

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036328**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.27

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)

(21) Номер заявки
201791148

(22) Дата подачи заявки
2015.12.15

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБСОЛЮТНЫХ КОЛИЧЕСТВ HLA-РЕСТРИКТИРОВАННЫХ РАКОВЫХ ПЕПТИДОВ, ОБРАЗОВАВШИХСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОЦЕССИНГА

(31) **1423361.3; 62/097,994**

(32) **2014.12.30**

(33) **GB; US**

(43) **2017.11.30**

(86) **PCT/EP2015/079873**

(87) **WO 2016/107740 2016.07.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Вайншенк Тони (DE), Лейбольд
Джулия (AT)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Дементьев
В.Н., Карпенко О.Ю., Клюкин В.А.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) 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, page 241, column 1, paragraph 3 - page 243, column 1, paragraph 1; figure 1

& "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-mmcl.docx/276834/html/S1874391914003613/591921b7bebb581e48ldb9e08573089b/mmcl.docx> [retrieved on 2016-02-26] cited in the application, page 6, line 92 - page 7, line 115, figures S2, S3
WO-A1-2011128448

SUSANN MÜLLER 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, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к способу определения абсолютных количеств HLA-рестриктированных раковых пептидов, образовавшихся в результате естественного процессинга, т.е. определению числа копий пептида(ов), презентируемых одной клеткой. Настоящее изобретение может быть использовано не только для разработки методов лечения на основе антител или пептидных вакцин, но оно также обладает высокой ценностью для иммуномониторинга на молекулярном уровне и пригодно в процессах идентификации новых пептидных антигенов для иммунотерапевтических стратегий, таких как соответствующие методы лечения на основе вакцин, антител или подходы адоптивного переноса Т-клеток при раковых, инфекционных и/или аутоиммунных заболеваниях.

B1**036328****036328****B1**

Настоящее изобретение относится к способу определения абсолютных количеств НЛА-рестриктированных раковых пептидов, образовавшихся в результате естественного процессинга, т.е. определению числа копий пептида(ов), презентируемых одной клеткой. Настоящее изобретение может быть использовано не только для разработки методов лечения на основе антител или пептидных вакцин, но оно также обладает высокой ценностью для иммуномониторинга на молекулярном уровне, и пригод-но в процессах идентификации новых пептидных антигенов для иммунотерапевтических стратегий, та-ких как соответствующие методы лечения на основе вакцин, антител или подходы адоптивного переноса Т-клеток при раковых, инфекционных и/или аутоиммунных заболеваниях.

Область изобретения

Разработка противораковых иммунотерапевтических средств и методов иммунотерапии для лече-ния аутоиммунных и инфекционных заболеваний, направленных на активацию Т-клеточной ветви им-мунной системы в целях борьбы с раковыми заболеваниями, может быть существенно улучшена за счет глубокого познания уровней презентации пептидов, связанных с человеческим лейкоцитарным антиге-ном (HLA), на тканях, пораженных первичным заболеванием. Данная информация относится к методам лечения на основе антител или пептидным вакцинам в частности, а также к любому другому виду Т-клеточной вакцины на основе молекулярных структурных единиц, таких как белок, ДНК или РНК. До сих пор данный вид количественных данных относительно абсолютного числа копий на клетку не был доступен для полученной от пациентов ткани.

Способ идентификации пептидов, как описанный выше, позволяющий предотвратить проблему, связанную с "иммунологией с обратным действием", был раскрыт в патенте EP 1508047 B1. Как описы-вается выше, этот способ не может быть использован для определения количества указанных пептидов. Другой способ, включающий стратегию введения меток, был раскрыт в патентной заявке WO 2005/076009, который позволял в некоторой степени определять количество, но не в абсолютном мас-штабе. Другие метки были раскрыты, например, в патентной заявке WO 03/025576 или в работе Martin и соавторов в *Proteomics* 2003, 3, 2208-2220.

Другой способ был раскрыт в работе Fortier и соавторов (*The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome*, *JEM*, Vol. 205, No. 3, March 17, 2008 595-610). Недостатком данного способа являет-ся необходимость отделения пептидов, связанных с молекулами МНС, от пептидов, не связывающихся с молекулами МНС, что обусловлено кислотной элюцией. Это осуществляется с использованием клеточ-ных линий b2m с генетическим нокаутом: таким образом, этот способ не может использоваться для пер-вичных (полученных от пациента) опухолевых материалов. В рамках данного способа первичные тимо-циты мыши сравнивали с клеточной линией мыши EL4. Исходные количества корректировали посредст-вом измерения количества молекул МНС I класса. Уже один этот процесс является существенным огра-ничением способа, раскрытого Fortier и соавторами. Кроме того, требуемая для первичных тканей раз-личных размеров и происхождения нормализация не применялась. Вместо этого использовались сбалан-сированные исходные материалы, делая проведение нормализации излишним. Тем не менее, нормализа-ция является абсолютно необходимым этапом для первичных материалов (пациента).

В WO 2011/128448 раскрыт способ количественной идентификации релевантных пептидных анти-генов, связанных с HLA, из препаратов первичной ткани в крупном масштабе без применения подходов с введением меток. Способ включает этапы получения по меньшей мере одного образца первичной ткани, пораженной заболеванием, и по меньшей мере одного образца первичной здоровой ткани, предпочти-тельно соответствующей пораженной заболеванием ткани, выделения пептидных лигандов МНС из ука-занного(ых) образца(ов), осуществления анализа методом ВЭЖХ-МС указанных пептидных лигандов МНС, выделения интенсивности сигнала ионов-предшественников (площади) для каждого из сигналов, полученного при анализах, идентификации последовательностей указанных пептидных лигандов МНС, этапы нормализации и этапы по контролю качества данных в целях определения относительного количе-ства указанных пептидных лигандов МНС без введения меток.

Hassan и соавторы (в работе: Hassan C, et al, *Accurate quantitation of MHC-bound peptides by applica- tion of isotopically labeled peptide MHC complexes*, *J Prot* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.009>) раскрывают подход, в котором приготавливают мономерные комплексы пептид-МНС (hpMHC) с изотопными метками и добавляют их непосредственно после лизиса клеток, т.е. до обычной обработки образца. При использовании данного подхода все потери во время обработки образца могут быть учтены, что позволяет произвести точное определение специфических лигандов, презентируемых МНС I класса. Это исследование выделяет этап иммуноаффинной очистки в качестве источника достаточно крупных потерь во время предварительной обработки образца и предла-гает решение, чтобы учитывать эти потери. Представленная стратегия может использоваться для полу-чения достоверного представления о количестве копий эпитопов, и, таким образом, считается, что это позволяет улучшить дизайн вакцины и стратегии для иммунотерапии.

Стимуляция иммунных ответов зависит от присутствия антигенов, распознаваемых иммунной сис-темой хозяина как чужеродные. Открытие использования опухолеассоциированных антигенов и антиге-нов заболевания повысило возможность использования иммунной системы хозяина для вмешательства в рост опухоли. Различные механизмы управления обеими ветвями иммунной системы, как гуморальной,

так и клеточной, исследуются в настоящее время для иммунотерапии рака.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки (Т-CD8⁺), которые распознают пептиды, связанные с молекулами I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС). Эти пептиды, обычно состоящие из 8-12 аминокислотных остатков, получены из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоле, и играют важную роль в иммунном ответе. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Существуют два класса молекул МНС: молекулы МНС I класса, встречающиеся на большинстве клеток, имеющих ядро. Молекулы МНС состоят из альфа-тяжелой цепи и бета-2-микроглобулина (рецепторы МНС I класса) или альфа- и бета-цепи (рецепторы МНС II класса) соответственно. Их трехмерная форма образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами. МНС I класса презентируют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, DRIP и более крупных пептидов. Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и в первую очередь презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК в период эндоцитоза и впоследствии процессируются. Комплексы из пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными цитотоксическими Т-лимфоцитами, несущими подходящий ТКР (Т-клеточный рецептор), тогда как комплексы из пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Хорошо известно, что ТКР, пептид и МНС встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

Для того чтобы пептид инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он должен связываться с молекулой МНС. Этот процесс зависит от аллеля молекулы МНС и специфических полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающиеся с МНС I класса, как правило, имеют 8-12 аминокислотных остатков в длину и обычно содержат два консервативных остатка ("якори") в их последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы МНС. Таким образом, каждый аллель МНС имеет связывающий мотив, который контролирует способность пептида специфически связываться со связывающей бороздкой.

В зависящей от МНС I класса иммунной реакции пептиды не только должны быть в состоянии связываться с конкретными молекулами МНС I класса, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но они также должны распознаваться Т-клетками, несущими специфические Т-клеточные рецепторы (ТКР).

Антигены, которые распознаются специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами опухоли, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и по сравнению с не измененными клетками того же происхождения имеют повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

Современная классификация опухолеассоциированных или ассоциированных с заболеванием антигенов включает следующие основные группы.

Раково-тестикулярные антигены: первые в истории идентифицированные ТАА (опухолеассоциированные антигены; сокращение для ассоциированных с заболеванием антигенов: DAA), которые могут распознаваться Т-клетками, принадлежат к этому классу, называвшемуся первоначально "раково-тестикулярные антигены" (СТ), так как его представители экспрессируются в отличных по гистологической структуре опухолях человека, а среди нормальных тканей - только в сперматоцитах/сперматогониях семенника и изредка в плаценте. Так как клетки семенника не экспрессируют молекулы HLA I и II класса, то эти антигены не могут быть распознаны Т-клетками в нормальных тканях и поэтому могут рассматриваться как иммунологически опухолеспецифические. Хорошо известными примерами антигенов СТ являются члены семейства MAGE или NY-ESO-1.

Антигены дифференциации: данные ТАА встречаются в опухолевых и нормальных тканях, из которых образуется опухоль; большинство из них имеется в меланомах и нормальных меланоцитах. Многие из этих линиеспецифических белков меланоцитов участвуют в биосинтезе меланина и поэтому не являются опухолеспецифическими, однако, несмотря на это, они широко применяются в противораковой терапии. Примеры включают (но не ограничиваются) тирозиназу и Melan-A/MART-1 для меланомы или ПСА для рака предстательной железы.

Избыточно экспрессируемые ТАА: гены, кодирующие широко экспрессированные ТАА, были обнаружены в различных по гистологической структуре опухолях, а также во многих нормальных тканях, в основном с более низким уровнем экспрессии. Возможно, что многие эпитопы, процессируемые и потенциально презентруемые нормальными тканями, находятся ниже порогового уровня для распознавания Т-клетками, в то время как их избыточная экспрессия в опухолевых клетках может инициировать противораковый ответ, нарушая установившуюся ранее толерантность. Известными примерами ТАА этого класса являются Her-2/neu, сурвивин, теломераза или WT1.

Опухолеспецифические антигены: данные уникальные ТАА образуются в результате мутаций нормальных генов (таких как β -катенин, CDK4 и т.д.). Некоторые из этих молекулярных изменений ассоциированы с неопластической трансформацией и/или прогрессией. Опухолеспецифические антигены в основном способны индуцировать сильные иммунные ответы, не заключая в себе риска аутоиммунных реакций по отношению к нормальным тканям. С другой стороны, данные ТАА в большинстве случаев релевантны только для определенной опухоли, на которой они были идентифицированы, и обычно не являются общими для многих отдельных опухолей.

ТАА, образующиеся в результате аномальных пост-трансляционных модификаций: такие ТАА могут образоваться из белков, которые не являются ни специфическими, ни избыточно экспрессируемыми в опухолях, однако, несмотря на это, становятся опухолеассоциированными в ходе посттрансляционных процессов, происходящих преимущественно в опухолях. Примеры для этого класса возникают в результате изменения характера гликозилирования, приводящего к появлению новых эпитопов в опухолях, как в случае MUC1, или при таких событиях как белковый сплайсинг во время деградации, которые могут быть опухолеспецифическими или могут не быть ими.

Онковирусные белки: данные ТАА являются вирусными белками и могут играть ведущую роль в онкогенном процессе, и, так как они являются чужеродными (не человеческого происхождения), они могут провоцировать Т-клеточный ответ. Примерами таких белков являются вирусные белки человеческой папилломы типа 16, E6 и E7, которые экспрессированы в карциноме шейки матки.

Для того чтобы белки были распознаны цитотоксическими Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифического или опухолеассоциированного антигена (или специфического для или ассоциированного с заболеванием антигена) и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками или инфицированными клетками и не экспрессироваться вообще или экспрессироваться в сравнительно малом количестве нормальными здоровыми тканями, например в меньшем количестве в 5, 10 или более раз.

При инфекционных заболеваниях существует две возможности, первая из которых - инфицированные клетки экспрессируют антиген, который не экспрессируется здоровыми клетками, непосредственно ассоциированный с инфекцией, или инфицированные клетки избыточно экспрессируют антиген, который экспрессируется лишь в чрезвычайно малом количестве здоровыми клетками - избыточная экспрессия антигена, обычно представленного в пептидоме здоровой клетки.

Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, инфекции или штамма, но и также имел высокую концентрацию (т.е. несколько копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены и специфические для или ассоциированные с заболеванием антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую/инфицированную в связи с функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза.

В случае ракового заболевания дополнительные нисходящие мишени белков, непосредственно являющихся причиной трансформации, могут быть также представлены в повышенном количестве и, таким образом, косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja H., Emmerich N.P., Rammensee H.G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). В обоих случаях необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, поскольку такой пептид ("иммуногенный пептид"), который образован из опухолеассоциированного или ассоциированного с заболеванием антигена, должен вести *in vitro* или *in vivo* к Т-клеточному ответу.

В сущности, любой пептид, который способен связываться с молекулой МНС, может выполнять функцию Т-клеточного эпитопа. Предварительным условием для индукции Т-клеточного ответа *in vitro* или *in vivo* является присутствие Т-клетки с соответствующим ТКР и отсутствие иммунологической толерантности к данному конкретному эпитопу.

Поэтому ТАА и ДАА являются отправным пунктом для разработки противораковой вакцины. Методы идентификации и определения характеристики ТАА и ДАА основаны на использовании ЦТЛ, которые могут быть выделены из организма пациентов или здоровых субъектов, или же они могут быть основаны на генерировании различающихся транскрипционных профилей или различающихся паттернов экспрессии пептидов между опухолевыми и нормальными тканями.

Однако идентификация генов, избыточно экспрессируемых в опухолевых тканях или человеческих опухолевых клеточных линиях или же селективно экспрессируемых в таких тканях или клеточных линиях, не дает точной информации об использовании антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Это обусловлено тем, что только отдельная субпопуляция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому важно выбрать лишь те пептиды из экспрессируемых избыточно или экспрессируемых селективно белков, которые презентуются в соединении с молекулами МНС, против которых может быть обнаружена функциональная Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка оп-

ределяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена посредством клонирования и способна к выполнению эффекторных функций ("эффекторная Т-клетка").

Т-хелперные клетки играют важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы Т-хелперных клеток, инициирующие ответы Т-хелперных клеток типа TH1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, экспонирующих комплексы опухолеассоциированного пептида и МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

Знания о точном количестве копий лигандов, презентруемых молекулами HLA I или II класса, важно в вопросах фундаментальной и клинической иммунологии. На данный момент лучшие способы определения количества копий основываются на масс-спектрометрическом анализе при использовании мониторинга отдельной реакции (SRM) в комбинации с известным количеством пептида с изотопной меткой. Тем не менее, данные подходы все-таки недостаточно точны для эффективного применения в указанных выше подходах.

Учитывая сказанное выше, задачей настоящего изобретения является предложить способ для определения абсолютного количества копий лигандов, презентруемых молекулами HLA I или II класса, который является точным, эффективным, простым в применении и может осуществляться на "высокопроизводительном" уровне. Другие задачи и преимущества настоящего изобретения станут очевидными для специалиста данной области при изучении предлагаемого последующего описания.

В первом аспекте настоящего изобретения задача изобретения решена с помощью способа определения абсолютного количества по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС на клетке, причем указанный способ включает

- а) приготовление клеток, презентрующих указанный по меньшей мере один пептидный лиганд МНС из биологического образца, включающего клетки;
 - б) определение числа клеток в указанном препарате этапа а);
 - в) добавление известного количества указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС и/или комплекса пептидного лиганда с МНС, подлежащего количественному определению, в указанный препарат этапа а) ("добавка I");
 - г) выделение по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС из указанного препарата этапа в) в целях получения пептидного элюата;
 - д) добавление известного количества по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС, подлежащего количественному определению, в указанный пептидный элюат ("добавка II");
 - е) проведение масс-спектрометрического анализа указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС в целях получения по меньшей мере одного
 - аа) сигнала для эффективности выделения на этапе г);
 - бб) сигнала для известного количества указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС, добавленного на этапе д); и
 - вв) сигнала для указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС из указанного препарата клеток этапа а);
 - ж) количественное определение указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС на основе сравнения сигналов, полученных на этапе е) с
 - аа) полученным числом клеток,
 - бб) известным количеством указанного по меньшей мере одного лиганда пептида МНС и/или комплекса пептидного лиганда с МНС, подлежащего определению, добавленного на этапе в),
 - вв) известным количеством по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС, подлежащего количественному определению, добавленного на этапе д),
- за счет чего осуществляется по меньшей мере частичное, абсолютное количественное определение по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС на клетке.

В способе согласно настоящему изобретению, когда параллельно анализируют несколько проб, этап в), описанный выше, может быть опущен после того как установлена эффективность выделения, поскольку эффективность для одного образца может быть использована для оценки эффективности выделения для второго пептидного лиганда МНС и/или комплекса пептидного лиганда с МНС (т.е. значение может использоваться в качестве перекрестной ссылки).

Предпочтительным является способ, в котором, кроме того, используется сигнал, полученный по результатам внутренней калибровки (добавка II) на этапе д) в качестве постоянного и фиксированного (контрольного) стандарта для сигнала, полученного для выделенного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС, с помощью расчета соотношения между этими двумя сигналами. Данное соотношение сравнивают с построенной калибровочной кривой, которая также включает внутренний калибратор в том же самом количестве, предпочтительно при использовании идентичной аликвоты такого внутреннего калибратора. Калибровочная кривая затем описывает связь между этими соотношениями и количествами

пептидов. См. также фиг. 3 и условные обозначения к ней.

Неожиданно в контексте настоящего изобретения авторы изобретения обнаружили, что при объединении описываемых выше этапов анализа впервые становится возможным прямое абсолютное количественное определение уровня МНС, предпочтительно HLA-рестриктированного, пептида на раковых или других пораженных заболеванием тканях в сравнении с несколькими различными, не пораженными раковым заболеванием или не инфицированными тканями и органами.

В контексте настоящего изобретения термин "добавка" относится к добавлению известного количества или концентрации по меньшей мере одного известного, например несвязанного ("свободного") пептидного лиганда МНС, подлежащего количественному определению, в образец, такой как, например, препарат (называемый в данном контексте "добавка I") или пептидный элюат (называемый в данном документе "добавка II"). Количества/концентрации пептида(ов), которые необходимо добавить, могут быть легко скорректированы и зависят, по меньшей мере отчасти, от образца, к которому надлежит добавить известное количество добавки, и метода, используемого для анализа.

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, где по меньшей мере один пептидный лиганд МНС выбирают из опухолеассоциированного пептида (ТАА) или ассоциированного с заболеванием пептида (DAA).

Кроме того, предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, где указанный биологический образец, включающий клетки, выбирают из тканевого образца, образца крови, образца опухоли или образца инфицированной ткани. В контексте настоящего изобретения образцы, полученные непосредственно из организма индивидов, таких как пациенты, обозначаются термином "первичные", например первичные тканевые или опухолевые образцы, в отличие от образцов клеточных линий, таких как, например, устойчивые опухолевые клеточные линии. Образцы могут быть свежими или консервированными (например, замороженными или в виде препаратов), при условии, что они подходят для способа в соответствии с изобретением. Предпочтительным является биологический образец, который не включает постоянных клеточных линий.

В качестве предпочтительного примера: пулы пептидов HLA из подвергнутых шоковой заморозке (первичных) образцов тканей могут быть получены методом иммунопреципитации из плотных тканей при использовании, например, HLA-A, -B, -C-специфического антитела w6/32 или HLA-A*02-специфического антитела BB7.2, связанного с CNBr-активированной сефарозой, с последующей кислотной обработкой и ультрафильтрацией. Для различных аллелей HLA могут использоваться другие специфические антитела, известные из уровня техники, так как имеются, например, GAP-A3 для A*03, B1.23.2 для B-аллелей. Существуют соответствующие способы для получения пептидов в комплексе с молекулами МНС I класса для других млекопитающих, которые хорошо известны из уровня техники.

Способ в соответствии с изобретением может быть также использован в контексте инфекционных заболеваний, таких как вирусные или бактериальные инфекции, например лихорадка денге, Эбола, вирус Марбурга, туберкулез (ТБ), менингит или сифилис, предпочтительно, если способ применяется на резистентных к антибиотикам штаммах возбудителей инфекций, для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как артрит, паразитарных инфекций, таких как малярия, и других заболеваний, таких как рассеянный склероз и болезнь Паркинсона, при условии, что элементом-мишенью является пептид, связанный с молекулой МНС I класса.

Примеры аутоиммунных заболеваний (в том числе заболевания, которые официально не считаются аутоиммунными): хроническое обструктивное заболевание легких, анкилозирующий спондилоартрит, болезнь Крона (одна из двух форм идиопатического воспалительного заболевания кишечника "ВЗК"), дерматомиозит, сахарный диабет 1-го типа, эндометриоз, синдром Гудпасчера, базедова болезнь, синдром Гийена - Барре (СГБ, острый полирадикулоневрит), аутоиммунный тиреоидит, гнойный гидраденит, болезнь Кавасаки, IgA-нефропатия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, интерстициальный цистит, эритематозная волчанка, смешанное заболевание соединительной ткани, локализованная склеродермия, миастения гравис, нарколепсия, нейромиотония, обыкновенная (вульгарная) пузырчатка, пернициозная анемия, псориаз, псориатический артрит, полимиозит, первичный билиарный цирроз, рецидивирующий полихондрит, ревматоидный артрит, шизофрения, склеродермия, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, темпоральный артериит (гигантоклеточный артериит), язвенный колит (одна из двух форм идиопатического воспалительного заболевания кишечника "ВЗК"), васкулит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

Настоящее изобретение не ограничивается заболеваниями человека, но может использоваться для млекопитающих, например коров, свиней, лошадей, кошек, собак, грызунов, таких как крыса, мышь, коз и других домашних животных.

В другом предпочтительном воплощении способа в соответствии с настоящим изобретением приготовление клеток включает, по меньшей мере, частичное ферментативное расщепление тканей и/или клеточный лизис.

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, где указанное число клеток определяют с помощью метода, выбранного из подсчета клеточных ядер, фотометрического ме-

тогда определения ДНК, флуориметрического метода определения ДНК (такого как, например, с применением технологии Qubit®) и количественной ПЦР.

Другим предпочтительным способом в соответствии с настоящим изобретением является способ, кроме того, включающий определение количества по меньшей мере одного вида молекул HLA в указанном препарате этапа а). Определение количества может быть произведено с помощью известных из уровня техники методов, таких как методы, включающие специфические антитела, например ELISA, методы с использованием гелей, сортировка клеток и/или хроматография.

Другим предпочтительным способом в соответствии с настоящим изобретением является способ, где по меньшей мере один добавленный комплекс пептида с МНС и/или по меньшей мере один добавленный пептидный лиганд МНС являются мечеными и предпочтительно мечеными разными метками. Соответствующие метки известны специалисту данной области и включают изотопные метки, радиоактивные и нерадиоактивные метки, ферменты и другие группы предпочтительно с разными массами. Предпочтительно, если метки являются специфическими для конкретных пептидов, подлежащих количественному определению. Наиболее предпочтительным является дважды меченый ТАА (опухлеассоциированный антиген)/TUMAP (опухлеассоциированный пептид), например в случаях, когда для одного и того же эксперимента необходимы две добавки с различными метками (см. примеры внизу).

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, где выделение включает хроматографию, такую как аффинную хроматографию. Таким образом, выделенные лиганды МНС/HLA могут быть разделены в соответствии с их гидрофобностью обратной фазой хроматографией (например, nanoAcquity UPLC system, Waters) с последующим обнаружением на гибридном масс-спектрометре Orbitrap (ThermoElectron). Каждый образец предпочтительно анализируется с получением данных повторных (например) циклов ЖХ-МС. Данные ЖХ-МС затем обрабатывают путем анализа данных tandemной МС (МС/МС).

Спектры, записанные в желаемом виде с помощью метода tandemной масс-спектрометрии с фокусом внимания на значениях m/z пептидов, подлежащих количественному определению, оценивают предпочтительно с использованием программного обеспечения, которое экстрагирует уровни интенсивности предварительно отобранных фрагментных ионов предварительно заданных переходов. Примером такого программного обеспечения является программа 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>), прикладная программа для анализа данных масс-спектрометрических экспериментов методами "независимого от данных анализа" (DIA) для мониторинга параллельных реакций (PRM - целевая МС-МС). Эта программа может использоваться для совместного элюирования пептида с изотопной меткой в целях определения специфичности, а также в целях выделения интенсивности отдельных переходов для дальнейшей обработки.

Сопоставимость групп пептидов, рестриктированных по одному и тому же аллелю HLA, среди различных образцов возможна на основании общего аллель-специфического антитела, используемого для очистки, при наличии такового или же альтернативно на основании отнесения последовательностей к общим HLA-аллелям при помощи шаблонов, содержащих якорные аминокислотные остатки.

С точки зрения статистики предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, где по меньшей мере два повторных цикла масс-спектрометрического анализа осуществляются для каждого по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к способу согласно настоящему изобретению, дополнительно включающему выбор избыточно презентуемых, избыточно экспрессируемых и/или опухолеспецифических пептидных лигандов МНС для анализа.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу согласно настоящему изобретению, где указанный способ может быть осуществлен или осуществляется на высокопродуктивном уровне, предпочтительно вплоть до 50-100 пептидных лигандов могут быть проанализированы параллельно.

В другом предпочтительном варианте осуществления способа согласно настоящему изобретению этапы указанного способа осуществляются в порядке, указанном в прилагаемой формуле изобретения, или как было описано выше. В другом предпочтительном способе согласно настоящему изобретению указанный способ состоит из этапов, описанных выше в контексте настоящего документа.

В другом предпочтительном аспекте способа согласно настоящему изобретению указанный способ относится к персонализированной терапии и диагностике. В этих целях указанный(ые) анализируемый(ые) образец(образцы) получают от одного индивида или группы индивидов, страдающих от одного и того же патологического состояния, как описано в данном документе. Также на основании способа согласно настоящему изобретению может быть создан персонализированный профиль лигандов МНС, предпочтительно персонализированный, количественно охарактеризованный, специфический для заболевания профиль лигандов МНС, исходя из содержания пептидных лигандов МНС, определяемых количественно, как описано в настоящем документе.

Наиболее предпочтительно, если способ согласно настоящему изобретению осуществляется *in vitro*.

В еще одном предпочтительном аспекте способа согласно настоящему изобретению указанный способ включает, кроме того, этап синтеза, предпочтительно химического синтеза, указанного по мень-

шей мере одного пептидного лиганда МНС, количественно определяемого с помощью указанного способа, в аппарате для синтеза или вручную. Другой аспект данного изобретения, таким образом, относится к способу для получения иммунореактивного пептида, в соответствии с которым производится количественное определение пептида согласно раскрытому способу, и указанный пептид является химически синтезированным, *in vitro* или *in vivo*. Пептиды могут быть получены с помощью химического соединения аминокислот при использовании стандартных методик, известных из уровня техники.

Пептиды могут быть получены *in vitro*, например в бесклеточных системах, и *in vivo* с использованием клеток. Пептиды могут быть получены, как раскрыто, например, в патенте EP 2111867, заявленном Lewandrowski и соавторами.

Еще один другой аспект относится к способу согласно настоящему изобретению, где проводится дополнительный этап, на котором обнаруживают присутствие Т-лимфоцитов. При использовании данного способа возможно конкретно определить, в какой степени Т-лимфоциты, направленные против выделенных и идентифицированных пептидов, изначально существуют в организме пациентов. При выполнении данного этапа возможно введение в качестве вакцины только тех пептидов, против которых у пациента уже изначально существуют Т-лимфоциты. Затем пептиды могут использоваться для активации этих специфических Т-лимфоцитов.

Дальнейший аспект относится к способу согласно настоящему изобретению, где обнаружение специфических изначально существующих Т-лимфоцитов осуществляется посредством мечения лейкоцитов восстановленными комплексами антигенпрезентирующих молекул и антигенного пептида.

В другом предпочтительном варианте осуществления способа согласно настоящему изобретению указанный способ исключает, кроме того, использование клеток, клеточных линий или животных с генетическим нокаутом.

Другим предпочтительным факультативным этапом настоящего изобретения является автоматический контроль качества на основе молекул, добавляемых в известном количестве в образцы.

С помощью способа согласно изобретению, более того, возможно идентифицировать пациент-специфические пептиды, т.е. возможно с точностью подобрать подходящие для пациента пептиды, предназначенные для использования в вакцине, чтобы вызвать специфический иммунный ответ.

Далее другой аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей установленные количества одного или более пептидов ТАА и/или DAA, которые были количественно определены способом согласно изобретению.

Композиция может применяться, например, парентерально, например подкожно, внутривенно или внутримышечно, или вводится перорально в зависимости от лекарственной формы и имеющегося заболевания. В этих целях пептиды растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом носителе, предпочтительно водном носителе; композиция может, кроме того, включать добавки, например буферы, связующие вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены совместно с иммуностимулирующими веществами, например цитокинами.

Согласно одному аспекту изобретения пептиды могут применяться для лечения опухолевых заболеваний и для получения лекарственного средства для лечения опухолевых заболеваний. Опухолевые заболевания, подлежащие лечению, включают солидные опухоли, такие как рак почек, молочной железы, поджелудочной железы, желудка, семенника и/или кожи, или раковые заболевания крови, например ОМЛ. Данный список опухолевых заболеваний представляет собой лишь пример и не направлен на ограничение области применения.

Данные пептиды могут, кроме того, использоваться для оценки курса лечения опухолевого заболевания.

Данные пептиды могут также использоваться для мониторинга лечения в других видах иммунизации или методах лечения. Таким образом, пептид может использоваться не только в терапевтических, но и в диагностических целях.

Другой аспект изобретения относится затем к применению пептидов, определяемых количественно, для получения антитела. Поликлональные антитела могут быть получены общеизвестным способом, иммунизацией животных с помощью инъекции пептидов и последующей очисткой иммуноглобулина. Моноклональные антитела могут быть получены согласно стандартизованным протоколам, известным из уровня техники.

Настоящее изобретение имеет особую значимость для подходов, основанных на использовании антител, поскольку количество копий мишеней на поверхности клетки-мишени определяет и/или отражает, восприимчива ли мишень к антителу вообще и, если это так, какие эффекторные функции могут быть использованы, такие как конъюгированные лекарственные средства, токсины, биспецифические антитела, рекрутирующие Т-клетки или другие эффекторные клетки. Другие аспекты относятся к применению в контексте так называемых молекул, образующих каркас, таких как аптамеры (связывающиеся с мишенью молекулы олигонуклеиновых кислот или пептидов) и/или растворимые Т-клеточные рецепторы (ТКР). В данном случае, подобно антителам, количество копий определяет требуемую avidность и эффекторные функции для указанных каркасообразующих молекул.

Стимуляция иммунных ответов зависит от присутствия антигенов, распознаваемых иммунной сис-

темой хозяина как чужеродные. Открытие существования опухолеассоциированных антигенов повысило сейчас возможность использования иммунной системы хозяина для вмешательства в рост опухоли. В настоящее время исследуются различные механизмы использования для иммунотерапии рака обеих ветвей иммунной системы, как гуморальной, так и клеточной.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС), связанные с пептидами, имеющими обычно 8-12 аминокислотных остатков, образованных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоли, играют важную роль в этом ответе. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Молекулы МНС I класса могут встречаться на большинстве клеток, имеющих ядро, которые презентуют пептиды, образующиеся после протеолитического расщепления преимущественно эндогенных, цитозольных или ядерных белков, DRIP и более крупных пептидов. Однако пептиды, образованные из эндосомальных компартментов или экзогенных источников, также часто встречаются на молекулах МНС I класса. Этот неклассический способ презентации I классом в литературе называется кросс-презентацией.

Для того чтобы белки были распознаны цитотоксическими Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифического или -ассоциированного антигена и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т.е. несколько копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с функцией, например, при контроле клеточного цикла или в апоптозе. В дополнение также нисходящие мишени белков, непосредственно являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода. В обоих случаях необходимо присутствие эпитопов в аминокислотной последовательности антигена, поскольку такой пептид ("иммуногенный пептид"), который образован из опухолеассоциированного или ассоциированного с заболеванием антигена, должен вести *in vitro* или *in vivo* к Т-клеточному ответу.

В сущности, любой пептид, способный связываться с молекулой МНС, может выполнять функцию Т-клеточного эпитопа. Предварительным условием для индукции Т-клеточного ответа *in vitro* или *in vivo* является присутствие Т-клетки с соответствующим ТКР и отсутствие иммунологической толерантности к данному конкретному эпитопу. Поэтому опухолеассоциированные антигены (ТАА) являются отправным пунктом для разработки противораковой вакцины. Методы идентификации и определения характеристики ТАА основаны на использовании ЦТЛ, которые могут быть выделены из организма пациентов или здоровых индивидов, или же они могут быть основаны на генерировании различающихся транскрипционных профилей или различающихся паттернов экспрессии пептидов между опухолевыми и нормальными тканями (Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27). Однако идентификация генов, избыточно экспрессированных в опухолевых тканях или человеческих опухолевых клеточных линиях или же селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не дает точной информации об использовании антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Это обусловлено тем, что только отдельная субпопуляция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому важно выбрать лишь те пептиды из избыточно экспрессированных или селективно экспрессированных белков, которые презентуются в соединении с молекулами МНС, против которых может быть обнаружена функциональная Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена клонально и способна к выполнению эффекторных функций ("эффекторная Т-клетка").

Ввиду серьезных побочных эффектов и расходов, связанных с лечением рака, крайне необходимы улучшенные методы прогнозирования и диагностики.

Термин "пептид" в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Предпочтительно, чтобы пептиды имели длину в 9 аминокислот, но они могут быть короче, длиной в 8 аминокислот, и длиннее - 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислот в длину.

Термин "олигопептид" в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина олигопептида не особенно важна для изобретения до тех пор,

пока в нем сохраняются надлежащие эпитоп или эпитопы. Олигопептиды типично бывают менее чем около 30 аминокислотных остатков в длину и более чем около 14 аминокислот в длину.

Термин "полипептид" обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом типично пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина полипептида не особенно важна для изобретения до тех пор, пока сохраняются надлежащие эпитопы. В отличие от терминов "пептид" или "олигопептид", термин "полипептид" введен для обозначения молекул, содержащих более приблизительно 30 аминокислотных остатков.

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий для такой молекулы, является "иммуногенным" (и, таким образом, "иммуногеном" в рамках настоящего изобретения), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать Т-клеточный ответ. Таким образом, "иммуноген" будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ.

Для Т-клеточного "эпитопа" необходим короткий пептид, который связан с рецептором МНС I класса, образующим трехчленный комплекс (альфа-цепь МНС класса I, бета-2-микроглобулин и пептид), который может быть распознан Т-клеткой, несущей подходящий Т-клеточный рецептор, связывающийся с комплексом МНС/пептид с подходящей аффинностью. Пептиды, связывающиеся с молекулами МНС I класса, типично имеют длину в 8-14 аминокислот и особенно типично длину в 9 аминокислот.

В контексте настоящего изобретения для описания изобретения в качестве примера используется раковое заболевание. Тем не менее, способ по изобретению может также применяться к инфекционным заболеваниям, аутоиммунным заболеваниям и паразитарным инфекциям при условии, что соответствующий иммунный ответ является ответом с привлечением молекул МНС I класса.

Настоящее изобретение будет описано далее с помощью примеров, тем не менее не ограничивающих объем изобретения.

В прилагаемых чертежах и списке последовательностей изображено следующее.

На фиг. 1 представлена краткая обзорная схема экспериментального подхода в соответствии с настоящим изобретением.

На фиг. 2 представлен сравнительный МС анализ смеси пептидов TUMAP с 10 фмоль каждого TUMAP из табл.1. Каждый пептид дает разный сигнал МС, демонстрируя возможность обнаружения пептид-зависимым способом. Пептид 5 не включен в табл.1, т.е. последовательности 1-4 в табл.1 соответствуют №№ 1-4 фиг. 2 и последовательности 5-11 в табл.1 соответствуют №№ 6-12 фиг. 2.

Кроме того, пептиды 19, 21 и 22 фиг. 2 не указаны в табл.2, т.е. последовательности 13-18 фиг. 2 соответствуют №№ 12-17 табл.2, последовательность 20 фиг. 2 соответствует № 18 табл.2 и последовательности 23-28 из фиг. 2 соответствуют №№ 19-24 табл.2.

На фиг. 3 представлен принцип осуществления метода внутреннего стандарта. Калибровочная кривая получена с помощью титрования пептида TUMAP с изотопной меткой одной версии (обозначено светло-серым цветом). Для всех масс-спектрометрических измерений в образцы для МС добавляли постоянное количество пептида TUMAP как внутреннего стандарта с изотопной меткой другой версии (обозначено темно-серым цветом). Для построения калибровочной кривой рассчитывали соотношение МС-сигналов с помощью метода логистической регрессии. Нижний предел количественного определения (НПКО) определяют визуально с учетом отклонения от прямолинейности. "Образцы для количественного определения" (обозначены зеленым цветом) представляют собой показатели интенсивности сигнала, измеренные в опухолевых образцах, выбранных для определения абсолютного количества TUMAP.

На фиг. 4 представлены калибровочные кривые HLA-A*02 пептидов TUMAP, выбранных для абсолютного количественного определения. Результаты МС-измерений соответствующих пептидов TUMAP в образцах опухолевых тканей, использованных для анализа абсолютного числа на клетку, "образцы для количественного определения" показаны на каждом графике.

На фиг. 5 представлены дополнительные калибровочные кривые HLA-A*02 пептидов TUMAP, выбранных для абсолютного количественного определения. Результаты масс-спектрометрического анализа соответствующих пептидов TUMAP в образцах опухолевой ткани, использованных для анализа абсолютного числа TUMAP на клетку ("образцы для количественного определения"), показаны на каждом графике.

На фиг. 6 представлены калибровочные кривые HLA-A*24 пептидов TUMAP, выбранных для абсолютного количественного определения. Результаты масс-спектрометрического анализа соответствующих пептидов TUMAP в образцах опухолевой ткани, использованных для анализа абсолютного числа пептидов TUMAP на клетку ("образцы для количественного определения"), показаны на каждом графике.

На фиг. 7 представлены дополнительные калибровочные кривые HLA-A*24 пептидов TUMAP, выбранных для абсолютного количественного определения. Результаты масс-спектрометрического анализа соответствующих пептидов TUMAP в образцах опухолевой ткани, использованных для анализа абсолютного числа пептидов TUMAP на клетку ("образцы для количественного определения"), показаны на каждом графике.

На фиг. 8 представлены расчетные значения вариаций повторных измерений методом МС по

всем проанализированным пептидам TUMAP. Каждая точка представляет собой коэффициент вариации (КВ в %) для повторных измерений методом МС отдельного пептида TUMAP в одном конкретном образце ткани. Медиана КВ среди всех пептидов TUMAP обозначает среднюю вариацию при повторных циклах МС.

На фиг. 9 представлена эффективность выделения комплексов пептид-МНС. Эффективность выделения комплексов пептид-МНС определяли на восьми А*02-положительных образцах для А*02 пептидов TUMAP (А) и на шести А*24-положительных образцах для А*24 пептидов TUMAP (В). Вариабельность эффективности выделения составляет в среднем примерно 24% в случае А*02 пептидов TUMAP и 32% в случае пептидов А*24 TUMAP соответственно (С).

На фиг. 10 представлены методы оценки анализа содержания ДНК.

А. Сравнение трех различных методов интерполяции числа клеток из заданного количества ДНК: при использовании стандартной кривой, полученной на опухолевых клеточных линиях (темно-серый), на МКПК здоровых доноров (серый) и при использовании теоретической массы диплоидного генома человека (светло-серый). Репликации биологических образцов, т.е. независимо приготовленные препараты лизата ткани из различных фрагментов одной опухоли, выделены серым цветом.

В. График стандартной кривой для МКПК, которая использовалась для определения общего числа клеток тканевых образцов, проанализированных в рамках абсолютного количественного определения пептидов TUMAP.

На фиг. 11 представлено определение числа клеток в твердых, замороженных тканевых образцах. Анализ по определению числа клеток А*02-и А*24-положительных опухолевых образцов (А) и расчетные значения вариации результатов анализа по определению числа клеток (В). Репликации биологических образцов выделены серым цветом.

На фиг. 12 показаны результаты определения числа копий пептидов на одну клетку для пептидов HLA-A*02 TUMAP. Были проанализированы восемь различных опухолей РЖ, три из которых с повторным измерением (параллельные биологические образцы выделены серым цветом). НПКО относится к диапазону количественного определения в одном МС эксперименте и экстраполируется на образец- и TUMAP-специфический НПКО, т.е. самое низкое количество копий, которое поддается количественному определению в конкретном образце конкретного пептида TUMAP (выделены серым цветом).

На фиг. 13 показаны дополнительные результаты определения числа копий пептида на одну клетку для пептидов HLA-A*02 TUMAP. Были проанализированы восемь различных опухолей РЖ, три из которых с повторным измерением (параллельные биологические образцы выделены серым цветом). НПКО относится к диапазону количественного определения в одном МС эксперименте и экстраполируется на образец- и TUMAP-специфический НПКО, т.е. самое низкое количество копий, которое поддается количественному определению в конкретном образце конкретного пептида TUMAP (выделены серым цветом).

На фиг. 14 показаны результаты определения числа копий пептидов на одну клетку для пептидов HLA-A*24 TUMAP. Были проанализированы шесть различных опухолей РЖ, три из которых с повторным измерением (параллельные биологические образцы выделены серым цветом). НПКО относится к диапазону количественного определения в одном МС эксперименте и экстраполируется на образец- и TUMAP-специфический НПКО, т.е. самое низкое количество копий, которое поддается количественному определению в конкретном образце конкретного пептида TUMAP (выделены серым цветом).

На фиг. 15 показаны дополнительные результаты определения числа копий пептидов на одну клетку для пептидов HLA-A*24 TUMAP. Были проанализированы шесть различных опухолей РЖ, три из которых с повторным измерением (параллельные биологические образцы выделены серым цветом). НПКО относится к диапазону количественного определения в одном МС эксперименте и экстраполируется на образец- и TUMAP-специфический НПКО, т.е. самое низкое количество копий, которое поддается количественному определению в конкретном образце конкретного пептида TUMAP (выделены серым цветом).

На фиг. 16 представлены результаты исследования влияния добавки свободных пептидов с концентрацией 500 фмоль в препарат МНС/пептидный мономер. Свободный пептид в анализе не оказывает существенного влияния на указанные пептиды.

На фиг. 17 представлены результаты испытаний воспроизводимости выделения ДНК при использовании Qubit HS (флуоресцентной индикацией) в сравнении со стандартной кривой. Образцы (раковые образцы, такие как НМРЛ) демонстрируют достаточную гомогенность. ДНК выделяли из 3 аликвот по 50 мкл.

Последовательности с SEQ ID NO 1 по 24 представляют собой пептиды табл. 1 и 2, которые были выбраны для абсолютного количественного определения в соответствии с примерами.

Примеры

Последующие примеры описывают способ по изобретению в контексте ТАА/раковых заболеваний. Изобретение не ограничивается данными примерами, поскольку они являются только предпочтительными вариантами осуществления изобретения. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

Таблица 1. HLA-A*02 пептиды TUMAP, выбранные для абсолютного количественного определения

№	Код пептида	Последовательность
1	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
2	FAP-003	YVYQNNIYL
3	COL12A1-002	FLVDGWSVS
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	ILIDWLQV

Для абсолютного количественного определения было выбрано одиннадцать пептидов.

Таблица 2. HLA-A*24 пептиды TUMAP, выбранные для абсолютного количественного определения

№	Код пептида	Последовательность
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

Для абсолютного количественного определения было выбрано четырнадцать пептидов. Как оказалось, свойства одного пептида (PLK4-001) неприемлемы для дальнейших исследований. Для остальных 13 пептидов были выполнены эксперименты по абсолютному количественному определению.

Количественное определение копий TUMAP на клетку в образцах солидных опухолей требует (раздельного) количественного определения

- а) выделенного TUMAP,
- б) потерь TUMAP во время выделения,
- в) числа клеток проанализированного образца ткани.

Обзор экспериментального подхода в соответствии с настоящим изобретением приводится в фиг. 1.

Количественное определение пептида с помощью наноЖХ-МС/МС

Для точного определения количества пептидов методом масс-спектрометрии сначала необходимо получить базовые знания о специфической для пептида корреляции количества пептида и МС-сигнала. Например, измерения с помощью МС смеси пептидов с концентрацией каждого пептида 10 фмоль позволяют обнаружить, что МС-сигналы разных пептидов существенно различаются (фиг. 2). Это также означает, что диапазон, в котором может быть произведено достоверное определение количества пептида с помощью МС, зависит от индивидуальных характеристик каждого отдельного пептида.

Кроме того, линейная корреляция между количеством конкретного пептида и МС-сигналом может

ожидаться только в конкретном диапазоне. Поэтому авторы изобретения решили построить отдельную калибровочную кривую для каждого пептида. Диапазон каждой калибровочной кривой был выбран так, чтобы отражать не только индивидуальный диапазон определения количества пептида, но также и диапазон МС-сигналов для каждого пептида в предварительно проанализированных опухолевых образцах. Цель состояла в том, чтобы каждая калибровочная кривая включала специфический для пептида диапазон МС-сигналов по меньшей мере 80% типичных образцов, использующихся авторами изобретения.

Для построения точных калибровочных кривых необходим синтетический стандарт, который должен быть количественно проанализирован независимым способом и иметь такие же характеристики, что и природный TUMAP. Авторы изобретения использовали версии TUMAP с двойными изотопными метками, т.е. во время синтеза TUMAP были введены две аминокислоты с изотопными метками. Дважды меченные версии можно отличить от природного пептида TUMAP по разнице в массе 12-18 Да в зависимости от меченой аминокислоты. Помимо массы, мечение изотопами не меняет свойства пептида при МС, т.е. пептиды с одинаковыми последовательностями, но разными изотопными метками приведут к одинаковой интенсивности МС-сигналов (Anderson et al., 2012). После синтеза пептиды TUMAP с двойными метками прошли точное количественное определение с помощью анализа на содержание азота в целях установления точной корреляции между количеством пептида и МС-сигналом.

Калибровочные кривые были построены по меньшей мере в трех разных матрицах, т.е. элюатах пептида HLA из природных образцов, подобных обычным образцам для МС, и каждый препарат прошел два цикла измерений на МС. Чтобы компенсировать любые технические различия между циклами МС, во все измерения был включен пептид внутреннего стандарта. Соотношение МС-сигналов титрованного пептида и фиксированного внутреннего стандарта было нанесено на график, и калибровочная кривая была рассчитана методом логистической регрессии (фиг. 3). Нижний предел количественного определения (НПКО) был определен визуально с учетом отклонения от линейности. Если отклонение от линейности не было очевидным, как в случае пептида FAP-003 (фиг. 4), для вычисления НПКО использовали среднее соотношение самых низких количеств пептида. Верхний предел количественного определения, т.е. отклонение от линейности при высших концентрациях, ни для одной калибровочной кривой достигнут не был.

В реальных экспериментах по количественному определению в каждый образец добавляли то же самое количество внутреннего стандарта, что и для построения калибровочной кривой, и рассчитывали соотношение природного пептида и пептида внутреннего стандарта. Данный "метод внутреннего стандарта" является известным методом количественного определения белков на основе результатов МС, например для анализа биомаркеров в биологических образцах (Sturm et al., 2012; Prasad and Unadkat, 2014; Sato et al., 2012). Калибровочные кривые и значения, измеренные на реальных образцах опухолей, представлены на фиг. 4 и 5 для HLA-A*02 и на фиг. 6 и 7 для HLA-A*24 для всех пептидов TUMAP, выбранных для абсолютного количественного определения.

Для оценки вариации количественных МС измерений был рассчитан коэффициент вариации (КВ в %) содержания пептида для каждого МС образца. Значения КВ каждого МС образца были нанесены на график, и полную вариацию МС измерений оценивали как медианный КВ (фиг. 8).

Эффективность выделения комплексов пептид/МНС

Как в случае любого процесса очистки белков, выделение белков из образцов ткани связано с определенными потерями исследуемого белка. Для определения эффективности выделения пептида TUMAP для всех пептидов TUMAP, выбранных для абсолютного количественного определения, были получены комплексы пептид-МНС. Чтобы отличить комплексы пептид-МНС со стандартными добавками от комплексов с природным пептидом, использовали версии пептидов TUMAP с одной изотопной меткой, т.е. во время синтеза TUMAP вводили одну аминокислоту с изотопной меткой. Данные комплексы добавляли в качестве стандартной добавки в свежеприготовленные лизаты тканей, т.е. в самый ранний возможный момент процесса выделения пептида TUMAP, а затем проводили улавливание, как природных комплексов пептид-МНС в процессе последующей аффинной очистки. Таким образом, измерение степени извлечения однократно меченных пептидов TUMAP позволяет сделать заключения относительно эффективности выделения отдельных природных пептидов TUMAP.

Эффективность выделения определяли на 13 образцах, которые были выбраны для абсолютного количественного определения пептидов TUMAP (7 HLA-A*02-положительных, 5 HLA-A*24-положительных и 1 HLA-A*02/A*24 дважды положительный образец). Восемь A*02-положительных образцов были проанализированы на эффективность выделения A*02 пептидов TUMAP и шесть A*24-положительных образцов - для A*24 пептидов TUMAP (фиг. 9 А, В). Результаты позволяют предположить, что для большинства пептидов эффективность выделения является сопоставимой среди различных образцов тканей. Напротив, эффективность выделения отдельных пептидов различна. Поэтому можно предположить, что эффективность выделения, хотя она определялась только для ограниченного числа образцов тканей, может быть экстраполирована на любой другой препарат ткани. Тем не менее, необходимо проанализировать каждый пептид TUMAP в отдельности, поскольку эффективность выделения не может быть экстраполирована с одного пептида на другие.

В редких случаях эффективность выделения нереалистично высока и/или сильно варьируется, на-

пример для пептида NCAPG-001 (фиг. 9 А). В случаях когда эффективность было невозможно определить, например, вследствие связанных с пептидом сложностей количественного определения (например, высокий уровень НПКО для пептидов CCNB1-002, ASPM-001) или расчет эффективности дал результат, превышающий 100%, авторы изобретения принимали значение эффективности выделения равным 100%. Это консервативный подход, который, скорее всего, дает завышенные результаты эффективности выделения и тем самым приводит к занижению числа копий пептида на одну клетку.

Для оценки вариации в эффективности выделения TUMAP был построен график для коэффициента вариации (КВ в %) для выделения отдельных пептидов TUMAP из 6-8 образцов (фиг. 9 С). Итак, средняя вариация для пептидов A*02 TUMAP составляет 24% и для A*24 пептидов TUMAP - 32% соответственно.

Определение числа клеток в твердой замороженной ткани

Другим критическим фактором для расчета числа копий пептида на клетку является оценка общего числа клеток образцов ткани, использованных для выделения пептида TUMAP. Авторы изобретения приняли решение использовать анализ содержания ДНК, поскольку этот метод применим к широкому диапазону образцов различного происхождения и, что наиболее важно, к замороженным образцам (Fogsey and Chaudhuri, 2009; Alcoser et al., 2011; Alcoser et al., 2011; Silva et al., 2013).

С учетом внутриопухолевой гетерогенности число клеток необходимо определять из фрагмента ткани, являющегося репрезентативным для всего тканевого образца, использованного для выделения пептида TUMAP. Тканевый лизат, приготовленный во время выделения пептида TUMAP, является подходящим образцом для анализа ДНК, поскольку он более гомогенный по сравнению с фракцией твердой ткани. После выделения ДНК проводили количественное определение суммарной концентрации ДНК в анализе на основе флуоресценции (Life Technologies, набор Qubit HS для количественного определения ДНК), и вычисляли суммарное содержание ДНК в образцах.

Для расчета числа клеток из заданного количества ДНК авторы изобретения учитывали два различных способа. Во-первых, число клеток может быть рассчитано с помощью теоретической массы человеческого генома, которая составляет, по оценкам, приблизительно 6,67 пг ДНК на диплоидный геном (Alcoser et al., 2011; Konigshoff et al., 2003). В качестве альтернативы образцы с известным числом клеток могут быть использованы для построения стандартной кривой ДНК с помощью тех же методов, что и для образцов ткани. Этот метод уже компенсирует какое-либо влияние процедур выделения и количественного определения ДНК, таким образом, увеличивая точность полученных результатов. Авторы изобретения построили две разные стандартные кривые, одну из семи различных линий опухолевых клеток и одну - из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) шести здоровых доноров.

Для сравнения всех трех методов оценки (теоретическая масса ДНК и две разные стандартные кривые на основе клеток) рассчитывали число клеток на 1 г ткани для нескольких образцов (фиг. 10 А). Расчеты с использованием результата стандарта клеточной линии дают существенно более низкое число клеток (макс. занижение в 3,6 раза) по сравнению с использованием стандарта МКПК. Это было ожидаемым, если учесть, что в линиях опухолевых клеток, как правило, выше доля анеуплоидных клеток с более высоким содержанием ДНК по сравнению со здоровыми диплоидными МКПК. Из литературных источников известно, что доля диплоидных опухолей желудка колеблется от 25 до 67% в зависимости от исследования (Hiyama et al., 1995; Tamura et al., 1991; Wiksten et al., 2008; Zhang et al., 2005; Sugai et al., 2005). Поскольку плоидность и доля анеуплоидных клеток образцов ткани неизвестны, обе стандартные кривые могут дать лишь приблизительную оценку истинного числа клеток, но не учитывают все свойства отдельного образца ткани. Другим источником вариабельности является неизвестный статус пролиферации в образце ткани или присутствие некротических клеток. В частности, удвоение содержания ДНК в пролиферирующих клетках увеличивает количество ДНК по отношению к числу клеток и тем самым приводит к искажению результатов вычисления числа клеток. В двух образцах нормальной ткани желудка авторы изобретения вычислили более низкое число клеток на 1 г ткани по сравнению с опухолевыми образцами при использовании всех трех подходов.

В качестве консервативного подхода авторы изобретения решили использовать стандартную кривую МКПК (фиг. 10 В), которая может привести к завышению числа клеток в части гипердиплоидных образцов ткани, приводя к заниженному числу копий пептида на клетку в таких образцах, однако это никогда не приведет к завышению их числа в каком-либо образце.

Для анализа образцов ткани, выбранных для абсолютного количественного определения пептидов TUMAP, авторы изобретения выделили ДНК из 2-3 аликвот тканевого лизата, и каждый препарат ДНК был количественно проанализирован с 2-3 повторами с помощью флуоресцентного анализа. Общее число клеток и число клеток на 1 г ткани рассчитывали из суммарного содержания ДНК с помощью стандартной кривой МКПК (фиг. 11 А). В целях получения оценки полной вариации для анализа числа клеток сначала определяли коэффициент вариации (%) на уровне каждого образца или, если такой имелся, биологического репликата (т.е. независимые препараты тканевого лизата из различных участков одной опухоли). При данных расчетах учитывали вариацию между аликвотами тканевого лизата, а также результаты повторных измерений в флуоресцентном анализе. Эти КВ представлены на фиг. 11 В, и полную вариацию определяли в виде медианы показанных КВ. Вариабельность может быть отчасти объяснена тем фактом, что тканевые лизаты были не полностью гомогенизированы, т.е. оставшиеся частицы

ткани, содержащие недиссоциированные клетки, приводят к более высокому числу клеток для отдельных репликатов, полученных при выделении (см., например, GC816T на фиг. 11 А).

Число копий пептида на одну клетку

Имея данные количественного определения пептида методом наноЖХ-МС/МС ("общий пептид"), эффективности выделения пептида TUMAP ("% эффективности выделения") и число клеток каждого имеющегося опухолевого образца, можно вычислить число копий пептида TUMAP на одну клетку по следующей формуле.

Количество общего пептида рассчитывается по результатам 2-4 экспериментов наноЖХ-МС/МС ("пептид/цикл [фмоль]") при использовании калибровочных кривых, представленных на фиг. 4-7.

$$total\ peptide = \left(\frac{peptide}{run} [fmol] \right) \times \frac{6,022 \times 10^{23} \left[\frac{1}{mol} \right]}{10^{15} \left[\frac{fmol}{mol} \right]} \times \frac{peptide\ eluate [\mu L]}{MS\ sample\ per\ run [\mu L]} \times$$

$$\frac{100\%}{\% \text{ of lysate used for TUMAP isolation}}$$

(2)

<i>total peptide</i>	<i>общий пептид</i>
<i>peptide</i>	<i>пептид</i>
<i>run</i>	<i>цикл</i>
<i>fmol</i>	<i>фмоль</i>
<i>mol</i>	<i>моль</i>
<i>peptide eluate</i>	<i>пептидный элюат</i>
<i>μL</i>	<i>мкл</i>
<i>MS</i>	<i>МС</i>
<i>sample per run</i>	<i>образец на цикл</i>
<i>% of lysate used for TUMAP isolation</i>	<i>% лизата, использованного для выделения пептидов TUMAP</i>

Для расчета абсолютного числа копий пептида использовались только результаты МС измерений выше НПКО, как определено с помощью калибровочных кривых. НПКО относится к количеству пептида TUMAP по результатам эксперимента методом наноЖХ-МС/МС ("НПКО/цикл [фмоль]").

Число копий на одну клетку всех пептидов, которые могли быть количественно проанализированы, находится в диапазоне от 50 до 30000 копий на клетку (см. табл.3).

Таблица 3. Сводка данных по числу копий на клетку для HLA-A*02 и HLA-A*24 пептидов TUMAP

Аллель HLA	Код пептида	Количественное определение в «n» образцов (% проанализированных образцов)	Копий на клетку (диапазон отдельных образцов и репликатов биологических образцов)
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

HLA-A*02 пептиды TUMAP анализировали в восьми образцах, HLA-A*24 TUMAP - в шести образцах, nq = не были количественно определены, поскольку количество пептида было ниже НПКО.

В целях визуализации НПКО в контексте "числа копий пептида на клетку" для каждого пептида TUMAP в каждом образце рассчитывали "НПКО на клетку" с использованием двух приведенных выше формул. Поскольку образцы различаются по общему числу клеток, у каждого образца имеется свой НПКО на клетку (см. фиг. 12 и 13 для A*02 пептидов TUMAP и фиг. 14 и 15 для A*24 пептидов TUMAP).

Оценка погрешности абсолютного количественного определения пептидов TUMAP

Для оценки вариации абсолютного количественного определения пептидов TUMAP авторы изобретения учитывали относительную вариацию трех основных результатов экспериментов, как было описано выше:

- а) количества выделенных пептидов TUMAP: относительное отклонение 1,8% (A*02) и 2,1% (A*24);
- б) эффективности выделения пептидов TUMAP: относительное отклонение 24% (A*02) и 32% (A*24);
- в) число клеток тканевого образца: относительное отклонение 27%.

Допуская нормальное распределение переменных величин, относительная погрешность (σ) "числа копий на одну клетку" может быть рассчитана как квадратный корень из суммы квадратных относительных погрешностей каждой переменной:

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

<i>copies</i>	<i>копий</i>
<i>total cell count</i>	<i>общего числа клеток</i>
<i>total peptide</i>	<i>общего пептида</i>
<i>isolation efficiency</i>	<i>эффективности выделения</i>

Из значений, приведенных выше, коэффициент вариации абсолютного числа копий пептида на одну клетку составляет приблизительно 36 % для HLA-A*02- и 42 % для HLA-A*24-связывающих пептидов. Чтобы получить представление о вариации результатов, были рассчитаны абсолютная и относительная погрешности числа копий пептида на одну клетку для модельного пептида и образца (табл. 4).

Таблица 4. Примеры результатов расчета абсолютной и относительной погрешности абсолютного количественного определения пептидов TUMAP для модельного пептида

	значение	A*02		A*24	
		отн. погрешность (%)	абс. погрешность	отн. погрешность (%)	абс. погрешность
Общее число клеток/образец	1x10 ⁸	27%	-	27%	-
Общий пептид [фмоль]	16,25	1,8%	-	2,1%	-
Эффективность выделения комплекса пептид/МНС	10%	24%	-	32%	--
Число копий пептида на одну клетку	1000	36%	360	42%	420

Расчет с использованием данной модели позволяет предположить, что для комплексного много-этапного анализа абсолютного количественного определения вариация результатов все еще находится в приемлемом диапазоне. Для отдельных пептидов TUMAP относительная погрешность может отклоняться от усредненного значения погрешности, вычисленного в этом описании. Число копий пептида TUMAP на одну клетку можно количественно сравнивать для разных пептидов TUMAP, что позволяет установить приоритет для пептидов TUMAP в целях выбора подходящих мишеней для антител и/или растворимых T-клеточных рецепторов.

Сравнение способа количественного определения пептидов TUMAP с известными опубликованными способами

До сих пор не было представлено точного подхода для абсолютного количественного определения числа копий пептида, ассоциированного с МНС, на одну клетку. Еще более важно, что опубликованные ранее способы количественного определения связанных с молекулами МНС пептидов с использованием МС анализа не учитывали потери антигена во время подготовки образца (Tan et al., 2011; Hogan et al., 2005). Группа исследователей во главе с Peter A. von Velen недавно опубликовала способ "точного количественного определения связанных с молекулами МНС пептидов" (Hassan et al., 2014). В данном техническом документе использовали подход для количественного определения двух минорных антигенов гистосовместимости, LB-NISCH-1A и LB-SSR1-1S на клетках EBV-LCL JYpp65. Однако отдельные этапы проведения эксперимента, по существу, различны, что вкратце представлено ниже в таблице.

Таблица 5. Сравнение способов количественного определения пептидов TUMAP согласно Hassan и соавторам и согласно настоящему изобретению

	Hassan и соавт.	Настоящее изобретение
Калибровочные кривые для пептидов	Использовались только для определения диапазона линейности, с допущением, что все пептиды имеют одинаковую корреляцию количества пептида и МС сигнала (наклон = 1)	Для определения диапазона линейности, НПКО и в целях определения количества пептида; учитывает пептид-специфическую корреляцию количества и МС сигнала для каждого отдельного пептида
Количественное	Калибровка по одной точке	Метод внутреннего

определение пептидов	соотношение сигнала с сигналом добавленного стандарта пептида	стандарта, основанный на пептид-специфической калибровочной кривой, количественное определение образцов вблизи НПКО
Эффективность выделения	комплексов пептид-МНС, добавленных в лизат после 2 часов лизиса и разделение центрифугированием, потери пептида на этих этапах не принимаются во внимание	комплексов пептид-МНС, введенных как стандартные добавки непосредственно после гомогенизации ткани, т. е. в самый ранний момент времени в процессе выделения пептида
Образцы	Клеточная линия	Твердая опухолевая ткань
Подготовка образца	Дополнительный этап хроматографии с фазой C18, использованный для снижения уровня сложности образца, перед конечной наноЖХ-МС/МС.	Незамедлительное использование образца после иммунопреципитации и фильтрации для наноЖХ-МС/МС
Определение числа клеток	Подсчет клеток во время подготовки клеточного осадка	Анализ содержания ДНК в лизате твердых тканей
Расчет погрешности	Учитывается только вариация повторных измерений методом МС (КВ 0,1-7,1%), но не вариацию при выделении комплекса пептид-МНС (26% и 91%, соответственно) и подсчета числа клеток.	Учитываются вариации повторных измерений методом МС (КВ в среднем 1,8-2,1%), эффективности выделения комплексов пептид-МНС (КВ в среднем 24-32%) и определения числа клеток (КВ в среднем 27%).

Число копий двух пептидов, проанализированных Hassan и соавторы, варьировалось от 800 до 5300 (относительное отклонение 74%) и от 3000 до 12000 (относительное отклонение 60%) копий на клетку среди репликатов биологических образцов соответственно. Причина этих вариаций четко не обсуждается, но может быть связана с использованием различных приборов для МС.

Итак, ожидается, что усовершенствованный способ настоящего изобретения внесет свой вклад в получение более точных и достоверных результатов.

Количественное определение пептидов с низким числом копий

В целях демонстрации достоинств способа по изобретению были получены данные, которые представлены далее в таблице. Были идентифицированы пептиды, которые представлены очень малым числом копий, среди них пептид PDE11-001. Можно видеть, что данный способ позволяет определение такого малого числа копий как приблизительно 10 копий пептида на клетку.

Таблица 6. Количественное определение пептидов с низким числом копий

Код пептида	Число копий на клетку			Количество образцов			Источник/HLA
	Мин.	Медиана	Макс.	> НПКО	> ПКО	подлежащие оценке	
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

РПрЖ - рак предстательной железы - последовательность PDE11-001 - это ALLESRVNL (SEQ ID NO 25)

PDE11-001 является связывающимся с HLA-A*02 пептидом, полученным из фосфодиэстеразы 11A (PDE11A), которая катализирует гидролиз цАМФ и цГМФ, тем самым подавляя соответствующие сигнальные пути. Мутации PDE11A ассоциировались с аденокарциномой гиперплазией, а также с семейной формой герминогенной опухоли яичек. Пептид был обнаружен на образцах раковых опухолей предстательной железы, а также в тканях гепатоклеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы и почечноклеточной карциномы, но не в каких-либо нормальных тканях.

Цитируемая литература.

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

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

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

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

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

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

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

Prasad B, Unadkat JD (2014). Comparison of Heavy Labeled (SIL) Peptide versus SILAC Protein Internal Standards for LC-MS/MS Quantification of Hepatic Drug Transporters. *Int. J Proteomics.* 2014, 451510.

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

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

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

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

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

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения абсолютного количества по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС на клетке, где указанный способ включает:

а) приготовление клеток, презентирующих указанный по меньшей мере один пептидный лиганд МНС из биологического образца, выбранного из образца ткани, образца крови, образца опухоли или образца инфицированной ткани, включающего указанные клетки, включающее ферментативное расщепление тканей, и/или лизис клеток;

б) определение числа клеток в указанном препарате этапа а), включающее способ, выбранный из подсчета ядер клеток, фотометрического метода определения ДНК, флуориметрического метода определения ДНК или количественной ПЦР;

в) добавление известного количества указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС и/или комплекса пептидного лиганда с МНС, подлежащего количественному определению, в указанный препарат этапа а) непосредственно после гомогенизации ткани ("добавка I");

г) выделение по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС из указанного препарата этапа в) в целях получения пептидного элюата;

д) добавление известного количества по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС, подлежащего количественному определению, в указанный пептидный элюат ("добавка II");

е) проведение масс-спектрометрического анализа указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС в целях получения по меньшей мере одного

аа) сигнала для эффективности выделения на этапе г),

бб) сигнала для известного количества указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС, добавленного на этапе д), и

вв) сигнала для указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС из указанного препарата клеток этапа а), и;

ж) количественное определение указанного по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС на основе сравнения сигналов, полученных на этапе е), с

аа) полученным числом клеток,

бб) известным количеством указанного по меньшей мере одного лиганда пептида МНС и/или комплекса пептидного лиганда с МНС, подлежащего определению, добавленного на этапе в), и

вв) известным количеством по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС, подлежащего количественному определению, добавленного на этапе д),

за счет чего осуществляется определение абсолютного количества по меньшей мере одного пептидного лиганда МНС на клетке.

2. Способ в соответствии с п.1, где указанный по меньшей мере один пептидный лиганд МНС выбран из опухолеассоциированного пептида (ТАА) или ассоциированного с заболеванием пептида (DAA).

3. Способ в соответствии с п.1 или 2, который дополнительно включает определение количества по меньшей мере одного вида молекул HLA в указанном препарате этапа а).

4. Способ в соответствии с любым из пп.1-3, где добавленный по меньшей мере один комплекс пептида с МНС и/или добавленный по меньшей мере один пептидный лиганд МНС являются мечеными и предпочтительно мечеными различными изотопами.

5. Способ в соответствии с любым из пп.1-4, где выделение включает хроматографию, такую как аффинную хроматографию.

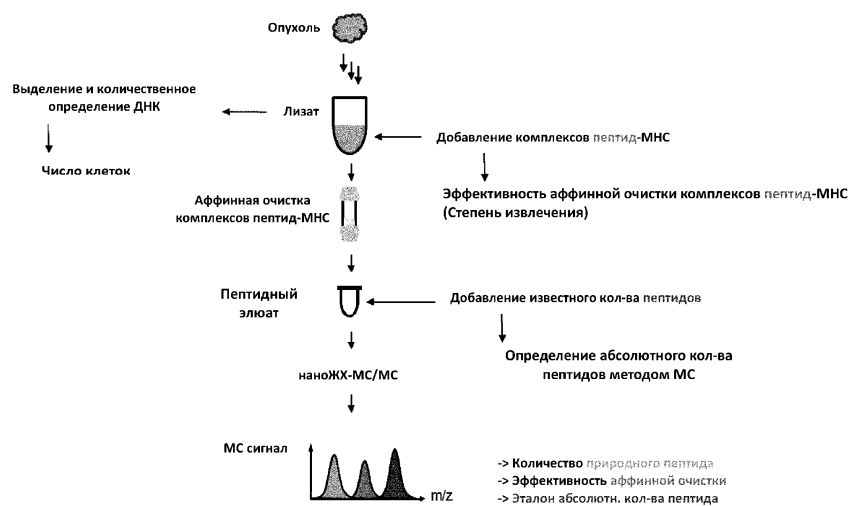
6. Способ в соответствии с любым из пп.1-5, дополнительно включающий выбор избыточно презентруемых, избыточно экспрессируемых и/или опухолеспецифических пептидных лигандов МНС для анализа.

7. Способ в соответствии с любым из пп.1-6, где указанный способ осуществляется на высокопродуктивном уровне.

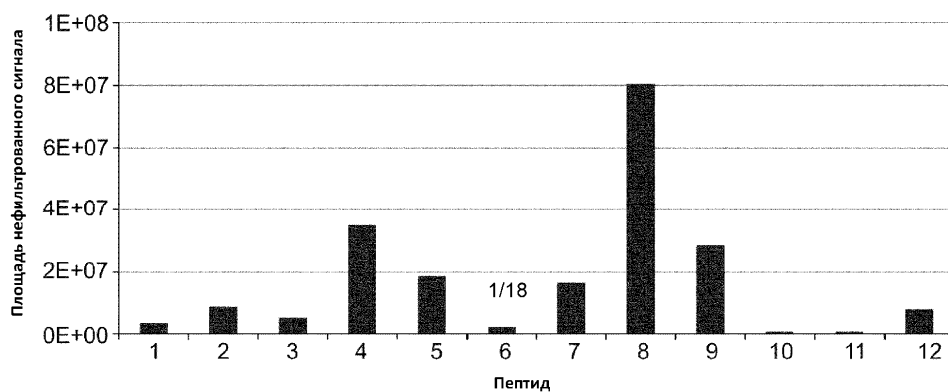
8. Способ в соответствии с любым из пп.1-7, где указанный(ые) биологический(ие) образец(ы) получен(ы) от одного индивида или от группы индивидов, страдающих от одинакового патологического состояния.

9. Способ в соответствии с п.8, дополнительно включающий этап получения персонализированного профиля лигандов МНС, предпочтительно

персонализированного специфичного для заболевания профиля лигандов МНС, основанного на указанных пептидных лигандах МНС, определяемых количественно.

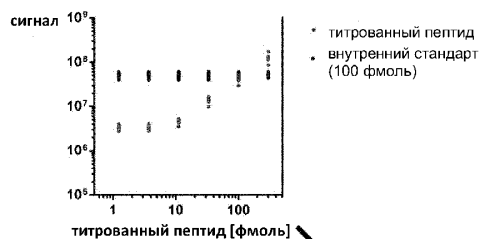


Фиг. 1

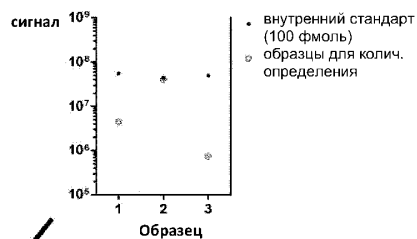


Фиг. 2

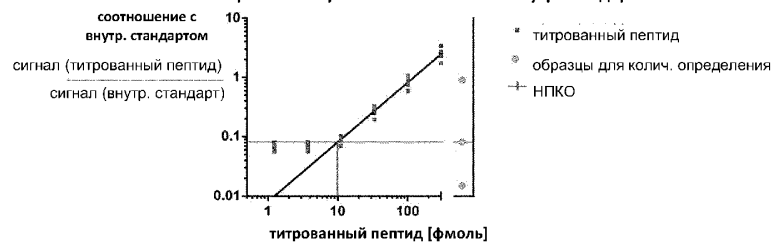
Калибровочные измерения: нефильтрованный МС сигнал



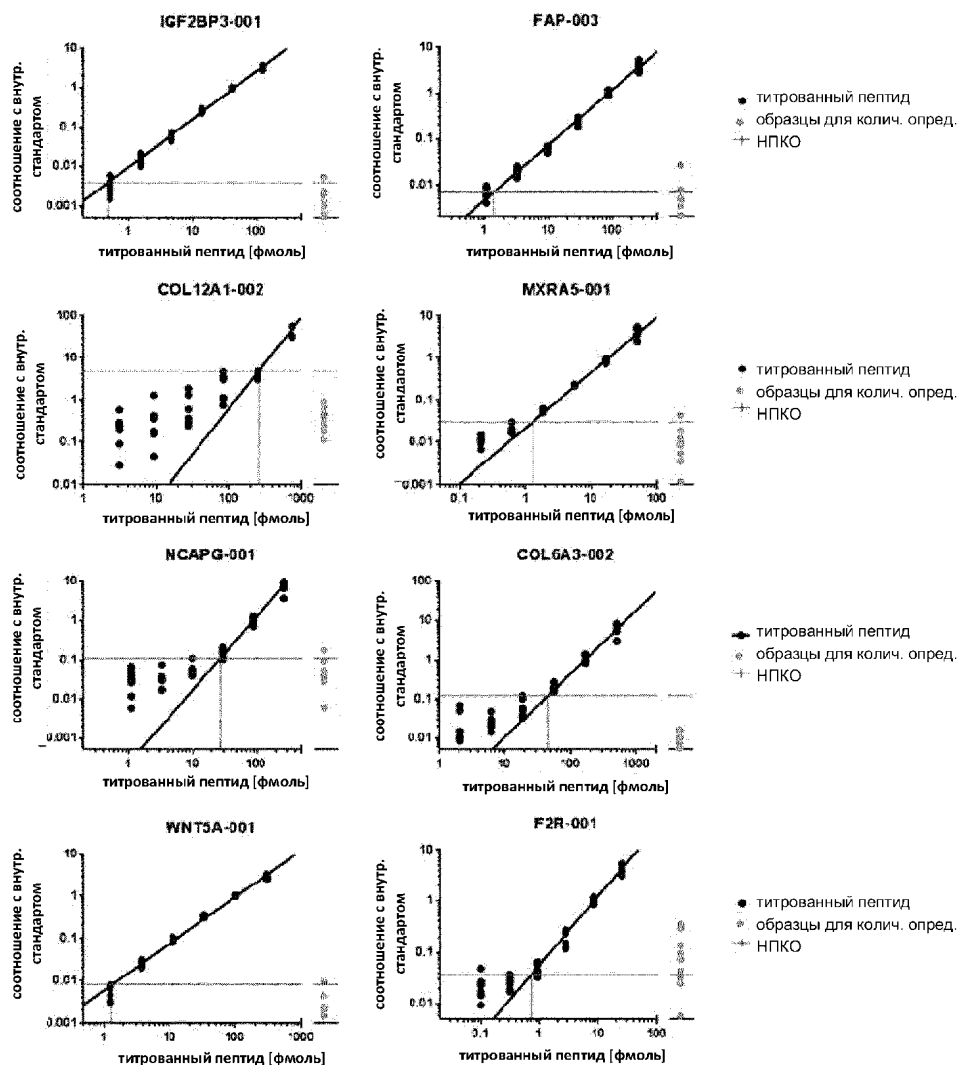
Калибровочные измерения: нефильтрованный сигнал



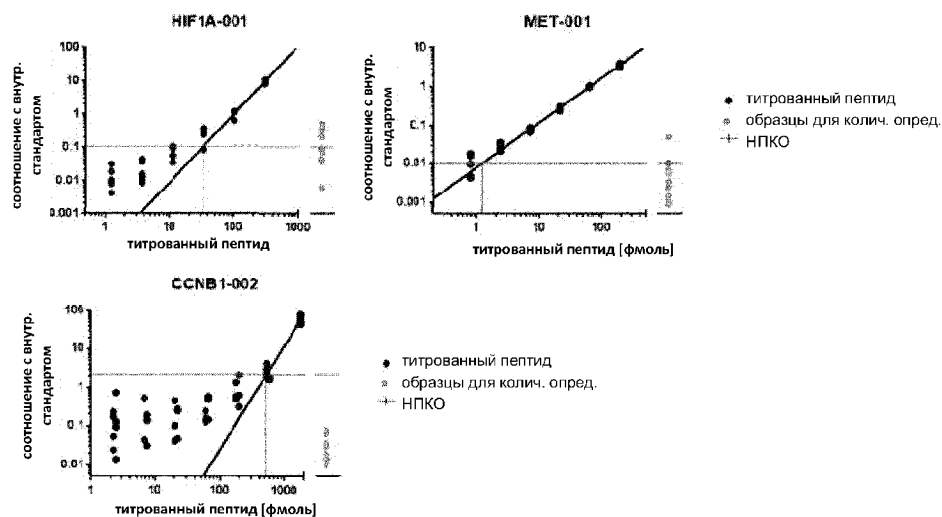
Калибровочная кривая: соотношение с внутр. стандартом



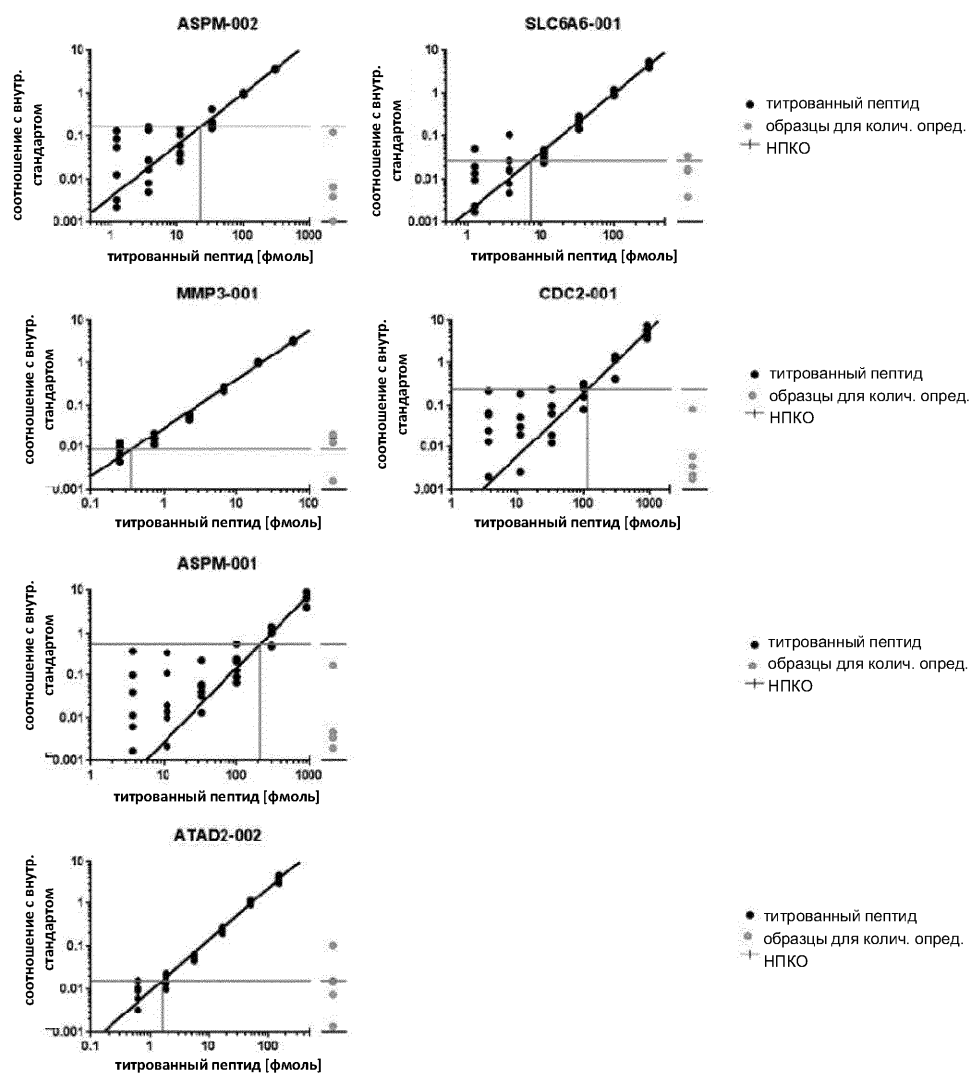
Фиг. 3



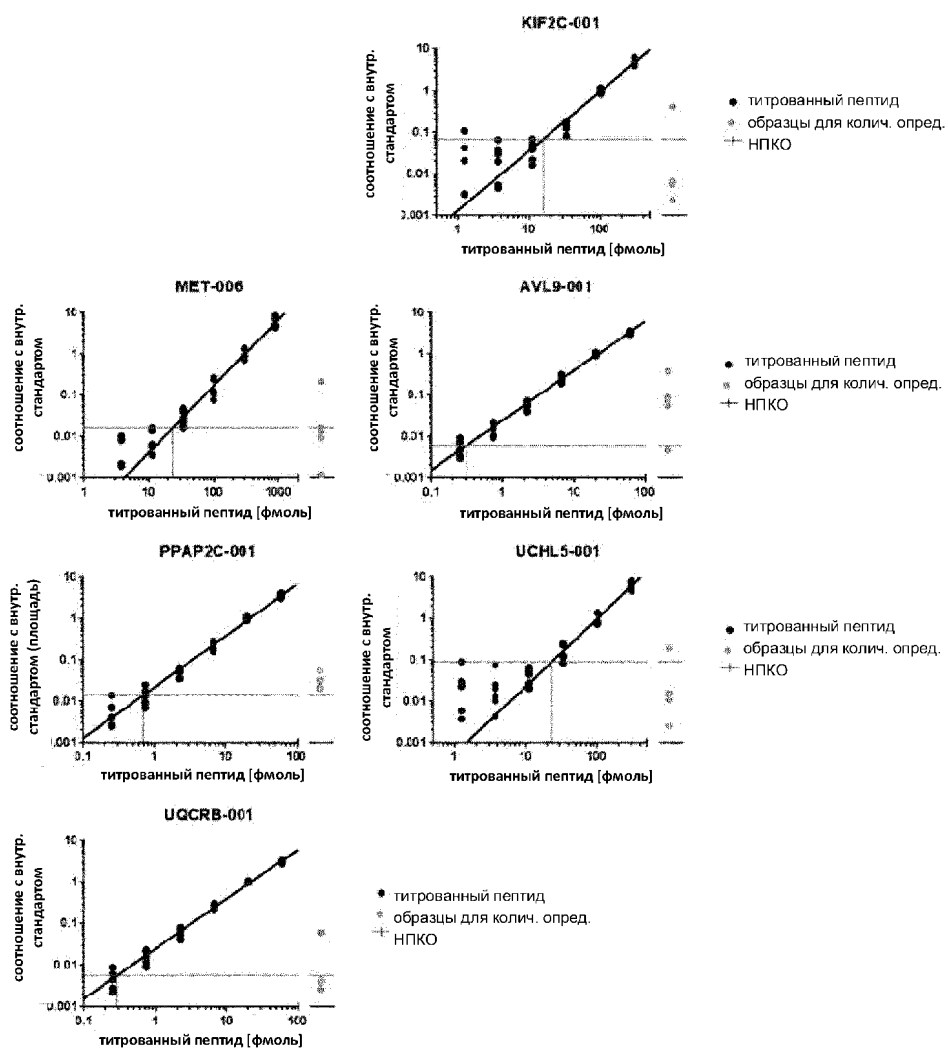
Фиг. 4



Фиг. 5

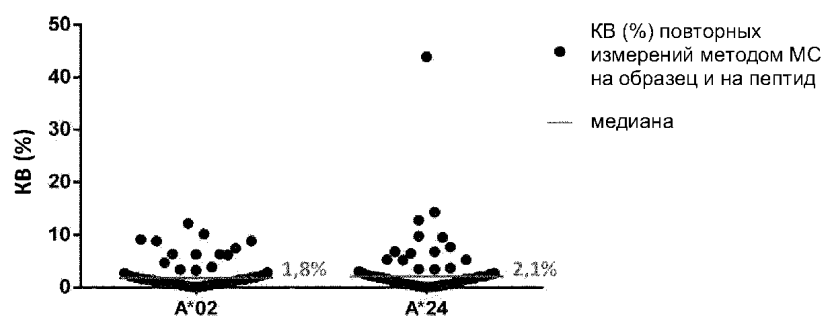


Фиг. 6

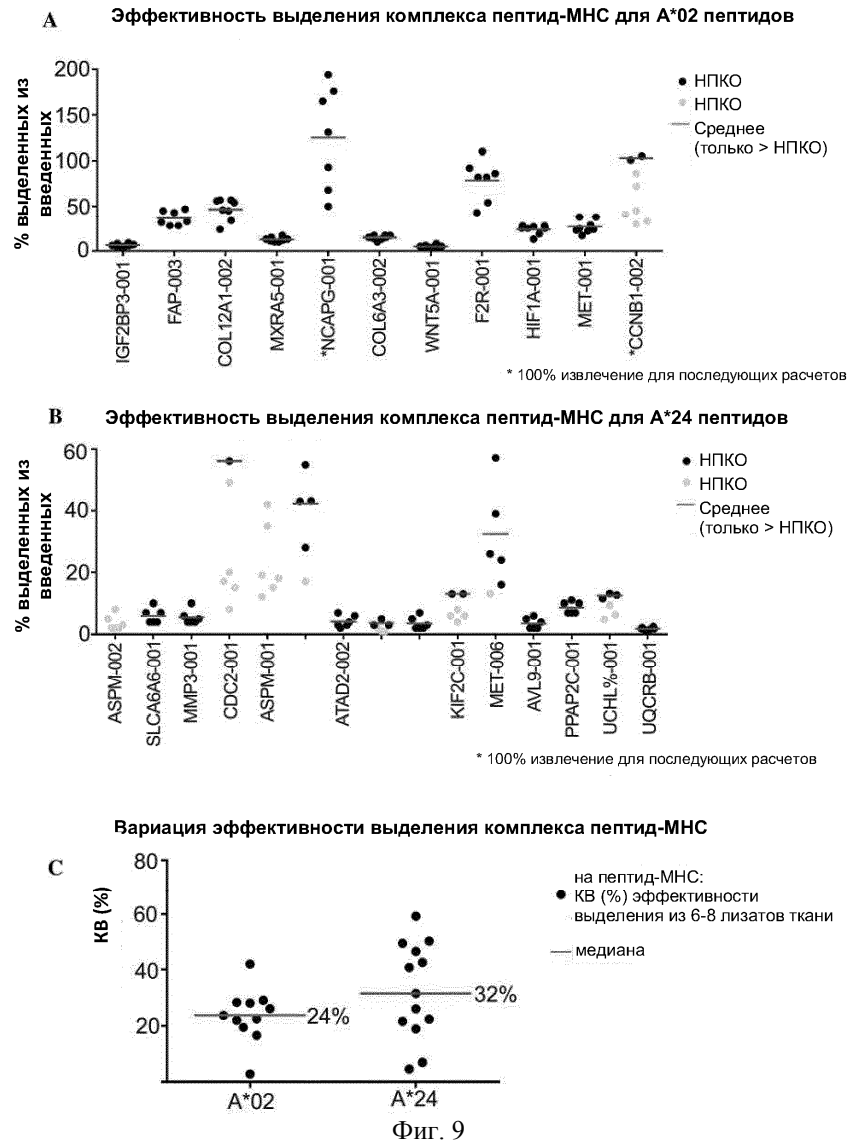


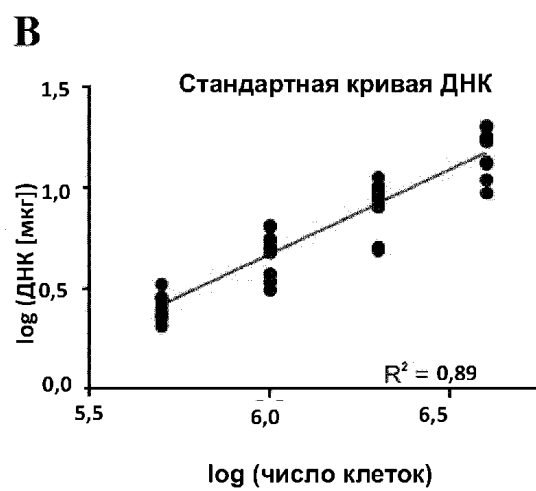
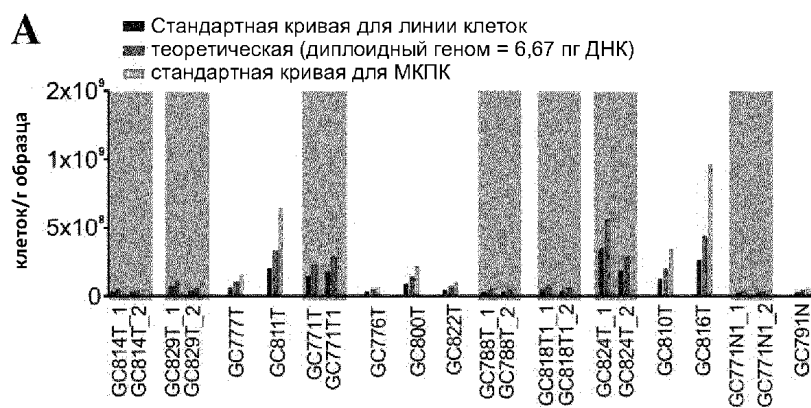
Фиг. 7

Вариация повторных измерений методом МС

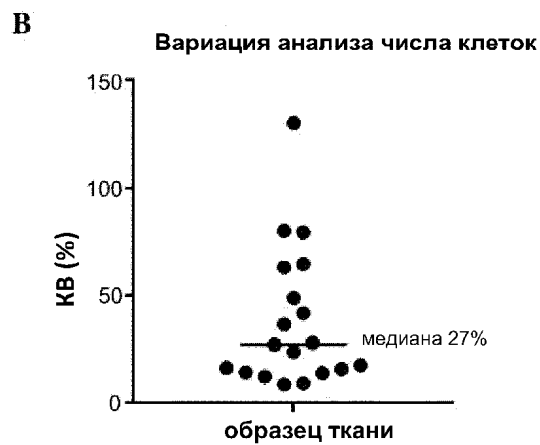
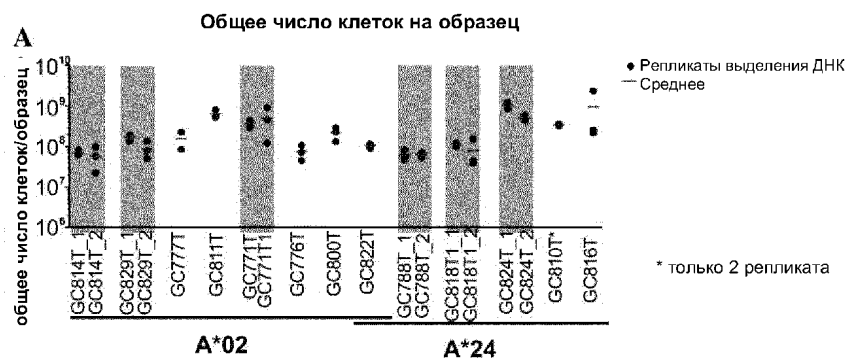


Фиг. 8

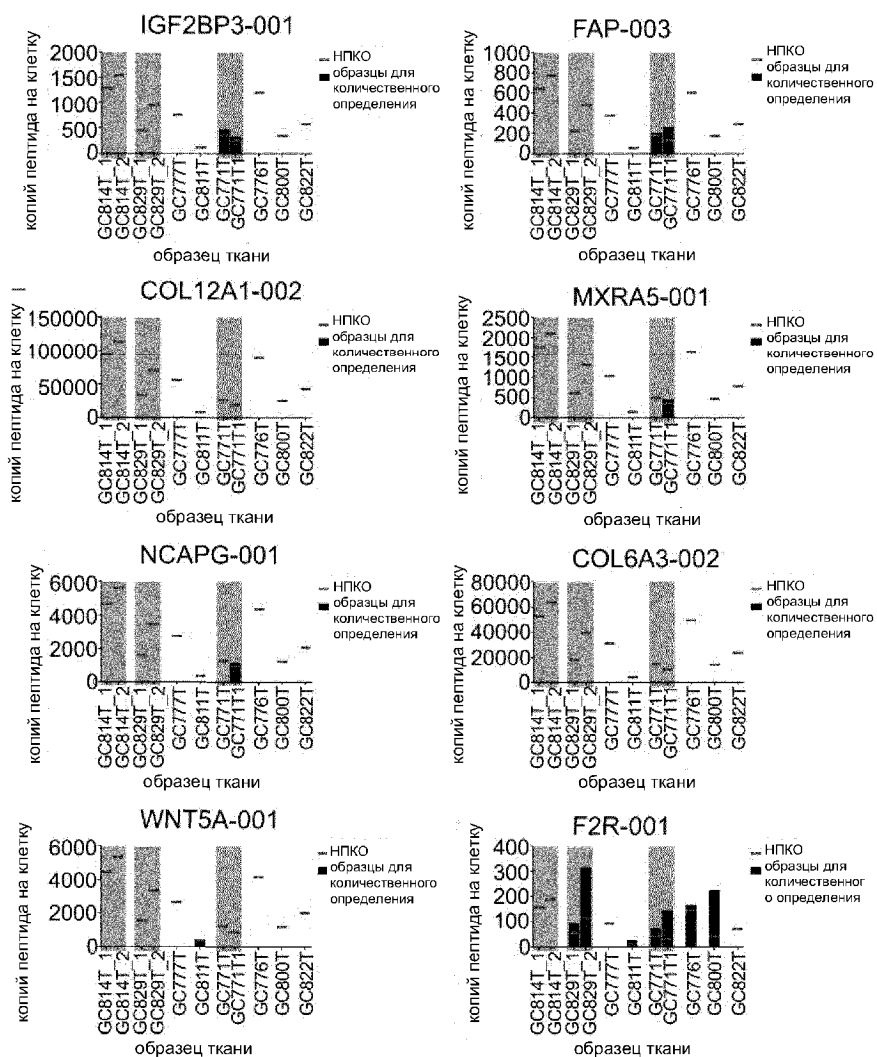




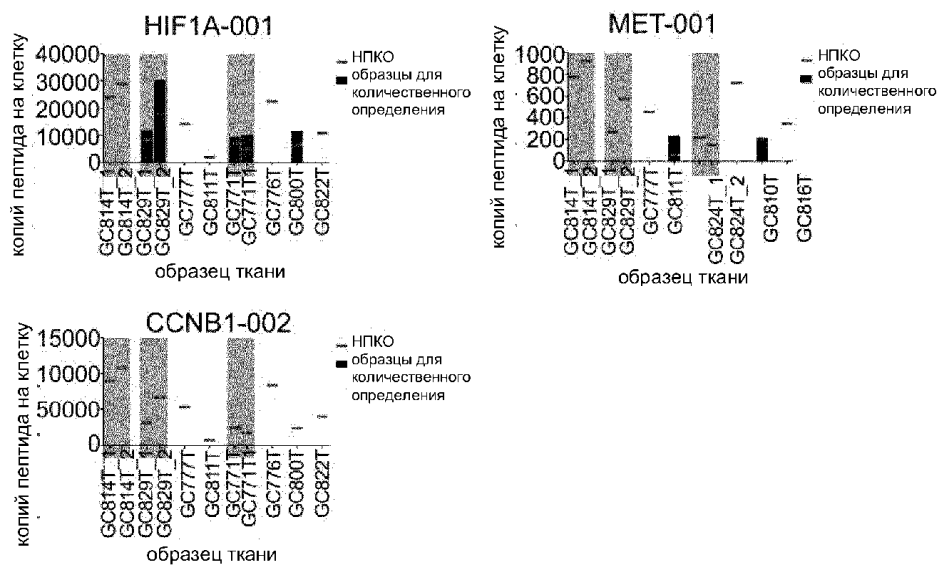
Фиг. 10



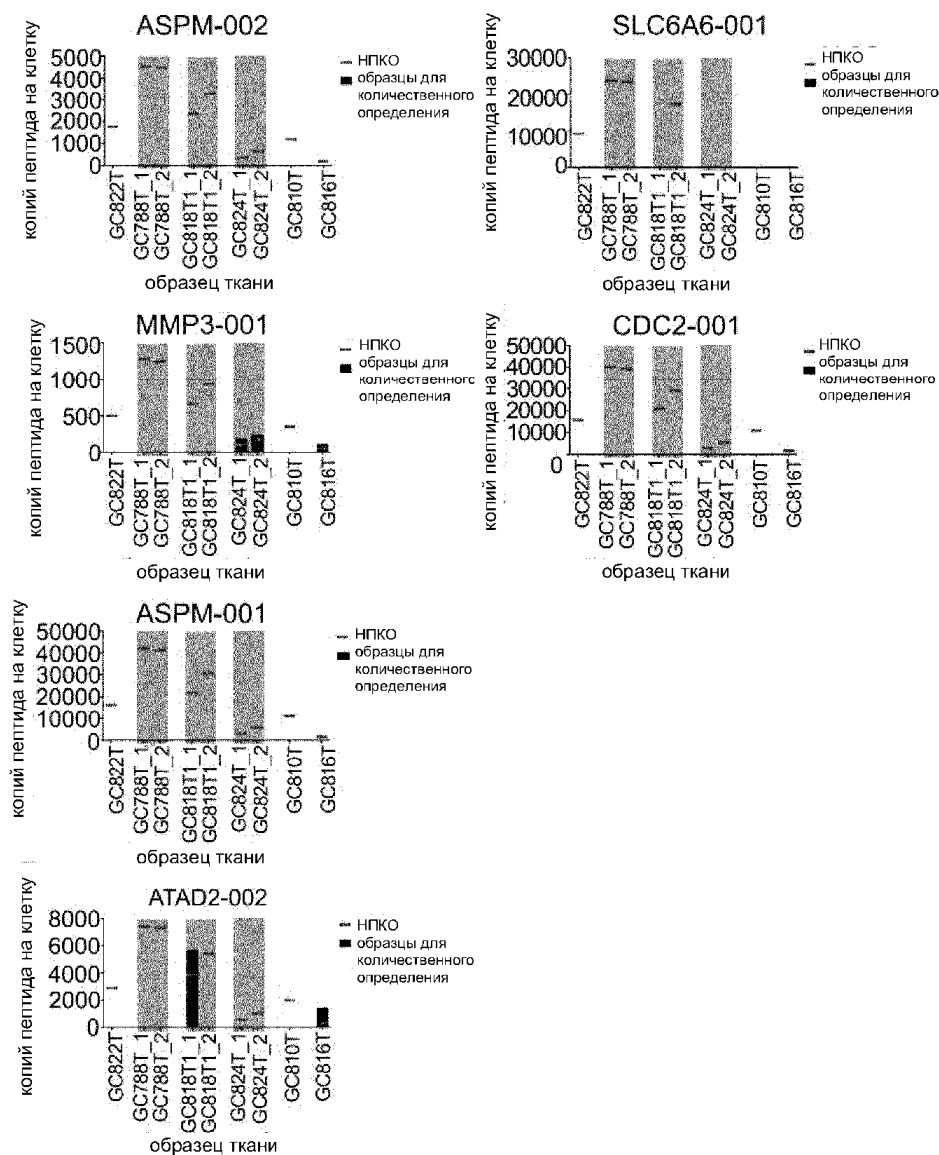
Фиг. 11



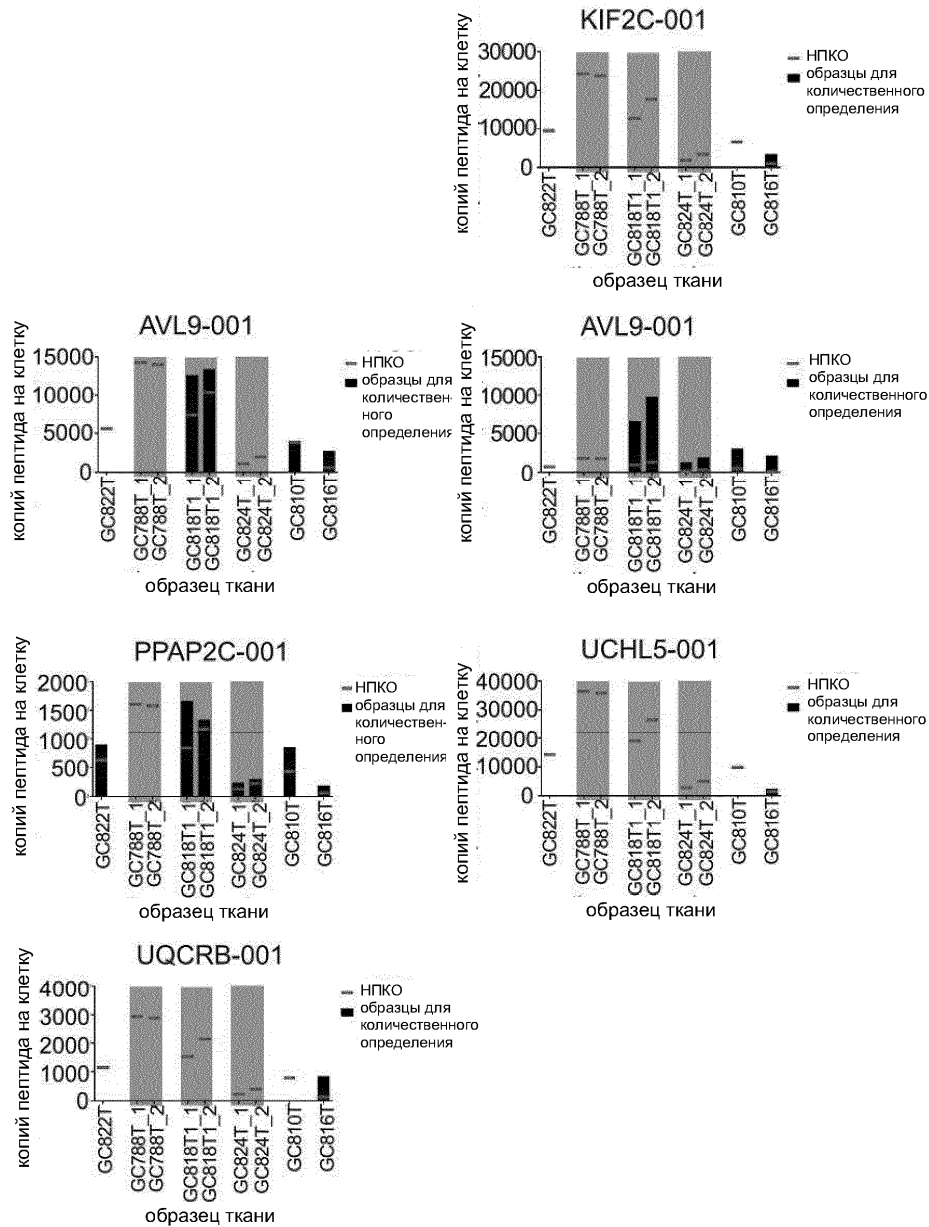
Фиг. 12



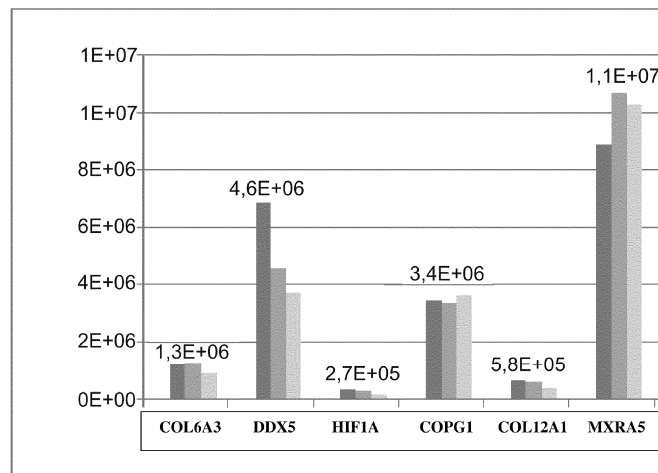
Фиг. 13



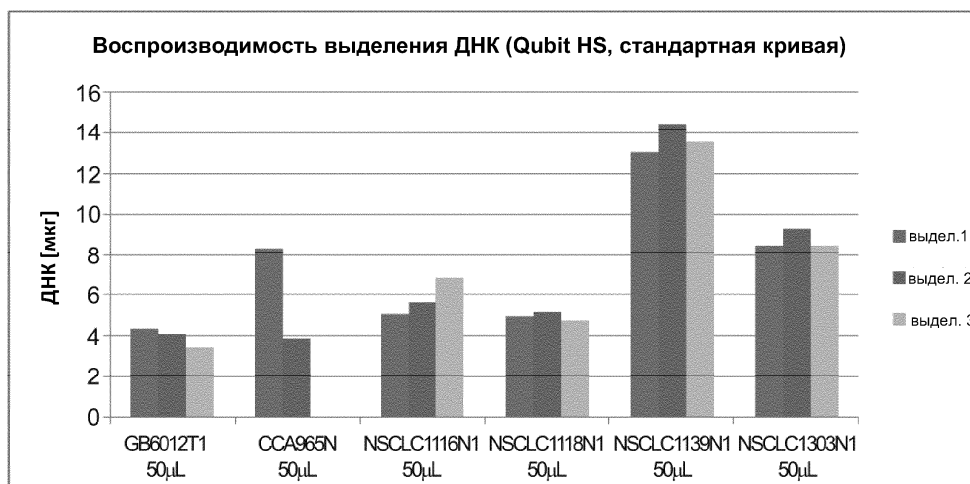
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2