду МНС, який необхідно визначити, до згаданого пептидного елюату ("добавка II"),

ф) проведення аналізу методом мас-спектрофотометрії згаданого принаймні одного пептидного ліганду МНС для отримання принаймні одного

аа) сигналу для ефективності виділення на етапі д),

бб) сигналу для відомої кількості згаданого принаймні одного пептидного ліганду МНС, що був доданий на етапі е), і

сс) сигналу для згаданого принаймні одного пептидного ліганду МНС із згаданих приготованих клітин за етапом а),

і;

г) кількісне визначення принаймні одного пептидного ліганду МНС на основі порівняння сигналів, що отримані на етапі ф), з

аа) отриманим числом клітин,

бб) відомою кількістю згаданого принаймні одного ліганду пептид МНС і (або) комплексу пептидного ліганду з МНС, який необхідно визначити, що доданий на етапі с), і

сс) відомою кількістю принаймні одного пептидного ліганду МНС який необхідно визначити, що доданий на етапі е),

за допомогою чого, принаймні частково, досягається визначення абсолютної кількості принаймні одного пептидного ліганду МНС на клітині.

У способі за цим винаходом, де декілька зразків аналізується паралельно, етап с) як описано вище можна пропустити, як тільки була визначена ефективність виділення, оскільки ефективність для одного зразка може використовуватися для оцінки ефективності виділення

другого пептидного ліганду МНС і (або) комплексу пептидного ліганду з МНС (тобто може використовуватися як значення за перехресним посиланням).

Переважним є спосіб, у якому додатково використовується сигнал, отриманий в результаті внутрішнього калібрування (добавки ІІ) на етапі е), як постійний і фіксований (контрольний) еталон для сигналу, отриманого для виділеного принаймні одного пептидного ліганду МНС шляхом розрахунку співвідношення між цими двома сигналами. Це співвідношення порівнюють з встановленою калібрувальною кривою, яка також включає внутрішній калібратор у той самій кількості, переважно шляхом використання ідентичної аліквоти такого внутрішнього калібратора. Калібрувальна крива також описує взаємозв'язок між цими співвідношеннями і кількістю пептиду. Див. також Фігуру 3 і умовні позначення до неї.

Несподівано, в контексті цього винаходу його автори визначили, що об'єднавши вищезгадані етапи аналізу, вперше стало можливим провести пряме кількісне визначення абсолютних значень рівнів МНС-, переважно HLA-рестриктованих пептидів на ракових та інших інфікованих тканинах у порівнянні з декількома різними нераковими тканинами або неінфікованими тканинами і органами.

У контексті цього винаходу "добавка" означає додавання відомої кількості або концентрації принаймні одного відомого, наприклад, незв'язаного ("вільного") пептидного ліганду МНС, який необхідно визначити, до зразка, такого як препарат (визначений у цьому документі як "добавка І") або пептидний елюат (визначений у цьому документі як "добавка ІІ"). Кількості/концентрації пептиду(-ів), які необхідно додати, можуть бути легко скориговані і залежать, принаймні частково, від зразка, до якого необхідно додати добавку, і від методу аналізу.

Переважним є спосіб за цим винаходом, де принаймні один пептидний ліганд МНС, вибраний із пухлино-асоційованого пептиду (ТАА) або асоційованого з захворюванням пептиду (DAA).

Ще одним переважним втіленням є спосіб за цим винаходом, де згаданий біологічний зразок, що містить клітини, вибраний із зразка тканини, зразка крові, зразка пухлини або зразка інфікованої тканини. У контексті цього винаходу зразки, отримані безпосередньо від суб'єктів, таких як пацієнти, звуться "первинними" зразками, такі як первинні зразки тканини або пухлини, у протилежність зразкам клітинних ліній, таким як, наприклад, усталені лінії пухлинних клітин. Зразки можуть бути свіжими або такими, що зберігаються у консервованому вигляді (наприклад, замороженому або препаративному), за умови, що вони прийнятні для способу за цим винаходом. Переважним є біологічний зразок, що не включає постійні клітинні лінії.

Як переважний приклад, пули пептидів HLA із (первинних) зразків заморожених шоківим способом тканин можливо отримати імунним осадженням із твердих тканин, використовуючи, наприклад, HLA-A, -B, -C-специфічні антитіла w6/32 або HLA-A*02-специфічні антитіла BB7.2, зв'язані з сефарозою, активованою CNBr, з наступною кислотною обробкою та ультрафільтрацією. Для різних алелей HLA можливе використання інших специфічних антитіл, відомих у цій галузі, наприклад, GAP-A3 для A*03, B1.23.2 для B-алелей. Існують відповідні способи одержання пептидів, що зв'язуються з молекулами МНС І класу, для інших ссавців, які добре відомі в цій галузі.

Спосіб за цим винаходом може також застосовуватися у контексті інфекційних захворювань, таких як вірусні або бактеріальні інфекції, наприклад, лихоманка денге, лихоманка Ебола, лихоманка Марбург, туберкульоз (ТБ), менінгіт або сифіліс, переважно цей спосіб використовується для стійких до антибіотиків штамів інфекційних агентів, для лікування аутоімунних захворювань, таких як артрит, паразитарних інфекцій, таких як малярія, та інших хвороб, таких як РС і хвороба Morbus Parkinson, за умови, що елементом-мішенню є пептид, зв'язаний з молекулою МНС І класу.

Прикладами аутоімунних захворювань (включаючи захворювання, офіційно не визнані аутоімунними) є хронічне обструктивне захворювання легенів, анкілозуючий спондилоартрит, хвороба Крона (один з двох типів ідіопатичних запальних захворювань кишки "ЗЗК"), дерматоміозит, цукровий діабет типу 1, ендометріоз, синдром Гудпасчера, хвороба Грейвса, синдром Гієна-Барре (GBS), хвороба Хашимото, аутоімунний тиреоїдит, гнійний гідраденіт, хвороба Кавасакі, IgA-нефропатія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, інтерстиціальний цистит, системна червона вовчанка, синдром Шарпа, склеродермія (Morphea) локалізована, міастенія, нарколепсія, нейроміотомія, пухирчатка звичайна, злоякісна анемія, псоріаз, псоріатичний артрит, поліміозит, первинний біліарний цироз, рецидивуючий поліхондрит, ревматоїдний артрит, шизофренія, склеродерма, синдром Шегрена, синдром нерухомості, скроневий артеріїт (гігантоклітинний артеріїт), виразковий коліт (один з двох типів ідіопатичних запальних захворювань кишки "ЗЗК"), васкуліт, вітіліго і гранулематоз Вегенера.

Цей винахід не обмежується захворюваннями людини, а може використовуватися для ссавців, наприклад, корів, свиней, коней, кішок, собак, гризунів, таких як щури, миші, кіз та інших домашніх тварин.

У ще одному переважному втіленні спосіб за цим винаходом приготування клітин включає, 5
принаймні частково, ферментативне розщеплення тканин і (або) лізис клітин.

Переважним є спосіб за цим винаходом, де згадане число клітин визначають за допомогою методу, вибраного з підрахунку ядер клітин, с фотометричного визначення концентрації ДНК, флуориметричного визначення концентрації ДНК (такого як, наприклад, за методикою Qubit®) і кількісної ПЛР.

10 Також переважним є спосіб за цим винаходом, що додатково включає визначення кількості принаймні одного типу молекул HLA у згаданому препараті на етапі а). Визначення кількості може здійснюватися за допомогою звичайних методів, відомих в цій галузі, таких як методи із застосуванням специфічних антитіл, наприклад, у методах на основі ELISA, гелів, сортування клітин і (або) хроматографії.

15 Також переважним є спосіб за цим винаходом, де доданий принаймні один комплекс пептиду з MHC і (або) принаймні один доданий пептидний ліганд MHC є міченими, і переважно міченими різними мітками. Відповідні мітки відомі фахівцеві у цій галузі і включають ізотопні мітки, радіоактивні і нерадіоактивні мітки, ферменти та інші групи переважно з різними масами. Переважно, мічення є специфічним для конкретних пептидів, які необхідно кількісно визначити. 20
Найбільш переважним є подвійно мічений TAA/TUMAP, наприклад, у ситуаціях, за яких у одних і тих самих експериментах необхідно додати дві по-різному мічені добавки (див. приклади нижче).

Переважним є спосіб за цим винаходом, де виділення включає хроматографію, таку як афінну хроматографію. Отже, виділені ліганди MHC/HLA можна розділити відповідно до їхньої 25
гідрофобності із використанням зворотно-фазної хроматографії (наприклад, на системі nanoAcquity UPLC system, Waters) з наступним визначенням на гібридному мас-спектрометрі Orbitrap (ThermoElectron). Кожний зразок переважно аналізується шляхом отримання повторних вимірювань (наприклад) методом PX/MC. Дані PX/MC потім обробляють шляхом аналізу даних тандемних (MC/MC) мас-спектрів.

30 Тандемні мас-спектри, записані цілеспрямовано з акцентом на значення m/z для пептидів, які необхідно кількісно визначити, оцінюються переважно програмою, яка екстрагує інтенсивності сигналів заздалегідь вибраних фрагментарних іонів заздалегідь вибраних переходів. Одним із прикладів такої програми є 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>), прикладна програма аналізу даних мас-спектрометрії у експериментах за методом незалежного від даних аналізу (DIA) для моніторингу паралельних реакцій (PRM – таргетна MC/MC). Ця прикладна програма може використовуватися для сумісного елювання міченого ізотопом пептиду з метою визначення специфічності, а також для виділення інтенсивностей поодиноких переходів для подальшої 40
обробки.

Порівняльність груп пептидів, рестрикованих за одним і тим самим алелем HLA, між різними зразками можлива на основі використання спільного алель-специфічного антитіла, що використовується для очищення, якщо таке є, або альтернативно на основі приписування послідовностей спільним алелям HLA за допомогою шаблонів, що містять якірні амінокислотні залишки. 45

З огляду на статистику, переважним є спосіб за цим винаходом, де принаймні два повторних мас-спектри отримують для кожного принаймні одного пептидного ліганду MHC.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується способу за цим винаходом, що додатково включає вибір надмірно презентованих, надмірно експресованих і (або) пухлиноспецифічних 50
пептидних лігандів MHC в для аналізу.

У ще одному аспекті цей винахід стосується способу за цим винаходом, де згаданий спосіб можливо здійснити або здійснюється на високопродуктивному рівні, переважно аж до 50–100 пептидних лігандів можливо аналізувати паралельно.

У ще одному переважному втіленні способу за цим винаходом етапи згаданого способу виконуються у порядку, вказаному в приєднаній формулі винаходу або як зазначено вище. У ще 55
одному переважному втіленні способу за цим винаходом згаданий спосіб складається з етапів як зазначено вище а також у цьому документі.

У ще одному переважному втіленні способу за цим винаходом згаданий спосіб стосується персоналізованої терапії і діагностики. З цієї метою згаданий(-і) зразок(-ки) у вигляді, в якому 60
його(-їх) аналізують, отримують від одного індивіда або від групи індивідів, що страждають від

одного й того самого медичного відхилення, як описано у цьому документі. Також, персоналізований профіль лігандів МНС, переважно персоналізований кількісно охарактеризований специфічний для захворювання профіль лігандів МНС, виходячи із вмісту згаданих пептидних лігандів МНС, який був кількісно визначений, можливо отримати на основі

5 способу за цим винаходом, як описано у цьому документі.

Найбільш переважно, якщо спосіб за цим винаходом здійснюється *in vitro*.

У ще одному переважному втіленні способу за цим винаходом згаданий спосіб додатково включає стадію синтезу, переважно хімічного синтезу згаданого принаймні одного пептидного ліганду МНС, який був кількісно визначений за згаданим способом, у апараті для синтезу або

10 вручну. Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується способу приготування імунореактивного пептиду, за яким пептид кількісно визначають відповідно до розкритого способу, і згаданий пептид синтезують хімічно, *in vitro* або *in vivo*. Пептиди можливо приготувати хімічним сполученням амінокислот стандартними методами, відомими в цій галузі.

Пептиди можливо приготувати *in vitro*, наприклад, у безклітинних системах, і *in vivo* із застосуванням клітин. Пептиди можливо отримати як розкрито, наприклад, у заявці EP2111867 Lewandrowski і співавт.

У ще одному аспекті цей винахід стосується способу за цим винаходом, де виконується додатковий етап, у якому виявляється присутність Т-лімфоцитів. Використовуючи цей спосіб, можливо конкретно визначити, у якій мірі Т-лімфоцити спрямовані проти виділених і

20 ідентифікованих пептидів, які раніше існували в організмі пацієнтів. Шляхом виконання цього етапу можливо застосувати у вигляді вакцини лише ті пептиди, проти яких в організмі пацієнтів раніше вже існували Т-лімфоцити. Ці пептиди можуть використовуватися для активації цих специфічних Т-лімфоцитів.

У ще одному аспекті цей винахід стосується способу за цим винаходом, де виявлення специфічних раніше існуючих Т-лімфоцитів виконується шляхом мічення цих лейкоцитів відновленими комплексами антиген-презентуючих молекул і антигенних пептидів.

У ще одному переважному втіленні способу за цим винаходом згаданий спосіб дійсно додатково виключає застосування нокаутних клітин, клітинних ліній або тварин.

Додатковим переважним необов'язковим етапом цього винаходу є автоматичний контроль

30 якості на основі молекул, доданих у зразки у відомих кількостях.

За цим способом за винаходом також можливо ідентифікувати специфічні для пацієнта пептиди, тобто можливо точно сумістити пептиди, які треба використати у вакцині, з особливостями організму пацієнта з метою індукувати специфічну імунну реакцію.

Інший аспект винаходу стосується також фармацевтичної композиції, що містить визначені

35 кількості одного або більше пептидів TAA і (або) DAA, які були кількісно визначені способом за цим винаходом.

Композиція може бути введена, наприклад, парентерально, наприклад, підшкірно, внутрішньошкірно або внутрішньом'язово, або введена перорально, залежно від складу і від цільового захворювання. При цьому пептиди розчиняють або суспендують у фармацевтично

40 прийнятному носію, переважно у водному носію, причому композиція може додатково містити добавки, наприклад, буфери, зв'язувачі тощо. Ці пептиди можуть також вводитися разом із імуностимулюючими речовинами, наприклад цитокінами.

Відповідно до одного аспекту винаходу, пептиди можуть застосовуватися для лікування пухлинних захворювань і для приготування лікарського препарату для лікування пухлинних

45 захворювань. Пухлинні захворювання, які належить лікувати, включають солідні пухлини, такі як рак нирки, молочної залози, підшлункової залози, шлунка, яєчка і (або) шкіри або ракові захворювання крові, такі як ГМЛ. Цей список пухлинних захворювань наведений лише як приклад і не призначений для обмеження сфери застосування.

Ці пептиди можливо також використовувати для оцінки курсу терапії пухлинного

50 захворювання.

Ці пептиди можливо також використовувати для моніторингу терапії при інших видах імунізації або терапії. Таким чином, пептид може використовуватися не лише у терапевтичних, але й у діагностичних цілях.

Згідно з ще одним аспектом цього винаходу, пропонується використання пептидів, які були визначені кількісно, для отримання антитіл. Поліклональні антитіла можливо отримати у

55 загальновідомий спосіб, імунізацією тварин шляхом ін'єкції пептидів із подальшим очищенням імуноглобуліну. Моноклональні антитіла можливо отримати відповідно до стандартних протоколів, відомих у цій галузі.

Цей винахід особливо актуальний для підходів з використанням антитіл, оскільки кількість

60 копій мішені на поверхні клітини-мішені визначає і (або) відображає, чи є мішень взагалі

досяжною для антитіла, і, якщо це дійсно так, які ефекторні функції можуть використовуватися, такі як кон'юговані лікарські препарати, токсини, біспецифічні антитіла, що залучають Т-клітини, або інші ефекторні клітини. Інші аспекти стосуються використання у цьому контексті молекул, що формують так званий клітинний каркас, таких як аптамери (молекули олігонуклеїнових кислот або пептидів, що зв'язують мішені) і (або) розчинні Т-клітинні рецептори (ТКР). Тут знову, подібно до антитіл, кількість копій визначає аспекти необхідної авідності і ефекторні функції згаданих молекул, що формують клітинний каркас

Стимуляція імунної відповіді залежить від присутності антигенів, що сприймаються імунною системою хазяїна як чужорідні. Відкриття пухлино-асоційованих антигенів зробило можливим в даний час використання імунної системи хазяїна для втручання в ріст пухлини. Зараз вивчається можливість використання для імунотерапії раку різних механізмів, як гуморальної, так і клітинної ланки імунної системи.

Специфічні елементи клітинної імунної відповіді здатні специфічно розпізнавати та знищувати пухлинні клітини. Виділення цитотоксичних Т-клітин (ЦТЛ) із популяції пухлино-інфільтруючих клітин або з периферичної крові говорить про те, що такі клітини відіграють важливу роль у природному імунному захисті проти раку. Особливо це стосується CD8-позитивних Т-клітин, які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності I класу (МНС). Ці пептиди, що складаються зазвичай із 8–12 амінокислотних залишків, походять із білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP), що містяться у цитозолі, і відіграють важливу роль у цій відповіді. Молекули МНС людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

Молекули МНС I класу можна виявити в більшості клітин, що мають ядра, ці молекули презентують пептиди, які утворюються в результаті розщеплення протеолітичними ферментами переважно ендогенних, цитозольних білків чи ядерних білків, продуктів DRIP та великих за розміром пептидів. Однак пептиди, одержані з ендосомальних компартментів чи екзогенних джерел, також часто зустрічаються на молекулах МНС I класу. Цей неklasичний спосіб презентації I класом називається у науковій літературі крос-презентацією.

Для того, щоб білки розпізнавалися цитотоксичними Т-лімфоцитами як пухлино-специфічні або пухлино-асоційовані антигени, та щоб їх було можливо застосовувати в терапії, необхідно створити особливі передумови. Антиген має експресуватися, головним чином, пухлинними клітинами і не експресуватися або експресуватися у порівняно невеликих кількостях нормальними здоровими тканинами. До того ж бажано, щоб відповідний антиген не тільки був присутнім у пухлині певного типу, але також був присутнім у високих концентраціях (тобто як декілька копій відповідного пептиду на одну клітину). Пухлино-специфічні та пухлино-асоційовані антигени часто походять від білків, які беруть безпосередню участь у трансформації нормальної клітини в пухлинну клітину, завдяки їх функції, наприклад, в контролі клітинного циклу або апоптозі. Крім цього, низхідні мішені білків, що є безпосередньою причиною трансформації, можуть мати підвищену експресію і, таким чином, можуть бути опосередковано пухлино-асоційованими. Такі опосередковані пухлино-асоційовані антигени також можуть бути мішенями у вакцинаційному підході. У обох випадках необхідно, щоби в амінокислотній послідовності антигену були присутні епітопи, оскільки такий пептид ("імуногенний пептид"), отриманий із пухлино-асоційованого антигену або асоційованого з захворюванням антигену, має приводити до відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

По суті, будь-який пептид, здатний зв'язуватися з молекулою МНС, може відігравати роль епітопу Т-клітини. Передумовою індукції відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo* є присутність Т-клітин із відповідним ТКР і відсутність імунологічної толерантності до цього конкретного епітопу. Таким чином, ТАА є стартовою точкою для розробки протипухлинних вакцин. Методи ідентифікації та визначення характеристик ТАА базуються на використанні ЦТЛ, які можна виділити з організму пацієнтів або здорових суб'єктів, або вони ґрунтуються на генерації різних профілів транскрипції або різному характері експресії пептидів тканинами пухлин і нормальними тканинами (Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27). Проте ідентифікація генів, які надмірно експресуються пухлинними тканинами або лініями пухлинних клітин людини, або селективно експресуються в таких тканинах або клітинних лініях, не дає точної інформації щодо використання антигенів, що кодуються цими генами, в імунній терапії. Причиною цього є те, що тільки окрема субпопуляція епітопів цих антигенів придатна для такого застосування, оскільки має бути присутня Т-клітина з відповідним ТКР, і імунологічна толерантність по відношенню до цього епітопу повинна бути відсутньою або мінімальною. Таким чином, важливо вибрати тільки такі пептиди з надмірно експресованих або селективно експресованих білків, які презентуються зв'язаними з молекулами МНС, проти яких можливо знайти функціонуючу Т-клітину. Така функціонуюча Т-клітина визначається як Т-клітина, яка при стимуляції конкретним антигеном

може бути клонована і здатна виконувати функції ефектора ("ефекторна Т-клітина").

Беручи до уваги серйозні побічні ефекти і витрати, пов'язані з лікуванням раку, існує нагальна потреба у кращих методах прогнозування і діагностики.

Термін "пептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Бажано, щоб пептиди були довжиною у 9 амінокислот, але можуть бути такими короткими, як довжиною у 8 амінокислот, і такими довгими, як довжиною у 10, 11, 12, 13 або 14 амінокислот.

Термін "олігопептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина олігопептиду не є критичною для цього винаходу за умови, що він містить правильний епітоп чи епітопи. Олігопептиди зазвичай коротші, ніж довжиною близько 30 амінокислотних залишків, і довші, ніж довжиною близько 14 амінокислотних залишків.

Термін "поліпептид" використовується для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина поліпептиду не є критичною для цього винаходу за умови, що він містить правильні епітопи. На відміну до термінів "пептид" і "олігопептид", під терміном "поліпептид" маються на увазі молекули, що містять більш ніж 30 амінокислотних залишків.

Пептид, олігопептид, білок або поліпептид, що кодує таку молекулу, має назву "імуногенного" (і, отже, є "імуногеном" в межах цього винаходу), якщо він здатний індукувати імунну відповідь. У межах цього винаходу імуногенність точніше визначається як здатність викликати відповідь Т-клітин. Отже, "імуногеном" може бути молекула, яка здатна індукувати імунну відповідь, і, що стосується цього винаходу, молекула, що здатна індукувати відповідь Т-клітин.

"Епітоп" Т-клітини потребує короткого пептиду, який зв'язаний із рецептором молекули МНС І класу, утворюючи потрібний комплекс (альфа-ланцюг молекули МНС І класу, бета-2-мікроглобулін і пептид), який може розпізнаватися Т-клітиною, що несе відповідний Т-клітинний рецептор, який зв'язується із комплексом МНС/пептид із належної афінності. Пептиди, які зв'язані з молекулами МНС І класу, зазвичай мають довжину 8–14 амінокислот, і, найбільш типово, довжину в амінокислот.

У цьому описі винахід описується з використанням раку як прикладу. Тим не менш, спосіб за винаходом може застосовуватися до інфекційних захворювань, аутоімунних захворювань і паразитарних інфекцій за умови, що відповідна імунна відповідь є відповіддю з залученням молекул МНС І класу.

Далі винахід буде описаний у вигляді прикладів, які, тим не менш, не є обмежувальними. У фігурах і переліках послідовностей, що наведені нижче:

на Фігурі 1 показана загальна оглядова схема експериментального підходу за цим винаходом.

На Фігурі 2 показаний порівнювальний МС-аналіз суміші TUMAP з концентрацією кожного TUMAP відповідно до таблиці 1, що дорівнює 10 фмоль. Кожний пептид дає відмінний від інших МС сигнал, що демонструє залежну від пептиду виявляємість. Пептид 5 не наведений у таблиці 1, тобто послідовності 1–4 таблиці 1 відповідають ідентифікаційним номерам № від 1 до 4 на Фігурі 2 і послідовностям 5–11 у таблиці 1 відповідають № від 6 до 12 на Фігурі 2.

Більш того, пептиди 19, 21 і 22 на Фігурі 2 не наведені у таблиці 2, тобто послідовності 13–18 на Фігурі 2 відповідають ідентифікаційним номерам № 12–17 у таблиці 2, послідовність 20 на Фігурі 2 відповідає № 18 у Таблиці 2 і послідовності 23–28 на Фігурі 2 відповідають № 19–24 у Таблиці 2.

На Фігурі 3 показаний принцип застосування методу внутрішнього стандарту. Калібрувальну криву отримали титруванням міченої ізотопом версії (виділеної світло-сірим кольором) TUMAP. Для всіх вимірювань методом МС постійну кількість міченої іншим ізотопом версії пептиду TUMAP як внутрішнього стандарту (виділеної темно-сірим кольором) додавали до зразків для МС. Функціональну залежність калібрувальної кривої розраховують із співвідношення МС сигналів методом логістичного регресійного аналізу. НМКВ визначають візуально з урахуванням відхилення від лінійності. Як "зразки для кількісного визначення" (виділені зеленим кольором) використовуються значення інтенсивності сигналу, виміряного на пухлинних зразках, вибраних для визначення абсолютної кількості пептидів TUMAP.

На Фігурі 4 наведена калібрувальна крива для HLA-A*02 пептидів TUMAP, вибраних для абсолютного кількісного визначення. Результати МС відповідних TUMAP у зразках пухлинної

тканини, використаних для аналізу абсолютного числа пептидів TUMAP на одну клітину ("зразки для кількісного визначення"), показані на кожному графіку.

На Фігурі 5 наведені додаткові калібрувальні криві для HLA-A*02 пептидів TUMAP, вибраних для абсолютного кількісного визначення. Результати МС відповідних TUMAP у зразках пухлинної тканини, використаних для аналізу абсолютного числа пептидів TUMAP на одну клітину ("зразки для кількісного визначення"), показані на кожному графіку.

На Фігурі 6 наведені калібрувальні криві для HLA-A*24 пептидів TUMAP, вибраних для абсолютного кількісного визначення. Результати МС відповідних TUMAP у зразках пухлинної тканини, використаних для аналізу абсолютного числа пептидів TUMAP на одну клітину ("зразки для кількісного визначення"), показані на кожному графіку.

На Фігурі 7 наведені калібрувальні криві для HLA-A*24 пептидів TUMAP, вибраних для абсолютного кількісного визначення. Результати МС відповідних TUMAP у зразках пухлинної тканини, використаних для аналізу абсолютного числа пептидів TUMAP на одну клітину ("зразки для кількісного визначення"), показані на кожному графіку.

На Фігурі 8 наведені розраховані значення варіації повторних вимірювань методом МС по всіх проаналізованих TUMAP. Кожна точка являє собою коефіцієнт варіації (KB у %) для повторних вимірювань методом МС окремих TUMAP у одному конкретному зразку тканини. Медіана KB по всіх TUMAP вважається середньою варіацією повторних вимірювань методом МС.

На Фігурі 9 показана ефективність виділення комплексу пептид-МНС. Ефективність виділення пептид-МНС була визначена на восьми A*02-позитивних зразках для A*02 пептидів TUMAP (A) і на шести A*24-позитивних зразках для A*24 пептидів TUMAP (B). Варіабельність ефективності виділення складає у середньому 24 % для A*02 пептидів TUMAP і 32 % для A*24 пептидів TUMAP, відповідно (C).

На Фігурі 10 наведений аналіз методів оцінки вмісту ДНК. А. Порівняння трьох різних методів інтерполяції числа клітин із даної кількості ДНК: з використанням стандартної кривої, отриманої на лініях пухлинних клітин (темно-сірий колір), із МКПК здорових донорів (сірий колір) і з використанням теоретичної ваги диплоїдного геному людини (світло-сірий колір). Реплікати біологічних зразків, тобто незалежно приготовані препарати лізату тканин із різних частин однієї пухлини, виділені сірим кольором. В. Графік стандартної кривої для МКПК, яка використовувалася для визначення загального числа клітин у зразках тканин, проаналізованих на абсолютну кількість пептидів TUMAP.

На Фігурі 11 показані результати визначення числа клітин, отриманих із твердих заморожених зразків тканини. Аналіз числа клітин у зразках A*02- і A*24-позитивних зразках пухлини (A) і розраховані значення варіації результатів аналізу числа клітин (B). Реплікати біологічних зразків виділені сірим кольором.

На Фігурі 12 наведені результати визначення кількості копій пептиду на одну клітину для HLA-A*02 пептидів TUMAP. Були проаналізовані вісім різних пухлин РШ, три з них у подвійних вимірюваннях (паралельні біологічні зразки згруповані і виділені сірим кольором). НМКВ стосується діапазону кількісного визначення в одному МС експерименті і екстраполюється на зразок- і TUMAP-специфічний НМКВ, тобто це найнижча кількість копій, яка піддається кількісному визначенню у конкретному зразку конкретного TUMAP (виділена сірим кольором).

На Фігурі 13 наведені додаткові результати визначення кількості копій пептиду на одну клітину для HLA-A*02 пептидів TUMAP. Були проаналізовані вісім різних пухлин РШ, три з них у подвійних вимірюваннях (паралельні біологічні зразки згруповані і виділені сірим кольором). НМКВ стосується діапазону кількісного визначення в одному МС експерименті і екстраполюється на зразок- і TUMAP-специфічний НМКВ, тобто це найнижча кількість копій, яка піддається кількісному визначенню у конкретному зразку конкретного TUMAP (виділена сірим кольором).

На Фігурі 14 наведені результати визначення кількості копій пептиду на одну клітину для HLA-A*24 пептидів TUMAP. Були проаналізовані шість різних пухлин РШ, три з них у подвійних вимірюваннях (паралельні біологічні зразки згруповані і виділені сірим кольором). НМКВ стосується діапазону кількісного визначення в одному МС експерименті і екстраполюється на зразок- і TUMAP-специфічний НМКВ, тобто це найнижча кількість копій, яка піддається кількісному визначенню у конкретному зразку конкретного TUMAP (виділена сірим кольором).

На Фігурі 15 наведені додаткові результати визначення кількості копій пептиду на одну клітину для HLA-A*24 пептидів TUMAP. Були проаналізовані шість різних пухлин РШ, три з них у подвійних вимірюваннях (паралельні біологічні зразки згруповані і виділені сірим кольором). НМКВ стосується діапазону кількісного визначення в одному МС експерименті і екстраполюється на зразок- і TUMAP-специфічний НМКВ, тобто це найнижча кількість копій, яка

піддається кількісному визначенню у конкретному зразку конкретного TUMAP (виділена сірим кольором).

На Фігурі 16 показані результати дослідження впливу додавання відомої кількості зразків вільних пептидів концентрацією 500 фмоль до препарату МНС/пептидний мономер. Вільні пептиди в аналізі не виявили суттєвого впливу на вказані пептиди.

На Фігурі 17 наведені результати перевірки відтворюваності виділення ДНК при використанні набору Qubit HS (з флуоресцентною індикацією) у порівнянні зі стандартною кривою. Зразки (ракові зразки, такі як НДРЛ) продемонстрували достатню гомогенність. ДНК виділяли з 3 аліквот по 50 мкл.

Послідовності від SEQ ID № 1 до 24 відповідають пептидам таблиць 1 і 2, які були вибрані для абсолютного кількісного визначення відповідно до прикладів.

Приклади

У наступних прикладах описаний спосіб за винаходом у контексті ТАА/раку. Цей винахід не обмежується наведеними прикладами, оскільки вони є лише переважними втіленнями винаходу. Для цілей цього винаходу всі цитовані джерела включені в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

Таблиця 1: HLA-A*02 пептиди TUMAP, вибрані для абсолютного кількісного визначення

Для абсолютного кількісного визначення були вибрані одинадцять пептидів.

Таблиця 1

№	Код пептиду	Послідовність
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	TLDPRSFL
9	HIF1A-001	ALDGFVMVL
10	MET-001	YVDPVITSI
11	CCNB1-002	ILIDWLVQV

Таблиця 2: HLA-A*24 пептиди TUMAP, вибрані для абсолютного кількісного визначення

Для абсолютного кількісного визначення були вибрані чотирнадцять пептидів. Як виявилось, властивості одного пептиду (PLK4-001) не є прийнятними для подальших досліджень. Для 13 пептидів, що залишилися, експерименти з абсолютного кількісного визначення були проведені.

Таблиця 2

№	Код пептиду	Послідовність
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	UCHL5-001	NYLPFIMEL
24	UQCRB-001	YYNAAGFNKL

Підрахунок числа копій пептиду TUMAP на одну клітину в зразках солідних пухлин потребує (поетапного) кількісного визначення

- a) виділених пептидів TUMAP,
 - b) втрат TUMAP під час виділення і
 - 5 c) числа клітин на зразку тканини, що аналізується.
- Огляд експериментальних підходів за цим винаходом наведений на Фігурі 1.
Кількісне визначення пептидів методом наноPX-МС/МС

Для точного кількісного визначення пептидів методом мас-спектрометрії спочатку необхідно отримати базові знання про специфічну для пептиду кореляцію кількості пептиду і МС сигналу. Як приклад, вимірювання за допомогою МС суміші пептидів з концентрацією кожного пептиду 10 фмоль виявляє існування значної різниці між рівнями МС сигналів різних пептидів (Фігура 2). Це також означає, що діапазон, у якому пептид можливо надійно кількісно визначити методом МС, залежить від характеристик кожного окремого пептиду.

Крім того, очікується, що лінійна кореляція між кількістю конкретного пептиду і МС сигналом спостерігається у певному діапазоні. У зв'язку з цим автори винаходу вирішили побудувати індивідуальні калібрувальні криві для кожного пептиду окремо. Діапазон кожної калібрувальної кривої був вибраний таким чином, щоб він відповідав не тільки індивідуальному діапазону кількісного визначення пептиду, але також діапазону МС сигналів для кожного пептиду у раніш проаналізованих зразках пухлин. Мета полягала в тому, щоб кожна калібрувальна крива охоплювала пептид-специфічний діапазон МС сигналів принаймні 80 % типових зразків, використаних авторами винаходу.

Для побудови точних калібрувальних кривих необхідний синтетичний стандарт, який має бути кількісно проаналізованим незалежним способом і повинен мати ті самі характеристики, що й природний TUMAP. Автори винаходу використовували подвійно мічені ізотопом версії пептидів TUMAP, тобто дві мічені ізотопом амінокислоти були введені під час синтезу TUMAP. Подвійно мічені версії можливо відрізнити від природного TUMAP по різниці у масі 12–18 дальтонів залежно від міченої амінокислоти. Окрім маси, мічення ізотопами не змінює властивостей пептиду у МС, тобто пептиди з однаковими послідовностями, але різними ізотопними мітками матимуть однакові інтенсивності МС сигналів (Anderson et al., 2012). Після синтезу подвійно мічені пептиди TUMAP були точно кількісно визначені аналізом на вміст азоту з метою встановити точну кореляцію між кількістю пептиду і МС сигналом.

Калібрувальні криві були зняті принаймні у трьох різних матрицях, тобто елюатах пептиду HLA з природних зразків, подібних до звичайних зразків для МС, і кожний препарат пройшов вимірювання у двох прогонах на мас-спектрометрі. Для компенсації будь-яких технічних відмінностей між МС вимірюваннями в усі вимірювання включали внутрішній стандарт пептиду. Співвідношення МС сигналів титрованих пептидів і фіксованого внутрішнього стандарту було нанесене на графік, і калібрувальна крива була розрахована методом логістичної регресії (Фігура 3). Нижня межа кількісного визначення (НМКВ) була визначена візуально з урахуванням відхилення від лінійності. Якщо відхилення від лінійності було неочевидним, як для пептиду FAP-003 (Фігура 4), для розрахунку НМКВ використовувалось середнє співвідношення найнижчих кількостей пептиду. Верхню межу кількісного визначення, тобто відхилення від лінійності при вищих концентраціях для жодної калібрувальної кривої досягнуто не було.

У реальних експериментах із кількісного визначення однакову кількість внутрішнього стандарту було додано до кожного зразка, як і при побудові калібрувальної кривої, і було розраховано співвідношення кількостей природного пептиду і внутрішнього стандарту пептиду. Цей "метод внутрішнього стандарту" є звичайним методом кількісного визначення білків на основі результатів МС, наприклад для аналізу біомаркерів у біологічних зразках (Sturm et al., 2012; Prasad and Unadkat, 2014; Sato et al., 2012). Калібрувальні криві і значення, виміряні на реальних зразках пухлин, наведені на Фігурі 4 і Фігурі 5 для HLA-A*02 і на Фігурі 6 і Фігурі 7 для HLA-A*24 для всіх пептидів TUMAP, вибраних для абсолютного кількісного визначення.

З метою оцінки варіації кількісних МС вимірювань був розрахований коефіцієнт варіації (КВ у %) вмісту пептидів для кожного МС зразка. Значення КВ для кожного МС зразка були нанесені на графік, і повну варіацію МС вимірювань оцінювали як медіанний КВ (Фігура 8).

Ефективність виділення комплексів пептид/МНС

Як і для кожного процесу очищення білків, виділення білків із зразків тканини пов'язано з певними втратами білка, що вивчається. Для визначення ефективності виділення TUMAP були отримані комплекси пептид-МНС для всіх пептидів TUMAP, вибраних для абсолютного кількісного визначення. Щоб розрізнити комплекси пептид-МНС, до яких вводили стандартні добавки, і комплекси з природними пептидами, були використані версії TUMAP із однократним міченням ізотопом, тобто одна мічена ізотопом амінокислота була введена під час синтезу

TUMAP. Ці комплекси були додані як стандартні добавки до свіжеприготованих лізатів тканин, тобто у найранішній можливій точці процедури виділення TUMAP, а потім уловлені у вигляді комплексів природний пептид-MHC у подальшому афінному очищенні. Таким чином, вимірювання ступеня вилучення однократно мічених TUMAP дозволяє зробити висновки щодо ефективності виділення індивідуальних природних TUMAP.

Ефективність виділення визначали у 13 зразках, які були вибрані для абсолютного кількісного визначення пептидів TUMAP (7 HLA-A*02-позитивних, 5 HLA-A*24-позитивних і 1 HLA-A*02/A*24 подвійно позитивний зразок). Вісім A*02-позитивних зразків аналізували на ефективність виділення A*02 пептидів TUMAP, а шість A*24-позитивних зразків – A*24 пептидів TUMAP (Фігура 9 A, B). Результати свідчать, що для більшості пептидів ефективність виділення є порівнянною для різних зразків тканин. Навпаки, ефективність виділення індивідуальних пептидів є різною. Це наводить на думку, що ефективність виділення, хоча й визначена лише у невеликій кількості зразків тканин, можна екстраполювати на будь-який інший тканинний препарат. Однак є необхідним аналізувати кожний TUMAP індивідуально, оскільки ефективність виділення неможливо екстраполювати з одного пептиду на інші.

У рідких випадках ефективність виділення є винятково високою і (або) сильно розрізняється, наприклад для пептиду NCAPG-001 (Фігура 9 A). У випадках, коли ефективність неможливо визначити, наприклад, через труднощі з кількісним визначенням в залежності від природи пептиду (наприклад, високий рівень НМКВ для пептидів CCNB1-002, ASPM-001), або якщо розрахунок давав значення для ефективності, вищі за 100 %, автори винаходу приймали значення ефективності виділення рівним 100 %. Цей підхід є консервативним, найбільш ймовірно, що він дає завищені результати для ефективності виділення і кінець кінцем приводить до заниження числа копій пептиду на одну клітину.

Для оцінки варіації у ефективності виділення TUMAP був побудований графік для коефіцієнта варіації (KB у %) для виділення індивідуальних пептидів TUMAP із 6–8 зразків (Фігура 9 C). У результаті, середня варіація для A*02 пептидів TUMAP складає 24 % і для A*24 пептидів TUMAP – 32 %, відповідно.

Визначення числа клітин у твердій замороженій тканині

Іншим критичним фактором при розрахунку числа копій пептиду на одну клітину є оцінювання загального числа клітин у зразках тканин, використаних для виділення пептидів TUMAP. Автори винаходу вирішили використовувати аналіз вмісту ДНК, оскільки цей метод є застосовним до широкого діапазону зразків різного походження і, що найбільш важливо, до заморожених зразків (Forsey and Chaudhuri, 2009; Alcoser et al., 2011; Alcoser et al., 2011; Silva et al., 2013).

З урахуванням внутрішньопухлинної гетерогенності, необхідно визначити число клітин із ділянки тканини, яка є репрезентативною для всього зразка тканини, використаного для виділення TUMAP. Тканинний лізат, приготований під час виділення TUMAP, є прийнятним зразком для аналізу ДНК, оскільки він є більш гомогенним у порівнянні з фракцією твердої тканини. Після виділення ДНК сумарну концентрацію ДНК кількісно визначають в аналізі на основі флуоресценції (Life Technologies, набір Qubit HS для визначення ДНК) і розраховують сумарний вміст ДНК у зразках.

Для розрахунку числа клітин з даної кількості ДНК автори винаходу брали до уваги два різні підходи. По-перше, число клітин можливо підрахувати з використанням теоретичної маси геному людини, який, за оцінками, становить приблизно 6,67 пг ДНК на диплоїдний геном (Alcoser et al., 2011; Konigshoff et al., 2003). Як альтернатива, зразки з відомою кількістю клітин можна використовувати для побудови стандартної кривої ДНК тими самими методами, які використовувалися для зразків тканин. Цей метод вже компенсує будь-які впливи процедур виділення і кількісного визначення ДНК, у такий спосіб покращуючи точність результатів авторів винаходу. Автори винаходу побудували дві різні стандартні криві, одну з семи різних ліній пухлинних клітин, а іншу – з мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) шести різних здорових донорів.

Для порівняння усіх трьох методів оцінювання (теоретичного, через масу ДНК, і по двом різним стандартним кривим на основі клітин) кількість клітин на 1 г тканини була розрахована для декількох зразків (Фігура 10 A). Розрахунки на основі результату для стандарту клітинних ліній дають суттєво нижчі числа клітин (максимальне заниження у 3,6 разів) у порівнянні зі стандартом МКПК. Це було очікуваним, зважаючи на те, що для ліній пухлинних клітин спостерігалися вищі долі анеуплоїдних клітин з вищим вмістом ДНК у порівнянні зі здоровими диплоїдними МКПК. З літератури відомо, що доля диплоїдних пухлин шлунка лежить у діапазоні від 25 до 67 %, залежно від дослідження (Hiyama et al., 1995; Tamura et al., 1991; Wiksten et al., 2008; Zhang et al., 2005; Sugai et al., 2005). Оскільки плоїдність і частка анеуплоїдних клітин у

зразках тканини невідомі, обидві стандартні криві можуть дати лише приблизну оцінку істинного числа клітин, але не враховують усіх властивостей індивідуального зразка тканини. Іншим джерелом варіабельності є невідомий статус проліферації у зразку тканини або присутність некротичних клітин. Зокрема, подвоєння вмісту ДНК у клітинах, що проліферують, підвищує кількість ДНК по відношенню до числа клітин і призводить у зв'язку з цим до спотворення результатів розрахунку числа клітин. Розрахунок авторами винаходу з використанням усіх трьох підходів для двох зразків нормальної тканини шлунка призвів до нижчої кількості клітин на 1 г тканини ніж у зразках пухлини.

У ролі консервативного підходу автори винаходу вирішили використовувати стандартну криву для МКПК (Фігура 10 В), що може призвести до отримання завищеного числа клітин у частині гіпердиплоїдних зразків тканини, що призведе до заниження числа копій пептиду на одну клітину у таких зразках, але ніколи не призведе до завищеного їх числа у будь-якому зразку.

З метою проведення аналізу зразків тканин, вибраних для абсолютного кількісного визначення пептидів TUMAP, автори винаходу виділили ДНК із 2–3 аліквот тканинного лізату, і кожний препарат ДНК був кількісно проаналізований у 2–3 реплікатах флуоресцентними методами. Загальне число клітин і число клітин на 1 г тканини розраховували з сумарного вмісту ДНК з використанням стандартної кривої для МКПК (Фігура 11 А). Щоб отримати оцінку повної варіації для аналізу числа клітин, спочатку визначили коефіцієнт варіації (у %) на рівні кожного зразка або реплікату біологічного зразка, якщо такий є (тобто незалежно отримані препарати тканинного лізату з різних ділянок однієї і тієї ж самої пухлини). У цьому розрахунку врахована варіація між аліквотами тканинного лізату, а також повторні вимірювання методом флуоресцентного аналізу. Ці КВ показані на Фігурі 11 В, і повну варіацію визначали у вигляді медіани зображених КВ. Варіабельність може частково пояснити тим, що тканинні лізати не повністю гомогенізовані, тобто частки тканин, що залишилися, які містять недисоційовані клітини, є причиною завищеного числа клітин для індивідуальних реплікатів, отриманих при виділенні (див., наприклад, GC816Т на Фігурі 11 А).

Кількість копій пептиду на одну клітину

Маючи дані кількісного визначення пептидів методом наноРХ-МС/МС ("загальний пептид"), ефективність виділення пептидів TUMAP («% ефективності виділення») і число клітин кожного наявного пухлинного зразка, можливо розрахувати кількість копій TUMAP на одну клітину згідно з такою формулою:

Кількість загального пептиду розраховується з результату 2–4 експериментів методом наноРХ-МС/МС ("пептид/прогін [фмоль]») з використанням калібрувальних кривих, наведених на Фігурах 4–7.

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

(2)

де:

total peptide	загальний пептид
peptide	пептид
run	прогін
fmol	фмоль
mol	моль
peptide eluate	пептидний елюат
μl	мкл
MS	МС
sample per run	зразок на прогін
% of lysate used for TUMAP isolation	% лізату, використаного для виділення пептидів TUMAP

Для розрахунку абсолютної кількості копій пептиду використовувались тільки результати МС вимірювань, вищі за НМКВ, який визначається з калібрувальних кривих. Ця НМКВ стосується кількості TUMAP згідно з результатами експерименту методом наноРХ-МС/МС ("НМКВ/прогін [фмоль]»)

Кількість копій на клітину для всіх пептидів, які можуть бути кількісно проаналізовані, лежить у діапазоні від 50 до 30 000 копій на клітину (див. Таблицю 3).

Таблиця 3: Зведення показників кількості копій на клітину для HLA-A*02 і HLA-A*24 пептидів TUMAP

5 HLA-A*02 пептиди TUMAP були проаналізовані у восьми зразках, HLA-A*24 пептиди TUMAP – у шести зразках. nq – не були кількісно визначені, оскільки кількість пептиду була нижчою за НМКВ

Таблиця 3

Алель HLA	Код пептиду	Кількісно визначений у "n" зразків (% від проаналізованих зразків)	Число копій на клітину (діапазон індивідуальних зразків і реплікатів біологічних зразків)
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

3 метою візуалізувати НМКВ у контексті "кількості копій пептиду на клітину" була розрахована "НМКВ на клітину" для кожного TUMAP у кожному зразку за допомогою двох наведених вище формул. Оскільки зразки відрізняються у загальному числі клітин, НМКВ на клітину для кожного зразка своя (див. Фігуру 12 і Фігуру 13 для A*02 пептидів TUMAP і Фігуру 14 і Фігуру 15 для A*24 пептидів TUMAP).

Оцінювання похибки абсолютного кількісного визначення пептидів TUMAP

15 Для оцінювання варіації абсолютного кількісного визначення пептидів TUMAP автори винаходу брали до уваги відносну варіацію трьох основних експериментальних результатів, як це було описано вище:

- a) кількості виділених пептидів TUMAP: відносне відхилення 1,8 % (A*02) і 2,1 % (A*24)
- b) ефективності виділення пептидів TUMAP: відносне відхилення 24 % (A*02) і 32 % (A*24)
- c) числа клітин у зразку тканини: відносне відхилення 27 %.

20 Приймаючи нормальний розподіл значень для змінних, відносну похибку (σ) "кількості копій на клітину" можна розрахувати як квадратний корінь із суми квадратичних відносних похибок кожної змінної:

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

25

де:

copies	копій
total cell count	загального числа клітин
total peptide	загального пептиду

isolation efficiency	ефективності виділення
----------------------	------------------------

Із значень, наведених вище, коефіцієнт варіації абсолютної кількості копій пептиду на клітину становить приблизно 36 % для пептидів, які зв'язуються з HLA-A*02, і 42 % для пептидів, які зв'язуються з HLA-A*24. Щоб отримати уявлення про варіацію результатів, були розраховані абсолютні і відносні похибки кількості копій пептиду на клітину для модельного пептиду і зразка (Таблиця 4).

Таблиця 4: Типові результати розрахунку абсолютної і відносної похибки абсолютного кількісного визначення пептидів TUMAP для модельного пептиду

Таблиця 4

	значення	A*02		A*24	
		відн. похибка (%)	абс. похибка (%)	відн. похибка (%)	абс. похибка (%)
Загальне число клітин/зразок	1×10 ⁸	27 %	-	27 %	-
Загальний пептид [фмоль]	16,25	1,8 %	-	2,1 %	-
Ефективність виділення комплексу пептид-МНС	10 %	24 %	-	32 %	--
Кількість копій пептиду на одну клітину	1000	36 %	360	42 %	420

Розрахунки згідно цієї моделі дають підстави для припущення, що для комплексного багатоетапного процесу аналізу абсолютного кількісного визначення варіабельність результатів все ще знаходиться у прийнятному діапазоні. Для індивідуальних TUMAP відносна похибка може відхилятися від усереднених значень для похибки, що розраховані у цьому документі. Кількості копій пептидів TUMAP на клітину можна кількісно порівняти для різних TUMAP, що дозволяє встановити пріоритет для пептидів TUMAP з метою вибору прийнятних мішеней для антитіл і (або) розчинних Т-клітинних рецепторів.

Порівняння способу абсолютного кількісного визначення пептидів TUMAP з відомими опублікованими способами

До сих пір не було свідчень про правильний підхід до визначення абсолютної кількості копій пептидів, асоційованих з молекулами МНС, на клітину. Найбільш важливо, що у раніш опублікованих способах кількісного визначення зв'язаних із молекулами МНС пептидів з використанням МС аналізу не враховувалася втрата антигену під час підготовки зразка (Tan et al., 2011; Hogan et al., 2005). Група дослідників на чолі з Peter A. von Velen нещодавно опублікувала відомості про спосіб "точного визначення кількості зв'язаних із молекулами МНС пептидів" (Hassan et al., 2014). У цьому технічному посібнику використовували підхід для кількісного визначення двох мінорних антигенів гістосумісності, LB-NISCH-1A і LB-SSR1-1S, на клітинах EBV-LCL JYpp65. Однак окремі експериментальні етапи суттєво відрізнялися, що зведено у наведеній нижче таблиці:

Таблиця 5: Порівняння способу кількісного визначення пептидів TUMAP за Hassan і співавт. і за цим винаходом

Таблиця 5

	Hassan і співавт.	цей винахід
Калібрувальні криві для пептидів	Використовувалася тільки для визначення діапазону лінійності, з припущенням, що всі пептиди мають однакову кореляцію МС сигналу з кількістю пептиду (нахил графіку = 1)	Для визначення діапазону лінійності, НМКВ і для кількісного визначення пептидів; враховує пептид-специфічну кореляцію МС сигналу з кількістю для кожного індивідуального пептиду
Кількісне визначення пептидів	Калібрування за однією точкою: відношення сигналу до сигналу доданого стандарту пептиду	Метод внутрішнього стандарту, що ґрунтується на пептид-специфічній калібрувальній кривій, кількісне визначення поблизу НМКВ

	Hassan і співавт.	цей винахід
Ефективність виділення	комплексів пептид-МНС, доданих як стандартні добавки до лізату після 2 годин лізису і розділення центрифугуванням, не враховує втрати пептиду на цих етапах	комплексів пептид-МНС, доданих як стандартні добавки безпосередньо після гомогенізації тканини, тобто у найбільш ранній точці процедури виділення пептидів
Зразки	Клітинна лінія	Тканина солідної пухлини
Підготовка зразка	Додаткова стадія хроматографування, яка використовується для зниження рівня складності зразка, на сорбенті C18 перед кінцевою наноРХ-МС/МС	Безпосереднє використання зразка після імунопреципітації і фільтрації у наноРХ-МС/МС
Визначення числа клітин	Підрахунок клітин під час приготування клітинного осаду	Аналіз вмісту ДНК у лізаті твердих тканин
Розрахунок похибок	Враховується тільки варіація повторних вимірювань методом МС (КВ 0,1–7,1 %), але не варіація виділення комплексу пептид-МНС (26 % і 91 %, відповідно) і підрахунку клітин.	Враховуються варіації повторних вимірювань методом МС (КВ у середньому 1,8–2,1 %), ефективності виділення комплексу пептид-МНС (КВ у середньому 24–32 %) і визначення числа клітин (КВ у середньому 27 %).

Кількість копій обох пептидів, проаналізованих Hassan і співавт., лежала у діапазоні від 800 до 5300 (відносне відхилення 74 %) і від 3000 до 12 000 (відносне відхилення 60 %) копій на клітину серед реплікатів біологічних зразків, відповідно. Причина цих варіацій не була ясно обговорена, але може бути пов'язана з використанням різних приладів для МС.

Таким чином, очікується, що більш досконалий спосіб за цим винаходом зробить свій внесок в отримання більш точних і більш надійних результатів.

Кількісне визначення пептидів, що мають невелику кількість копій

З метою продемонструвати широкі можливості застосування способу за винаходом були отримані дані, наведені нижче у таблиці. Були ідентифіковані пептиди, які присутні у лише дуже невеликих кількостях копій, і серед них пептид PDE11-001. Можна побачити, що цей спосіб дозволяє визначити настільки невеликі кількості, як 10 копій пептиду на клітину.

Таблиця 6: Кількісне визначення пептидів, що мають невелику кількість копій

РПМЗ – рак передміхурової залози – послідовність PDE11-001 є такою: ALLESRVNL (SEQ ID № 25)

Таблиця 6

Код пептиду	Кількість копій на клітину			Кількість зразків			Джерело/HLA
	Мін.	Медіана	Макс.	> НМКВ	> МВ	оцінюваних	
Пептид 1	20	20	20	1	5	16	NSCLC/A*02
Пептид 2	10	30	300	13	16	17	NSCLC/A*02
Пептид 3	10	30	50	4	10	18	NSCLC/A*02
Пептид 4	10	30	100	17	17	19	NSCLC/A*02
Пептид 5	20	20	90	7	8	11	NSCLC/A*02
Пептид 6	10	20	50	6	6	10	NSCLC/A*02
Пептид 7	< 10	30	200	9	12	15	PC/A*02
PDE11-001	< 10	10	30	8	9	10	PC/A*02

PDE11-001 є пептидом, що зв'язується з HLA-A*02, його отримують із фосфодієстерази 11A (PDE11A), яка каталізує гідроліз цАМФ і цГМФ, у такий спосіб пригнічуючи відповідні сигнальні шляхи. Мутації PDE11A пов'язані з адренокортикальною гіперплазією, а також із сімейними герміногенними пухлинами яєчка. Цей пептид був виявлений на зразках ракових пухлин передміхурової залози, а також у гепатоцелюлярній і нирковоклітинній карциномі і карциномі підшлункової залози, але не на будь-яких нормальних тканинах.

Цитовані посилання

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.

10 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.

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.

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.

25 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.

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.

40 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.

45

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

50 1. Спосіб визначення абсолютної кількості одного пептидного ліганду МНС на клітині, де згаданий спосіб включає:

а) приготування клітин, що презентують згаданий пептидний ліганд МНС, із біологічного зразка, вибраного із зразка тканини, зразка крові, зразка пухлини або зразка інфікованої тканини, яка містить вказані клітини, що включає ферментативне розщеплення тканин і (або) лізис клітин,

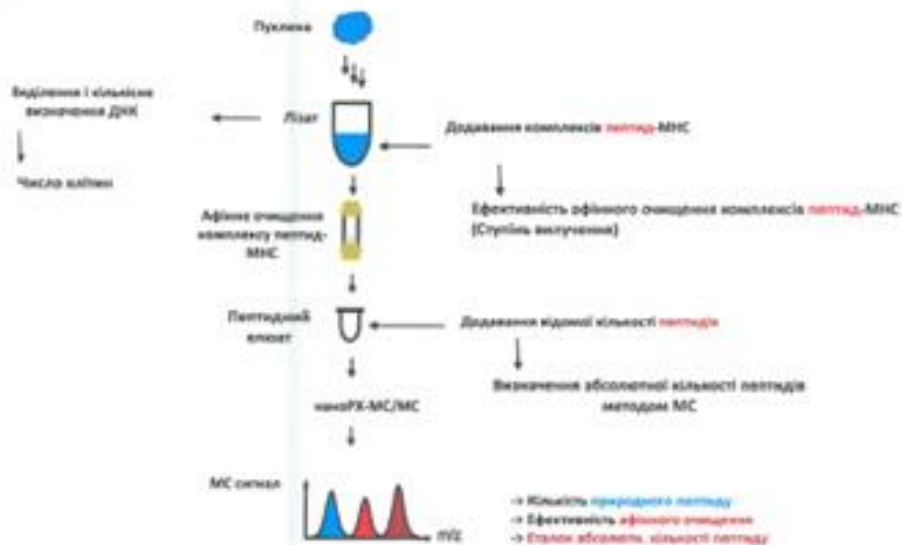
55 б) визначення числа клітин у згаданому препараті за етапом а), що включає підрахунок ядер клітин, фотометричне визначення ДНК, флуориметричне визначення ДНК або кількісної ПЛР,

с) додавання відомої кількості пептидного ліганду МНС і (або) комплексу пептидного ліганду з МНС, який необхідно кількісно визначити, до згаданого препарату за етапом а) ("добавка І"),

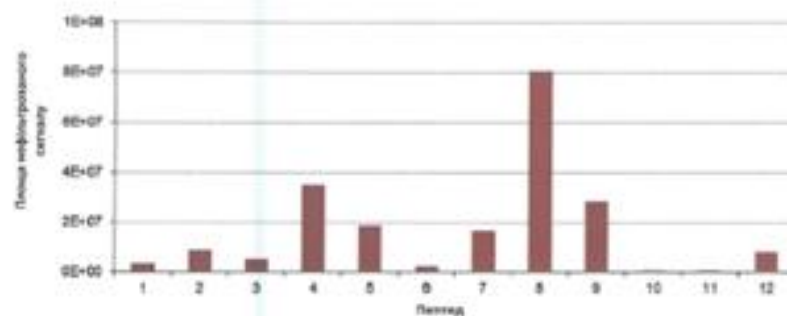
60 д) виділення пептидного ліганду МНС зі згаданого препарату за етапом с) для отримання пептидного елюату,

- е) додавання відомої кількості пептидного ліганду МНС, який необхідно кількісно визначити, до згаданого пептидного елюату ("добавка ІІ") як внутрішнього калібратора,
- ф) проведення аналізу методом мас-спектрофотометрії згаданого пептидного ліганду МНС для отримання:
- 5 аа) сигналу для ефективності виділення на етапі d),
 bb) сигналу для внутрішнього калібратора з етапу е), і
 cc) сигналу для згаданого пептидного ліганду МНС із згаданих приготованих клітин за етапом а), і
 - 10 g) кількісне визначення згаданого пептидного ліганду МНС на основі порівняння сигналів, що отримані на етапі f), з
 aa) отриманим числом клітин,
 bb) відомою кількістю згаданого пептидного ліганду МНС і (або) комплексу пептиду з МНС, який необхідно визначити, що доданий на етапі с), і
 cc) відомою кількістю пептидного ліганду МНС, який необхідно визначити, що доданий на етапі е), де кількісне визначення включає обчислення співвідношення між сигналами внутрішнього калібратора з етапу е) та ізольованого пептидного ліганду МНС, і порівняння співвідношення із встановленою калібрувальною кривою пептидного ліганду МНС, і
 де кількісне визначення додатково включає побудову пептид-специфічної калібрувальної кривої на основі співвідношення із внутрішнім калібратором, який використовується у тій же кількості,
 - 20 та визначення найнижчого рівня кількісного визначення (LLOQ) для згаданого пептидного ліганду МНС, який має бути кількісно визначений, за допомогою чого досягається визначення абсолютної кількості пептидного ліганду МНС на клітині для пептидного ліганду МНС, якщо кількісно визначена кількість перевищує визначений LLOQ.
 - 25 2. Спосіб за п. 1, де згаданий пептидний ліганд МНС вибраний із пухлиноасоційованого пептиду (ТАА) або асоційованого з захворюванням пептиду (DAA).
 3. Спосіб за п. 1 або п. 2, що додатково включає визначення кількості принаймні одного типу молекул HLA у згаданому препараті на етапі а).
 4. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, де доданий комплекс пептиду з МНС і (або) доданий пептидний ліганд МНС є міченими, і переважно міченими різними ізотопами.
 - 30 5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, де виділення включає хроматографію, таку як афінну хроматографію.
 6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, що додатково включає вибір надмірно презентованих, надмірно експресованих і (або) пухлиноспецифічних пептидних лігандів МНС для аналізу.
 7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, де згаданий спосіб можливо здійснити або здійснюється на високопродуктивному рівні.
 - 35 8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, де згаданий спосіб складається з етапів, як зазначено.
 9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, де згаданий(і) біологічний(і) зразок(ки) отриманий(і) від одного індивіда або від групи індивідів, що страждають від одного й того самого медичного відхилення.
 10. Спосіб за п. 9, що додатково включає етап отримання персоналізованого профілю лігандів МНС, переважно персоналізованого специфічного для захворювання профілю лігандів МНС, виходячи із вмісту згаданих пептидних лігандів МНС, який був кількісно визначений.
 - 40

Фігура 1

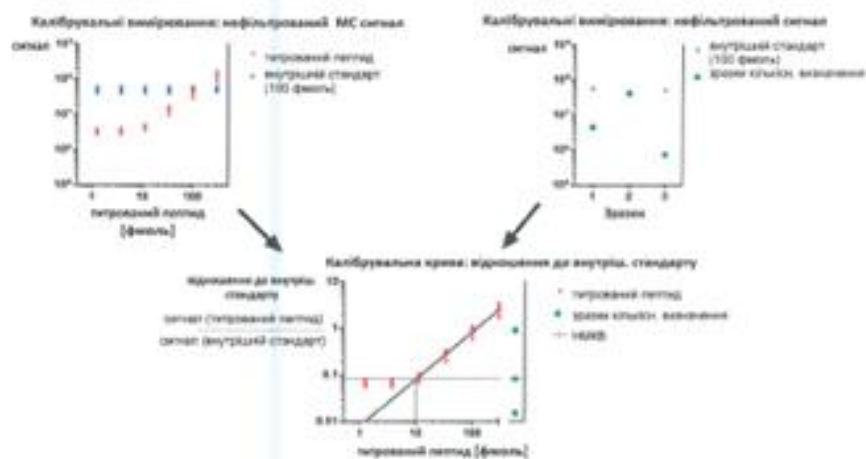


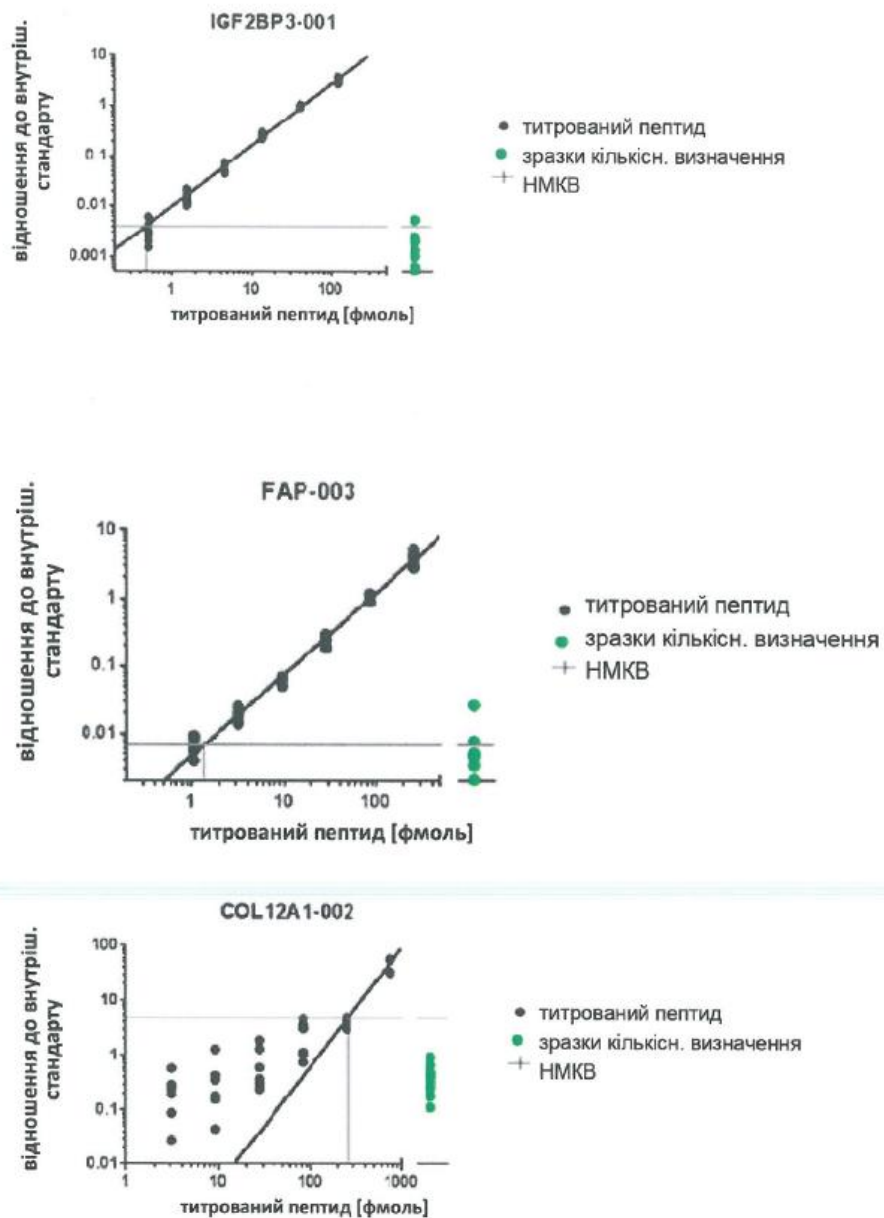
Фігура 2



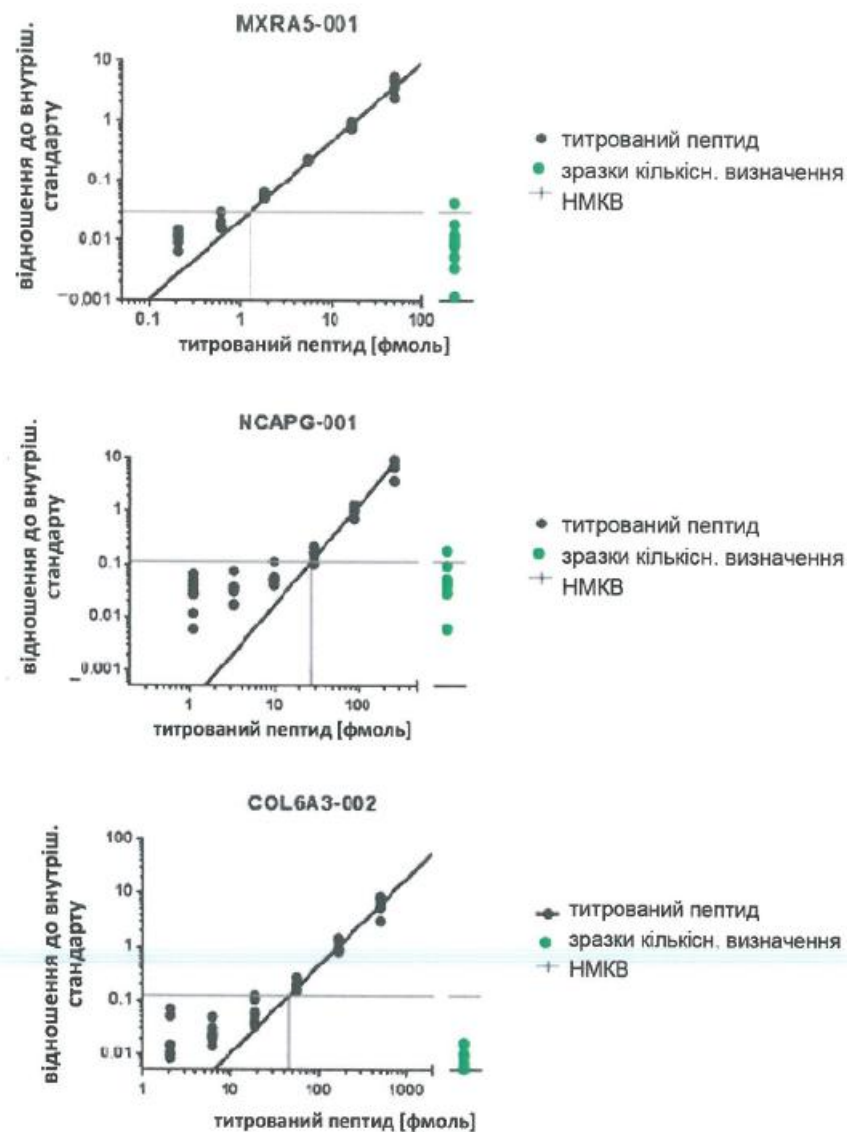
- 3 -

Фігура 3

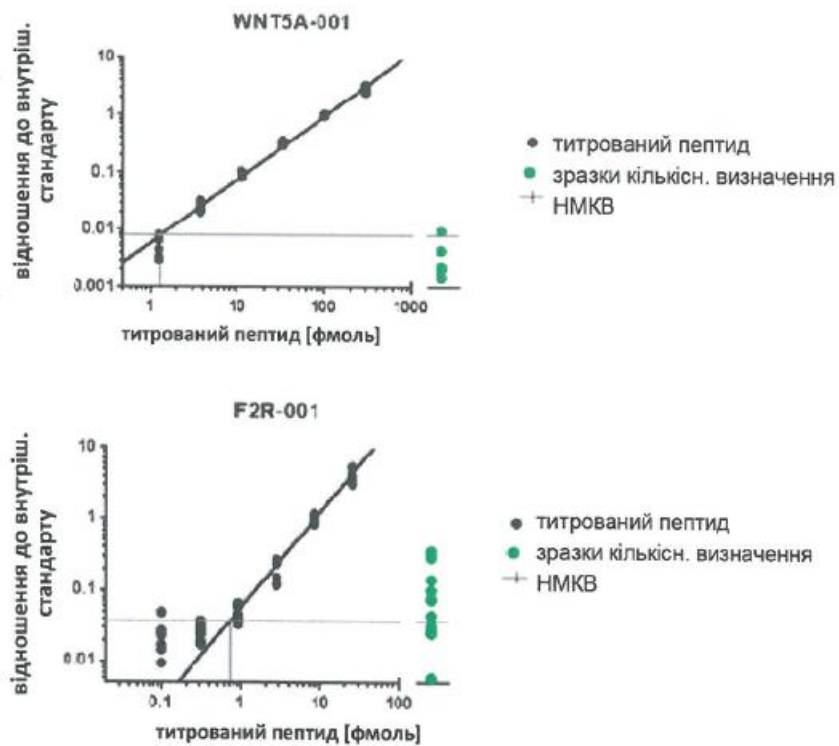




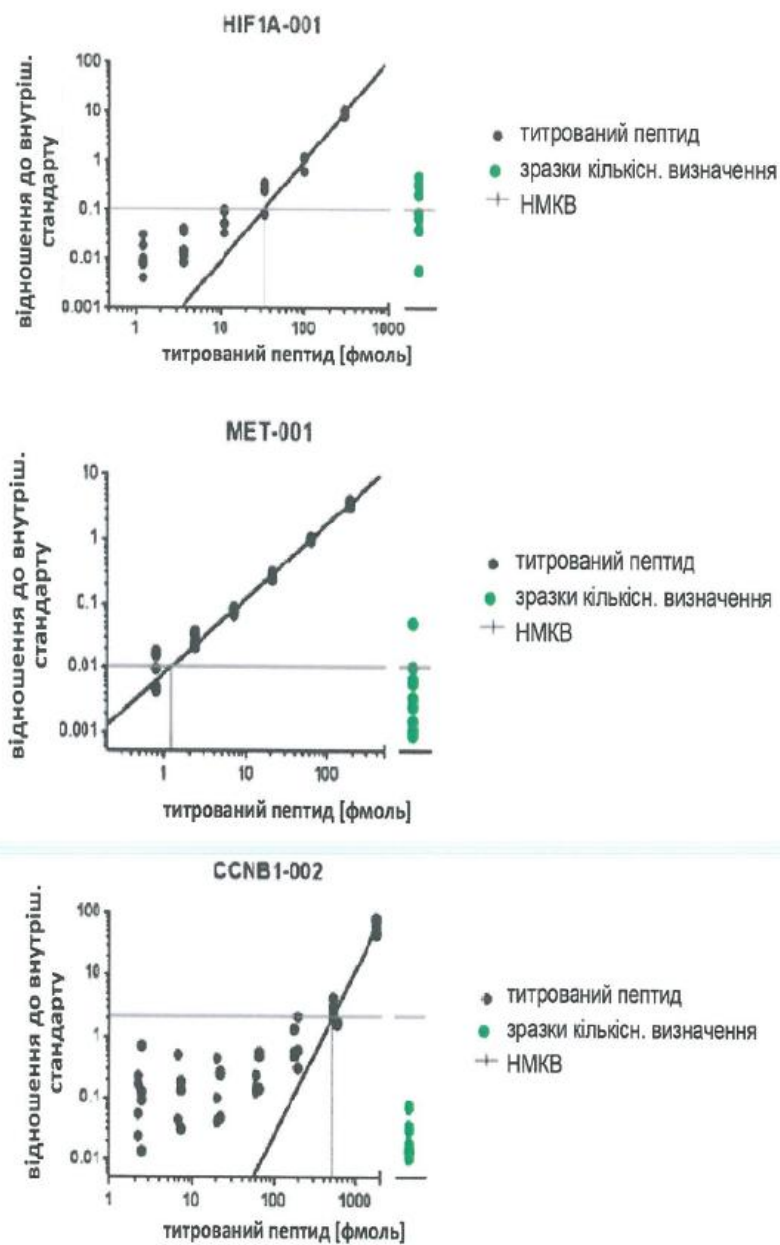
Фігура 4



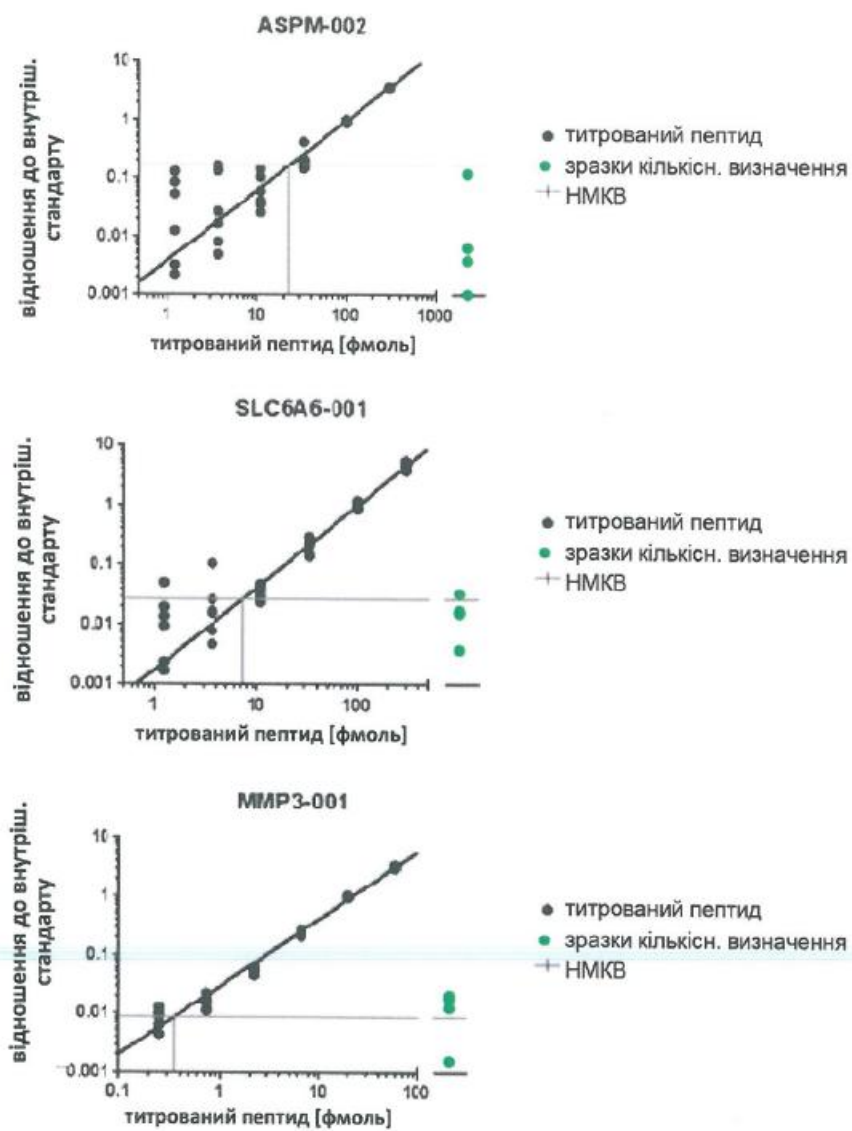
Фігура 4 (продовження)



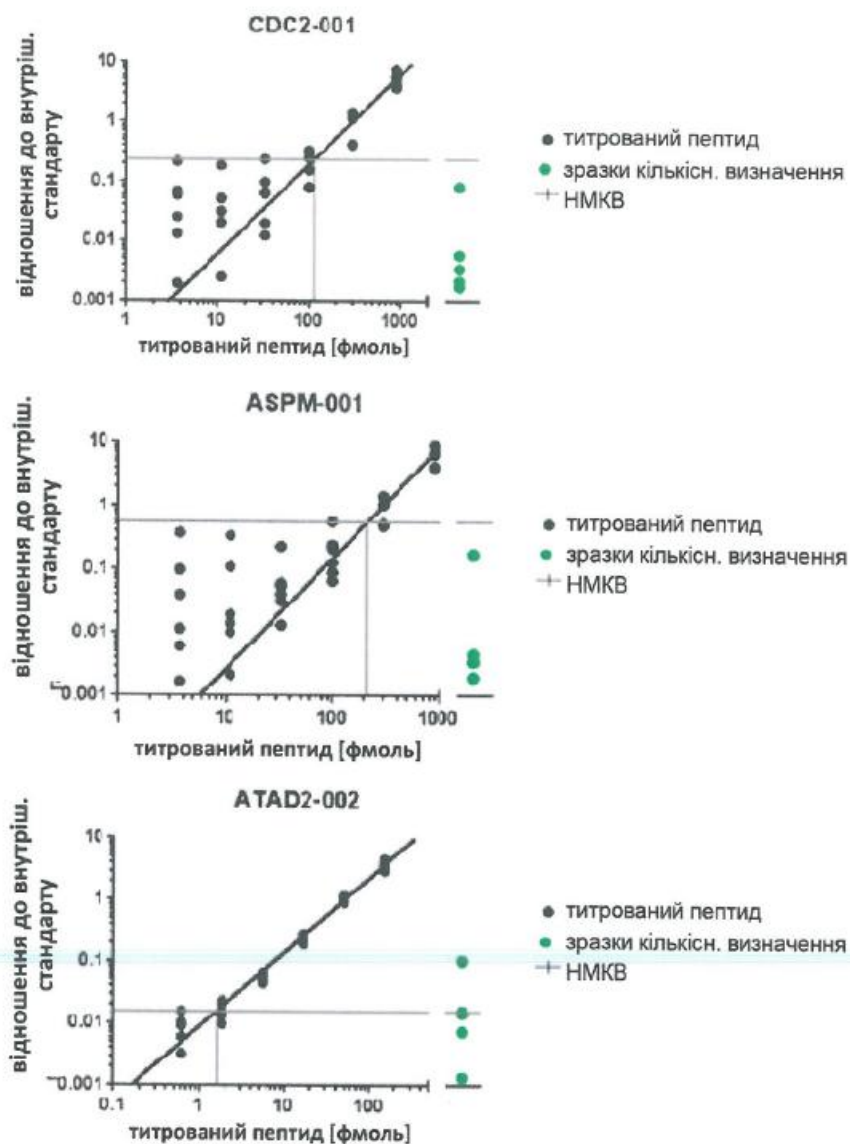
Фігура 4 (закінчення)



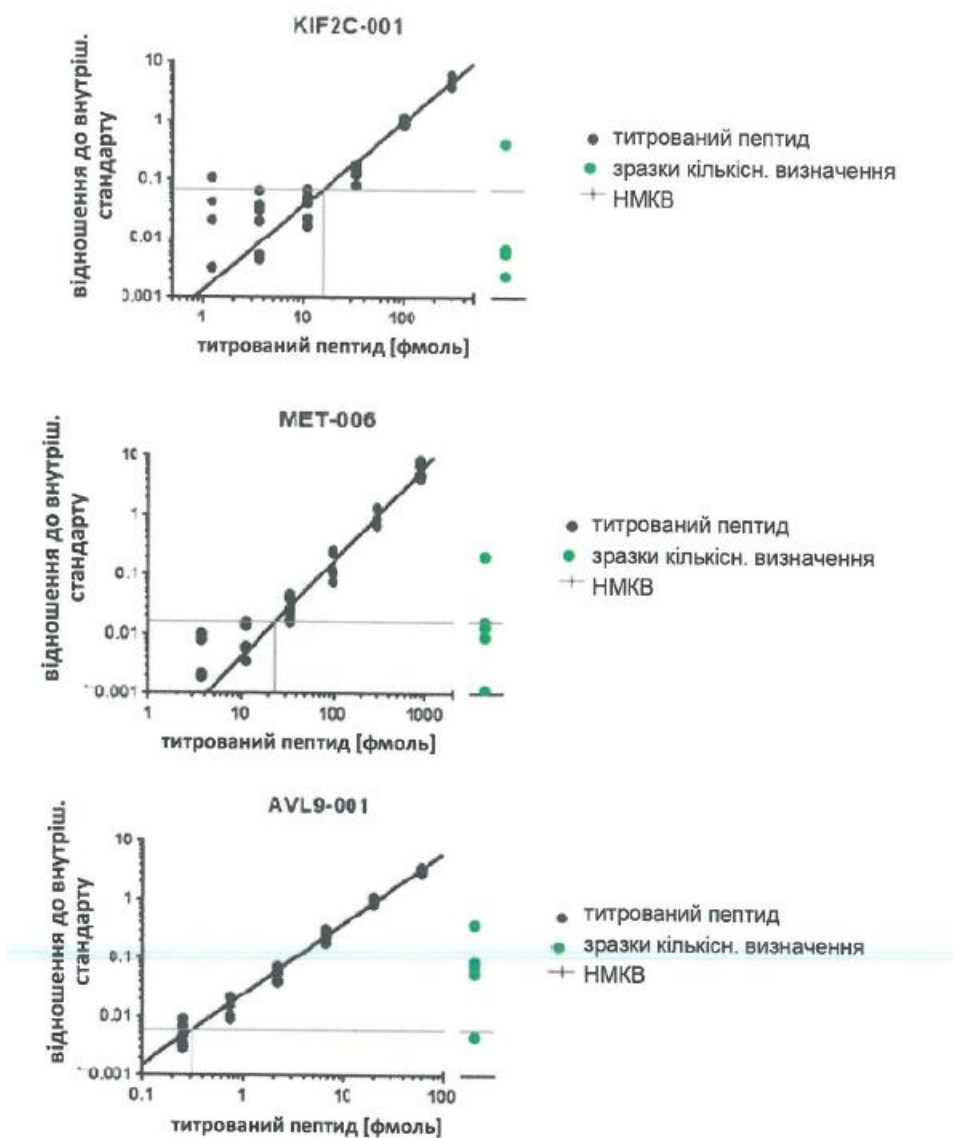
Фігура 5



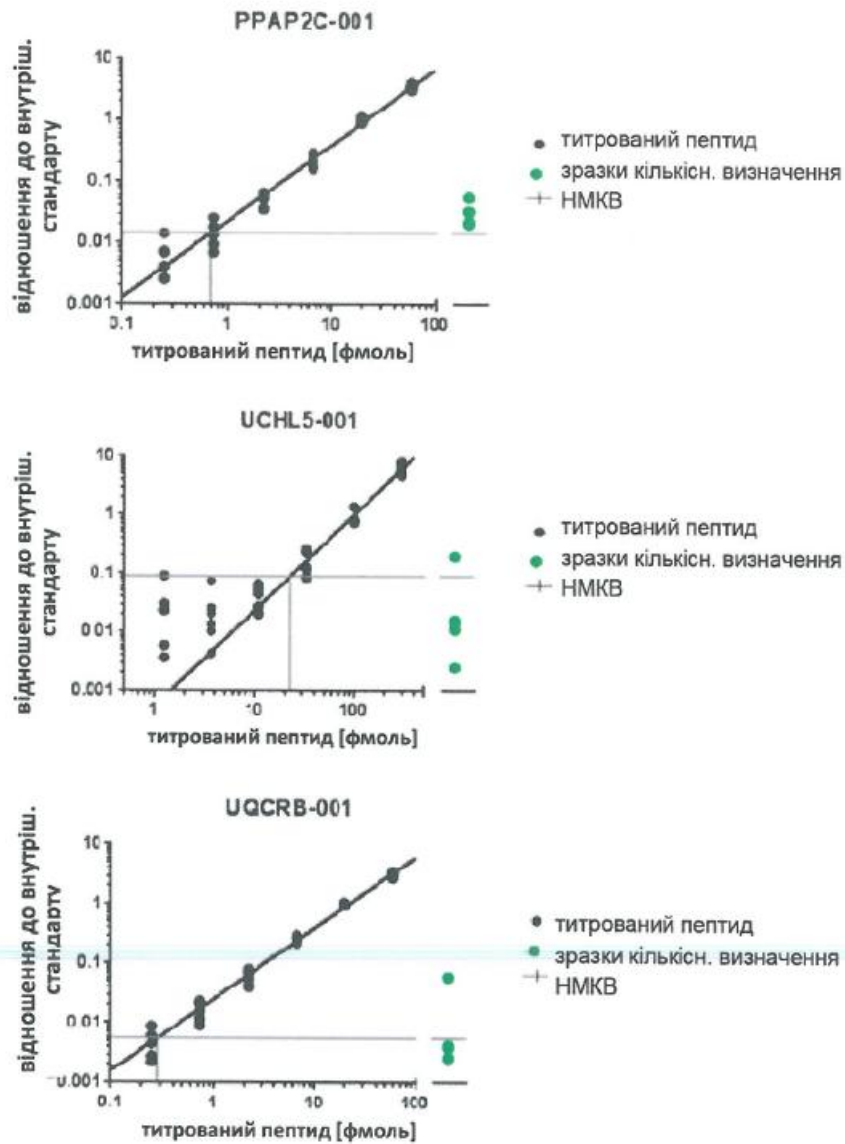
ФІГУРА 6



Фігура 6 (закінчення)

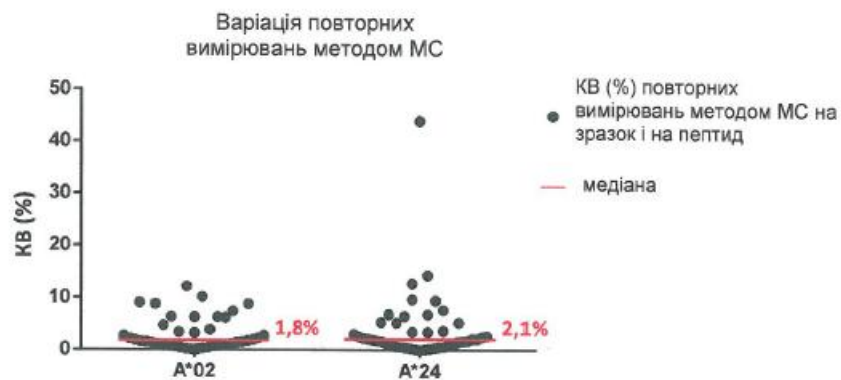


Фігура 7

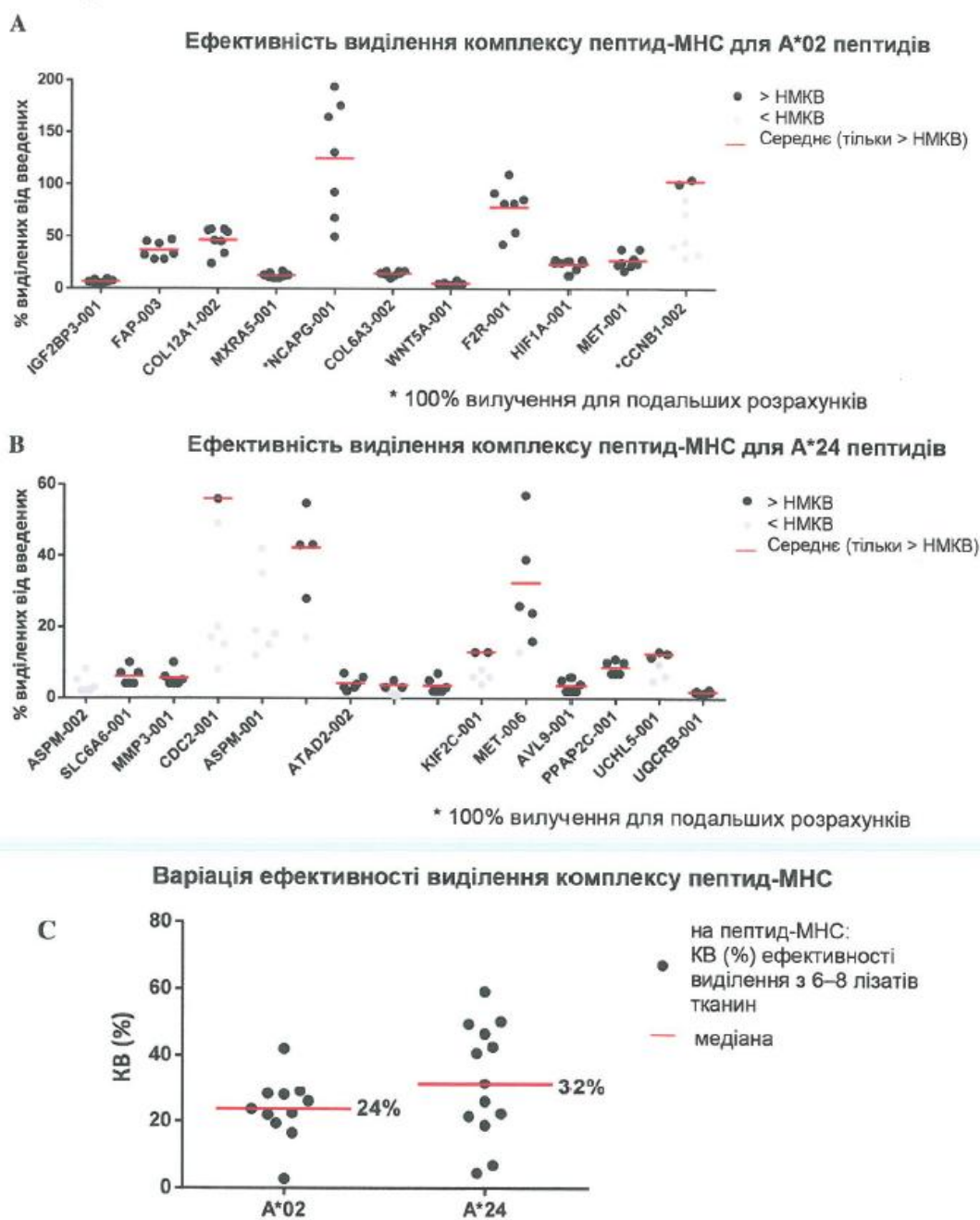


Фігура 7 (закінчення)

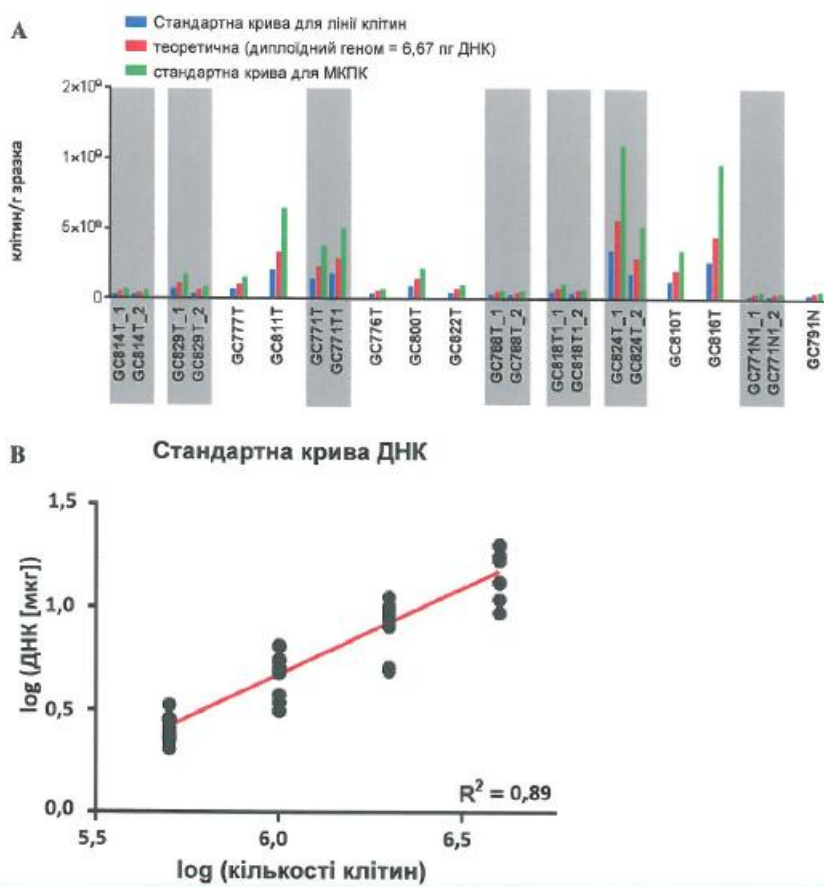
Фігура 8



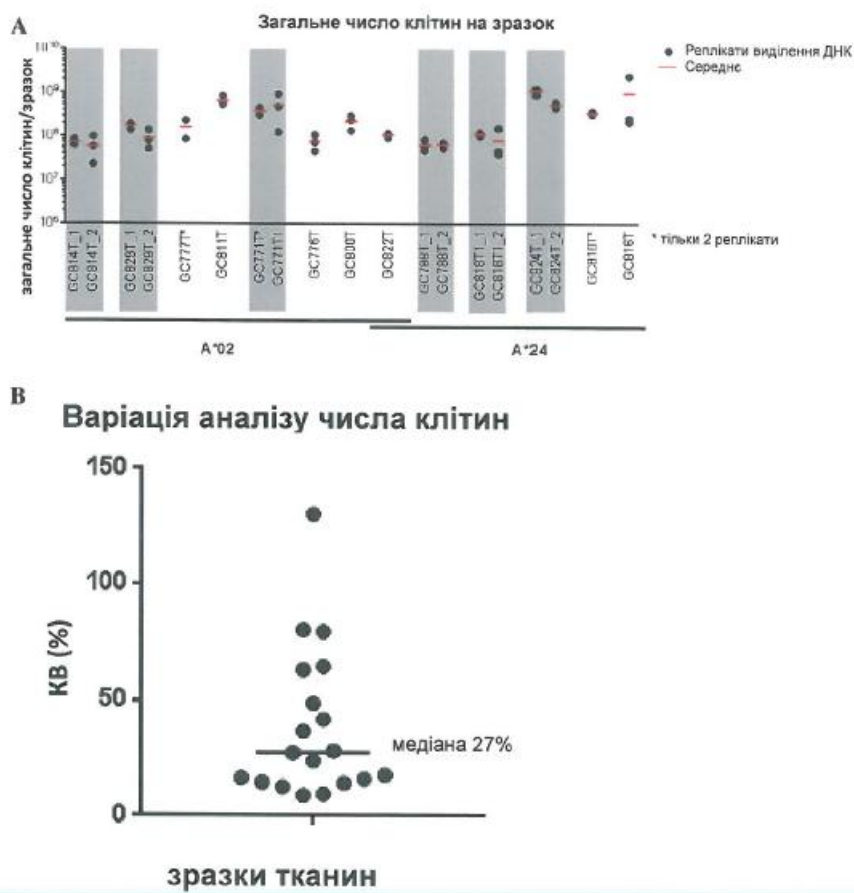
Фігура 9

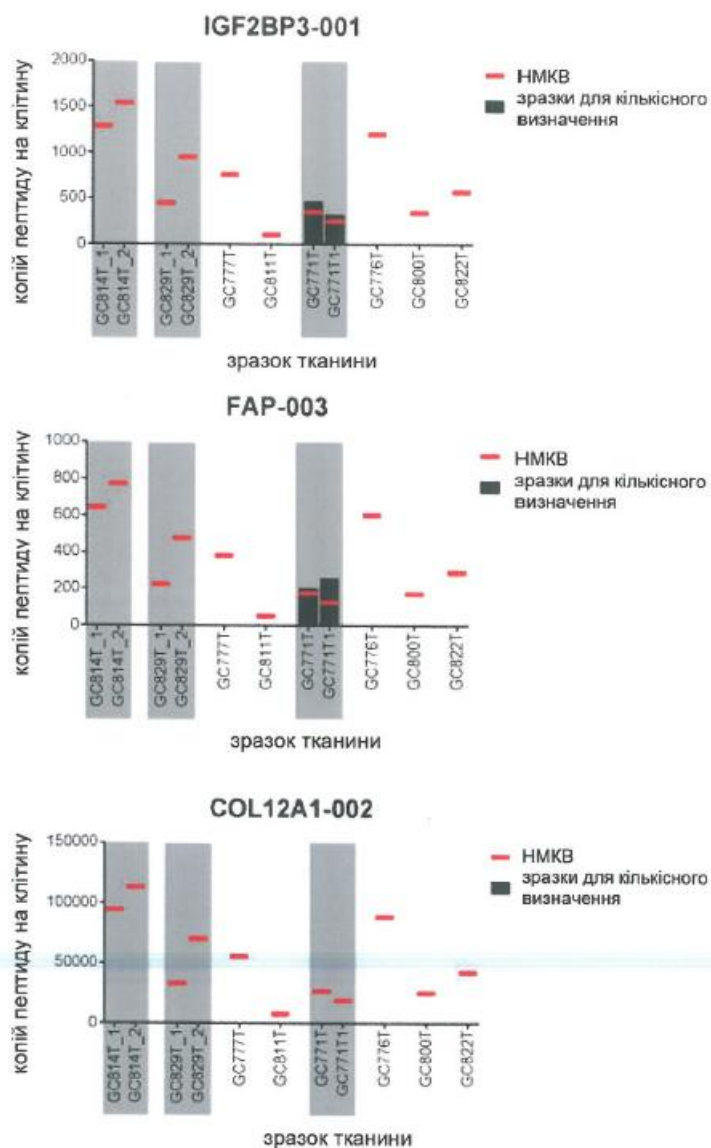


Фігура 10

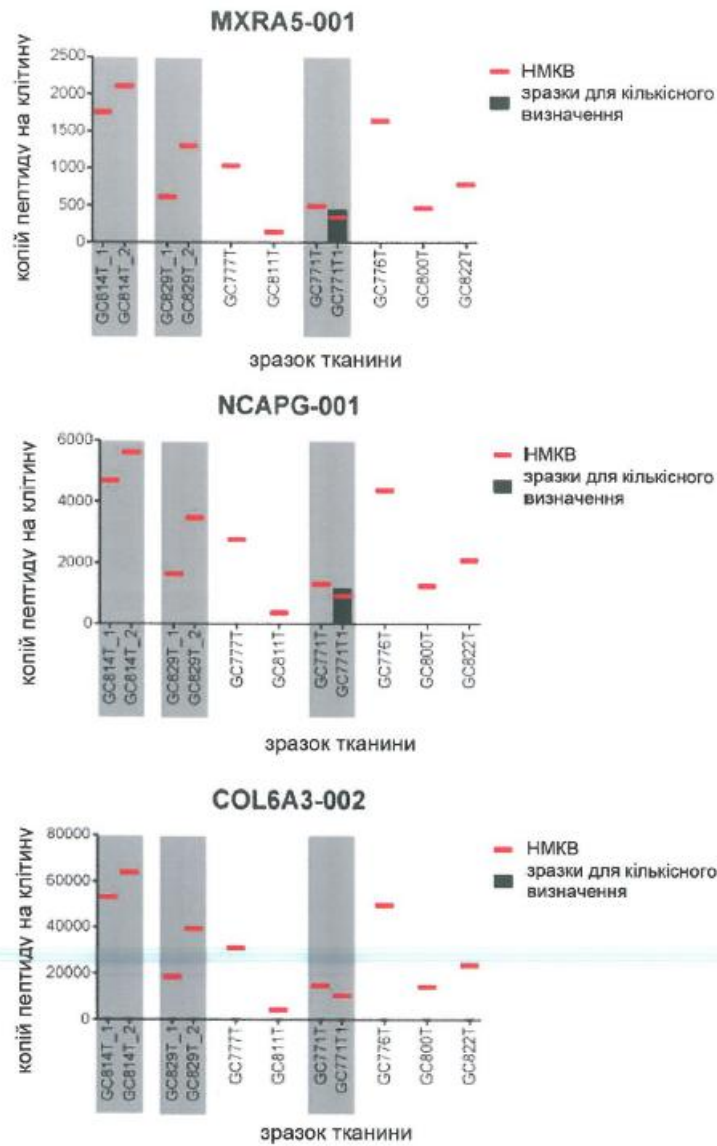


Фігура 11

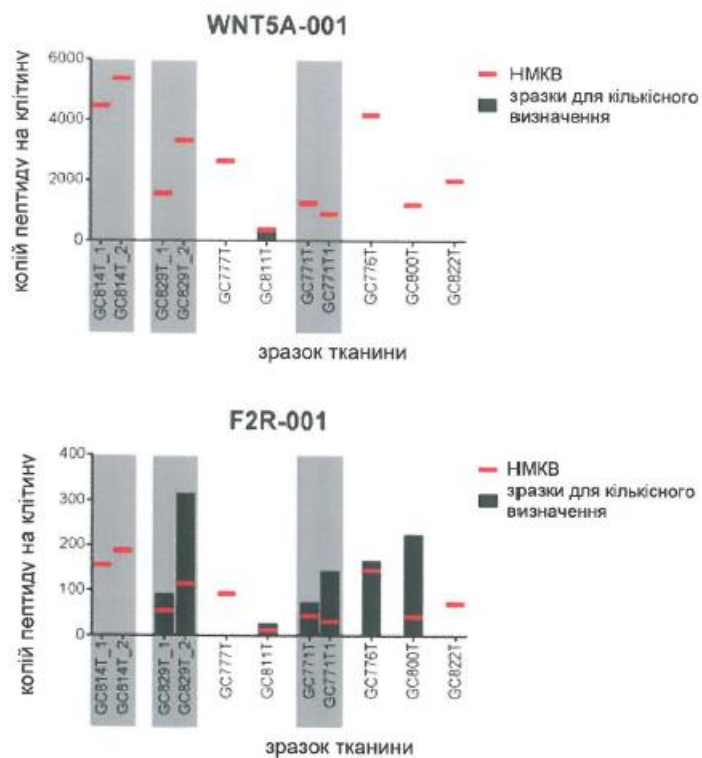




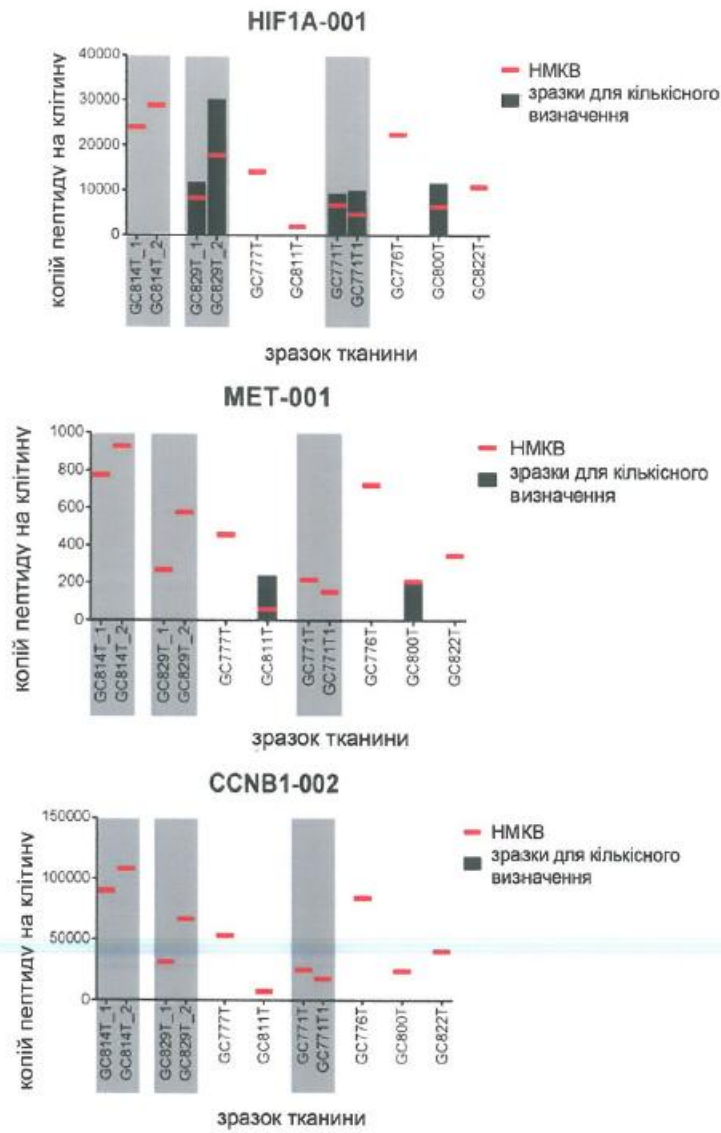
Фігура 12



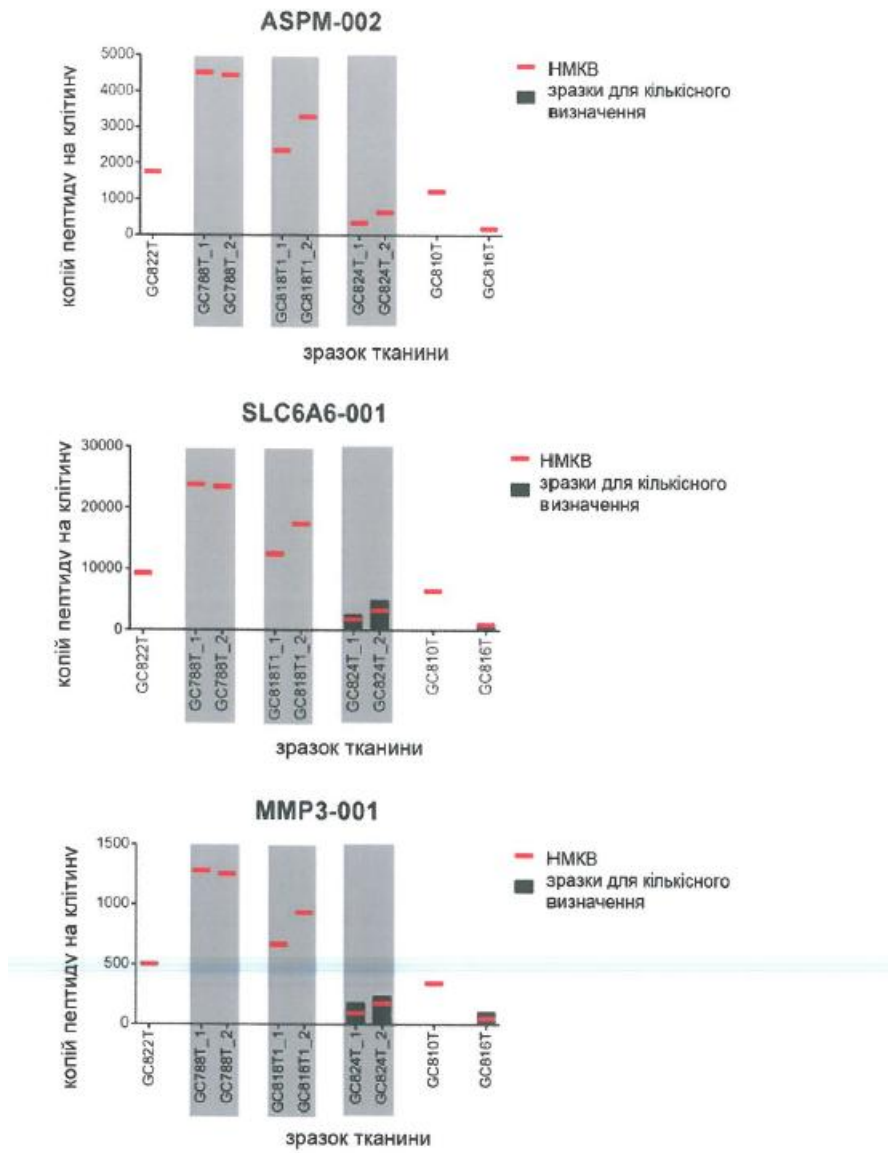
Фігура 12 (продовження)



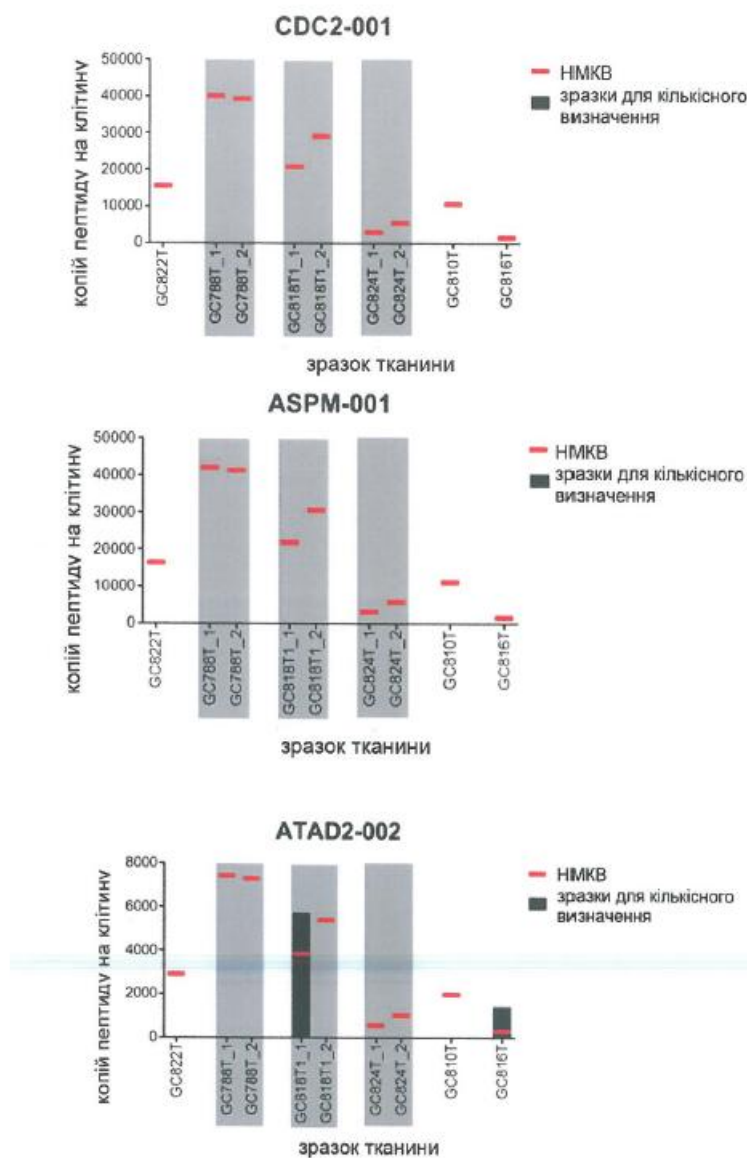
Фігура 12 (закінчення)



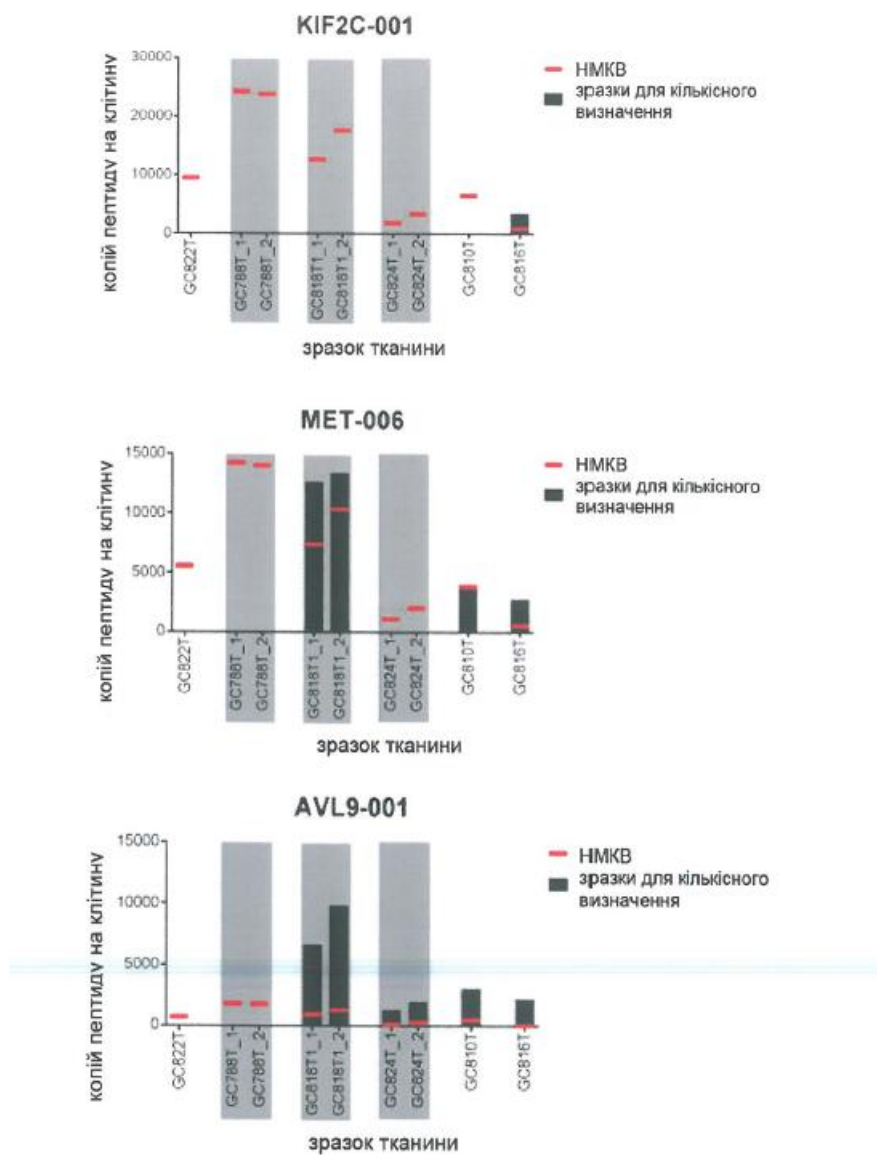
Фігура 13



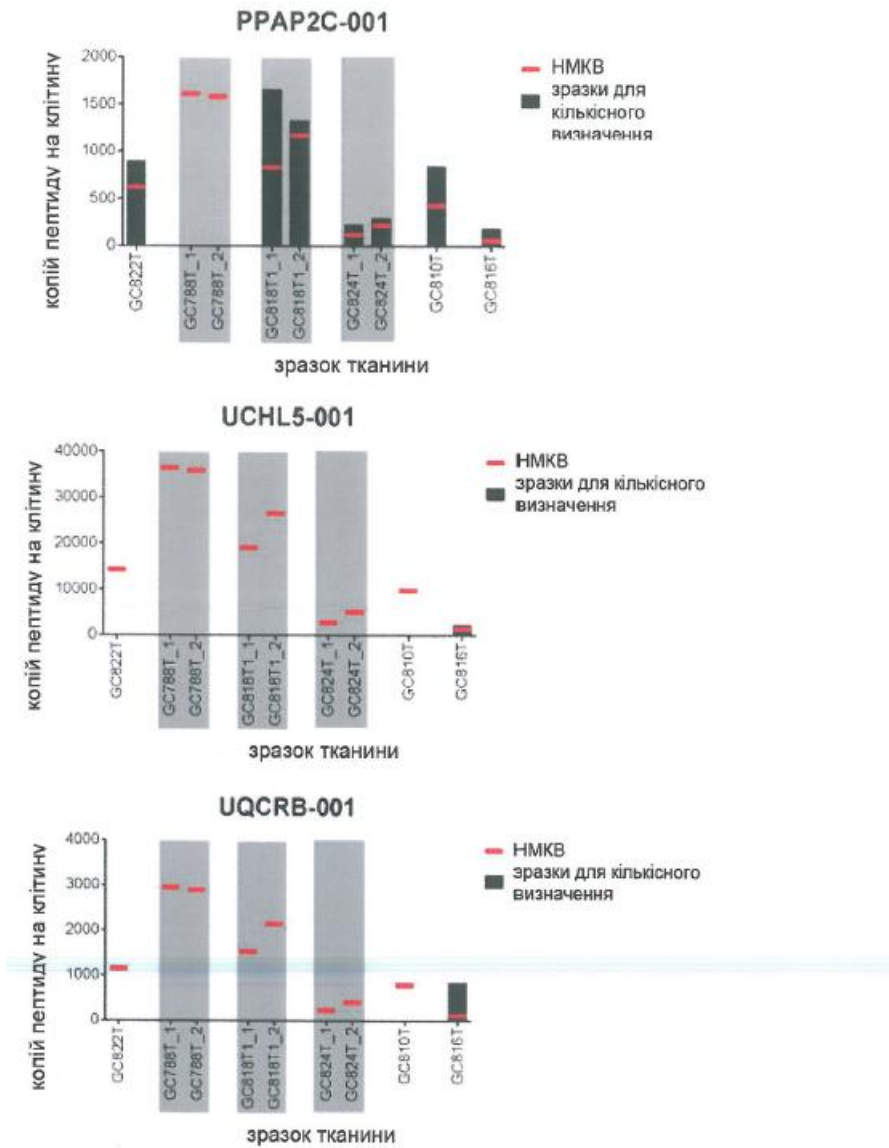
Фігура 14



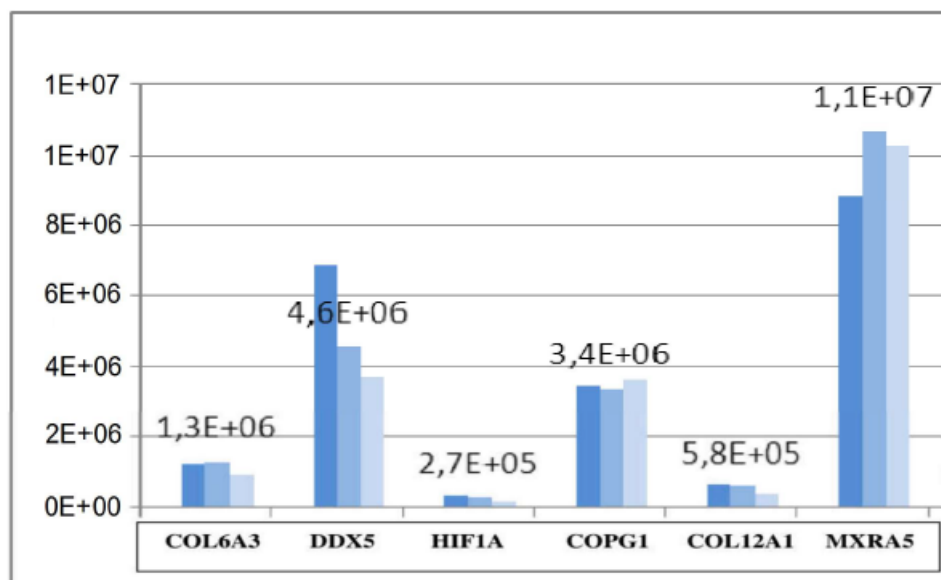
Фігура 14 (закінчення)



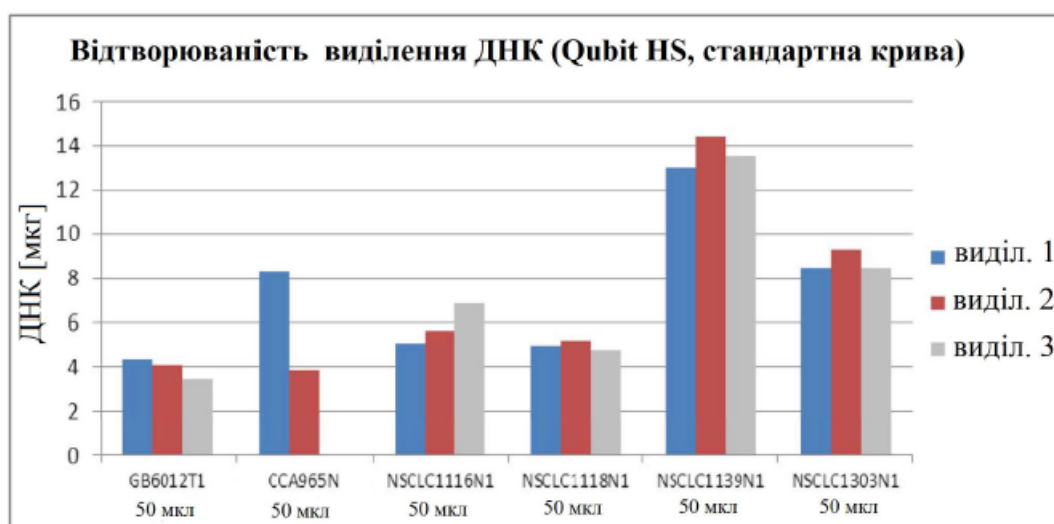
Фігура 15



Фігура 15 (закінчення)



Фігура 16



Фігура 17