



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0032747

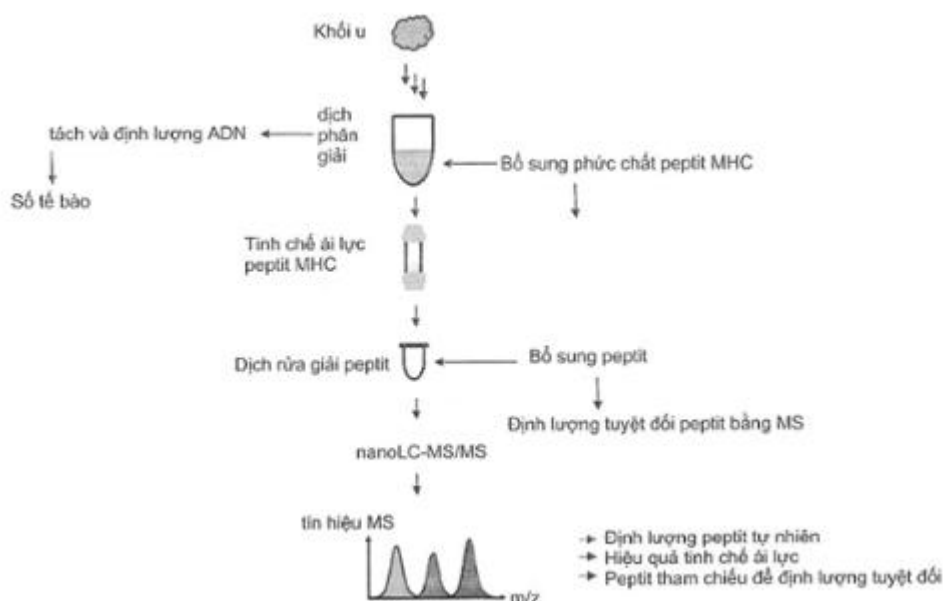
(51)⁷ G01N 33/68

(13) B

(21) 1-2017-01871 (22) 15/12/2015
(86) PCT/EP2015/079873 15/12/2015 (87) WO 2016/107740 A1 07/07/2016
(30) 62/097,994 30/12/2014 US; 1423 361.3 30/12/2014 GB
(45) 25/07/2022 412 (43) 27/11/2017 356A
(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)
Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany
(72) WEINSCHENK, Toni (DE); LEIBOLD, Julia (DE).
(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG TUYỆT ĐỐI PHỐI TỬ PEPTIT PHỨC HỢP
TƯƠNG THÍCH MÔ CHÍNH TRÊN TẾ BÀO

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp định lượng tuyệt đối peptit liên quan đến bệnh ung thư được xử lý tự nhiên giới hạn bởi HLA, tức là xác định số lượng bản sao peptit có mặt cho mỗi tế bào. Sáng chế không chỉ có thể được sử dụng để phát triển liệu pháp kháng thể hoặc vaccin peptit, mà còn có giá trị cao đối với việc theo dõi miễn dịch xác định ở cấp độ phân tử, và có thể dùng trong các phương pháp xác định kháng nguyên peptit mới đối với phương pháp điều trị miễn dịch, như các vaccin tương ứng, liệu pháp điều trị dựa trên kháng thể hoặc phương pháp truyền tế bào T vay mượn trong bệnh ung thư, bệnh nhiễm khuẩn và/hoặc bệnh tự miễn.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp định lượng tuyệt đối các peptit liên quan đến bệnh ung thư được xử lý tự nhiên giới hạn bởi HLA, tức là xác định số lượng bản sao peptit có mặt cho mỗi tế bào. Sáng chế không chỉ có thể được sử dụng để phát triển liệu pháp điều trị bằng kháng thể hoặc vaccin peptit mà còn có giá trị cao đối với việc theo dõi miễn dịch được xác định ở cấp độ phân tử, và có thể dùng trong các phương pháp xác định kháng nguyên peptit mới dùng cho phương pháp điều trị miễn dịch, như các vaccin tương ứng, liệu pháp điều trị dựa trên kháng thể hoặc phương pháp truyền tế bào T vay mượn trong bệnh ung thư, bệnh nhiễm khuẩn và/hoặc bệnh tự miễn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự phát triển liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư và liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh tự miễn và bệnh nhiễm khuẩn để cảm ứng nhánh tế bào T của hệ miễn dịch để chống lại bệnh ung thư có thể được cải thiện về cơ bản nhờ kiến thức uyên thâm về mức độ trình diện peptit gắn kết với kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA) trên các mô sơ cấp bị bệnh. Thông tin này là thích hợp đối với liệu pháp điều trị dựa trên kháng thể hoặc vaccin peptit cụ thể cũng như đối với loại vaccin tế bào T bất kỳ khác dựa trên các chất phân tử như protein, ADN hoặc ARN. Trước đây, loại dữ liệu định lượng này là chưa xác định được đối với mô thu được từ bệnh nhân ở quy mô số lượng bản sao tuyệt đối cho một tế bào.

Phương pháp xác định peptit như nêu trên tránh được vấn đề liên quan đến “miễn dịch học ngược” được bộc lộ trong Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP1508047B1. Như được mô tả trên đây, phương pháp này không thể được sử dụng để định lượng các peptit đã nêu. Phương pháp khác sử dụng cách đánh dấu được bộc lộ trong Công bố đơn quốc tế WO 2005/076009 cho phép định lượng, nhưng không phải định lượng tuyệt đối. Các chất đánh dấu khác được bộc lộ trong Công bố đơn quốc tế WO 03/025576 hoặc được Martin và các đồng tác giả bộc lộ trong tài liệu: Proteomics 2003, 3, 2208-2220.

Phương pháp khác được Fortier và các đồng tác giả bộc lộ (The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome, JEM, Vol. 205, No.3, 17.3.2008 595-610). Phương pháp này có nhược điểm là cần phân lập tách các peptit gắn kết với MHC ra khỏi peptit không gắn kết với MHC nhờ rửa giải bằng axit. Điều này được thực hiện bằng cách sử dụng các dòng tế bào bất hoạt gen b2m: do vậy, phương pháp này không thể được sử dụng đối với vật liệu khối u sơ cấp của bệnh nhân. Trong phương pháp này, tế bào tuyến ức sơ cấp của chuột được so sánh với dòng tế bào EL4 của chuột. Lượng ban đầu đã được điều chỉnh bằng cách xác định lượng phân tử MHC I. Chỉ riêng điều này là hạn chế rõ ràng của phương pháp được bộc lộ bởi Fortier và các đồng tác giả. Ngoài ra, sự chuẩn hóa cần thiết đối với các mô sơ cấp có kích thước và nguồn gốc mô khác nhau không được sử dụng. Đúng hơn là các vật liệu ban đầu đã cân bằng được sử dụng nên không cần chuẩn hóa. Tuy nhiên, việc chuẩn hóa là hoàn toàn cần thiết đối với vật liệu sơ cấp (của bệnh nhân).

Công bố đơn quốc tế số WO2011/128448 bộc lộ phương pháp xác định định lượng kháng nguyên peptit gắn kết với HLA có liên quan của các mẫu mô sơ cấp trên quy mô lớn mà không cần dùng phương pháp đánh dấu. Phương pháp này bao gồm các bước tạo ra ít nhất một mẫu mô sơ cấp bị bệnh và ít nhất một mẫu mô sơ cấp khỏe mạnh, tốt hơn là tương ứng với mô bị bệnh, phân lập phối tử MHC peptit ra khỏi (các) mẫu này, phân tích HPLC-MS đối với các peptit của phối tử MHC, trích xuất cường độ tín hiệu ion tiền chất (diện tích) của mỗi tín hiệu thu được từ các phân tích này, xác định trình tự của phối tử MHC peptit này, và thực hiện bước chuẩn hoá và kiểm soát chất lượng dữ liệu để định lượng tương đối phối tử MHC peptit mà không cần đánh dấu.

Hassan và các đồng tác giả (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>) bộc lộ phương pháp trong đó monome peptit-MHC được đánh dấu bằng chất đồng vị (hpMHC) được điều chế và bổ sung ngay sau khi phân giải tế bào, tức là trước khi xử lý mẫu thông thường. Bằng cách sử dụng phương pháp này, toàn bộ lượng tồn thất trong quá trình xử lý mẫu có thể được tính đến và cho phép xác định chính xác các phối tử đặc hiệu được trình diện bởi MHC nhóm I. Nghiên cứu này xác

định chính xác bước tinh chế miễn dịch là nguồn gốc gây tổn thất khá lớn trong quá trình xử lý sơ bộ mẫu và đưa ra giải pháp khắc phục lượng tổn thất này. Phương pháp này có thể được sử dụng để thu được quan niệm đáng tin cậy về số lượng bản sao epitop và do đó được cho là cho phép cải tiến việc thiết kế vaccin và phương pháp trị liệu miễn dịch.

Sự kích thích đáp ứng miễn dịch phụ thuộc vào sự có mặt của các kháng nguyên được nhận biết là protein ngoại lai bởi hệ miễn dịch của vật chủ. Việc phát hiện ra sự có mặt của các kháng nguyên gây bệnh và liên quan đến khối u đã làm tăng khả năng sử dụng hệ miễn dịch của vật chủ để can thiệp vào quá trình phát triển của khối u. Hiện nay, các cơ chế khác nhau để khai thác cả nhánh tế bào miễn dịch của hệ miễn dịch đang được nghiên cứu đối với liệu pháp điều trị miễn dịch bệnh ung thư.

Các thành phần đặc hiệu của đáp ứng miễn dịch tế bào có thể nhận biết và phá hủy đặc hiệu tế bào khối u. Việc phân lập tế bào T gây độc tế bào (CTL) từ quần thể tế bào thâm nhiễm khối u hoặc từ máu ngoại vi gợi ý rằng các tế bào này đóng vai trò quan trọng trong việc phòng vệ miễn dịch tự nhiên chống lại bệnh ung thư. Cụ thể, tế bào T dương tính với CD8 ($T-CD8^+$) nhận biết các peptit gắn kết với các phân tử phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I. Các peptit này thường có từ 8 đến 12 gốc axit amin có nguồn gốc từ protein hoặc sản phẩm ribosom khiếm khuyết (DRIP) nằm trong phần bào tan và đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng này. Phân tử MHC của người còn được gọi là kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA).

Có hai nhóm phân tử MHC: phân tử MHC nhóm I có thể được phát hiện trên hầu hết các tế bào có nhân. Phân tử MHC bao gồm chuỗi nặng alpha và beta-2-microglobulin (thụ thể MHC nhóm I) hoặc chuỗi alpha và chuỗi beta (thụ thể MHC nhóm II) tương ứng. Cấu dạng ba chiều của chúng tạo ra rãnh gắn kết, rãnh này được sử dụng để tương tác không cộng hoá trị với peptit. MHC nhóm I là các peptit tạo ra từ quá trình phân giải protein của phần lớn protein nội sinh, DRIP và các peptit có phân tử lớn hơn. Phân tử MHC nhóm II có thể được phát hiện chủ yếu trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) chuyên nghiệp, và chủ yếu trình diện các peptit của protein ngoại sinh hoặc xuyên màng được hấp thụ bởi APC trong quá trình nhập nội bào, và sau đó được xử lý. Phức chất của peptit và

phân tử MHC nhóm I được nhận biết bởi các tế bào lymphô T gây độc tế bào dương tính với CD8 mang thụ thể tế bào T (TCR) thích hợp, trong khi phức chất của peptit và phân tử MHC nhóm II được nhận biết bởi tế bào T hỗ trợ dương tính với CD4 mang thụ thể TCR thích hợp. Đã biết rõ là TCR, peptit và MHC có mặt với lượng theo hệ số tỷ lệ 1:1:1.

Để một peptit gây ra (tạo ra) đáp ứng miễn dịch tế bào, nó phải gắn kết với phân tử MHC. Quá trình này phụ thuộc vào alen của phân tử MHC và hiện tượng đa hình đặc hiệu của trình tự axit amin của peptit. Peptit gắn kết với phân tử MHC nhóm I thường có chiều dài từ 8 đến 12 gốc axit amin và thường chứa hai gốc bảo toàn (“neo”) trong trình tự của chúng, peptit này tương tác với rãnh gắn kết tương ứng của phân tử MHC. Theo cách này, mỗi alen của MHC có một motif gắn kết để kiểm soát khả năng của peptit gắn kết đặc hiệu với rãnh gắn kết.

Trong phản ứng miễn dịch phụ thuộc MHC nhóm I, peptit không chỉ cần phải có thể gắn kết với một số phân tử MHC nhóm I nhất định được biểu hiện bởi tế bào khối u, mà chúng còn phải được nhận biết bởi tế bào T mang thụ thể tế bào T (TCR) đặc hiệu.

Các kháng nguyên được nhận biết bởi tế bào lymphô T gây độc tế bào đặc hiệu khối u, tức là epitop của chúng, có thể là phân tử có nguồn gốc từ tất cả các nhóm protein, như enzym, thụ thể, yếu tố phiên mã v.v. chúng được biểu hiện và so sánh với các tế bào không bị biến đổi có cùng nguồn gốc, chúng được điều hòa tăng trong các tế bào của khối u tương ứng.

Sự phân loại hiện nay về các kháng nguyên liên quan đến khối u hoặc các kháng nguyên liên quan đến bệnh bao gồm các nhóm chính sau đây:

Kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư: các kháng nguyên liên quan đến khối u [TAA; kháng nguyên liên quan đến bệnh được viết tắt là DAA (disease-associated antigen)] đầu tiên từng được xác định có thể được nhận biết bởi tế bào T thuộc nhóm này, lúc đầu các kháng nguyên này được gọi là kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư (cancer-testis: CT) do sự biểu hiện của các thành viên của nó trong các khối u của người khác nhau về mô học và trong số các mô bình thường, chúng chỉ biểu hiện trong tế bào tinh/nguyên bào tinh của tinh hoàn và đôi khi trong nhau thai. Do các tế bào tinh hoàn không biểu hiện phân tử HLA nhóm I và II, các kháng nguyên này không thể được nhận biết

bởi tế bào T trong mô bình thường và do đó có thể được cho là đặc hiệu khối u về mặt miễn dịch học. Ví dụ đã biết rõ về kháng nguyên CT là thành viên thuộc họ MAGE hoặc NY-ESO-1.

Kháng nguyên biệt hoá: các TAA này có mặt trong cả khối u và mô bình thường mà từ đó khối u xuất hiện; phần lớn kháng nguyên này được phát hiện trong u melanin và tế bào melanin bình thường. Nhiều protein trong số các protein liên quan đến dòng tế bào melanin này tham gia vào quá trình sinh tổng hợp melanin và do đó không đặc hiệu khối u nhưng được sử dụng rộng rãi đối với liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư. Ví dụ về chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tyrosinaza và Melan-A/MART-1 đối với u melanin hoặc PSA đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

TAA được biểu hiện quá mức: các gen mã hoá TAA được biểu hiện rộng rãi đã được phát hiện trong các loại khối u khác nhau về mặt mô học cũng như trong nhiều mô bình thường, thường là có mức độ biểu hiện thấp hơn. Nhiều epitop được xử lý và có thể được biểu hiện bởi mô bình thường có thể ở mức thấp hơn mức ngưỡng đối với sự nhận biết của tế bào T, trong khi sự biểu hiện quá mức của chúng trong tế bào khối u có thể gây ra đáp ứng kháng khối ung thư bằng cách phá vỡ sự dung nạp đã được thiết lập trước đó. Các ví dụ nổi bật về loại TAA này là Her-2/neu, Survivin, Telomeraza hoặc WT1.

Kháng nguyên đặc hiệu khối u: các TAA đáng chú ý này xuất hiện do sự đột biến các gen bình thường (như β -catenin, CDK4, v.v.). Một số thay đổi phân tử này có liên quan đến sự biến đổi và/hoặc tiến triển của khối u. Kháng nguyên đặc hiệu khối u có thể thường gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh mà không mang nguy cơ phản ứng tự miễn chống lại mô bình thường. Mặt khác, trong hầu hết các trường hợp, các TAA này chỉ liên quan đến khối u chính xác mà trên đó chúng được xác định và thường không có mặt trong nhiều khối u riêng biệt.

TAA xuất hiện do các cải biến bất thường sau dịch mã: các TAA này có thể xuất hiện do protein không đặc hiệu và không được biểu hiện quá mức trong khối u nhưng trở thành có liên quan đến khối u do các quá trình sau dịch mã có hoạt tính chủ yếu trong các khối u. Ví dụ về loại kháng nguyên này xuất hiện do kiểu glycosyl hoá biến đổi dẫn tới các epitop mới trong khối u như đối với MUC1 hoặc các sự kiện như ghép nối protein trong quá trình phân huỷ, chúng có thể đặc

hiệu khối u hoặc có thể không đặc hiệu khối u.

Protein của virus gây bệnh ung thư: các TAA này là các protein của virus có thể đóng vai trò quyết định trong quá trình gây bệnh ung thư và do chúng là protein ngoại lai (không có nguồn gốc từ người), chúng có thể gây ra đáp ứng tế bào T. Ví dụ về protein này là protein E6 và E7 của virus gây u nhú người typ 16, chúng được biểu hiện trong bệnh caxinom cổ tử cung.

Đối với các protein được nhận biết bởi tế bào lymphô T gây độc tế bào là kháng nguyên đặc hiệu hoặc liên quan đến khối u hoặc kháng nguyên đặc hiệu hoặc liên quan đến bệnh, và để sử dụng trong điều trị, các điều kiện tiên quyết cụ thể cần phải được đáp ứng. Kháng nguyên này phải được biểu hiện chủ yếu bởi tế bào khối u hoặc tế bào nhiễm khuẩn và không được biểu hiện hoặc chỉ được biểu hiện ở lượng tương đối nhỏ bởi các mô khỏe mạnh bình thường, ví dụ với lượng nhỏ hơn 5 lần, 10 lần, hoặc nhiều lần hơn.

Trong các bệnh nhiễm khuẩn có hai khả năng, khả năng thứ nhất là tế bào nhiễm khuẩn biểu hiện kháng nguyên không được biểu hiện bởi tế bào khỏe mạnh – liên quan trực tiếp bệnh nhiễm khuẩn – hoặc tế bào nhiễm khuẩn biểu hiện quá mức kháng nguyên chỉ được biểu hiện với lượng rất nhỏ bởi tế bào khỏe mạnh – sự biểu hiện quá mức của một kháng nguyên thường được phát hiện trong hệ peptit của tế bào khỏe mạnh.

Ngoài ra, mong muốn rằng kháng nguyên tương ứng không chỉ có mặt trong một loại khối u, bệnh nhiễm khuẩn hoặc chủng vi sinh vật, mà còn có mặt ở nồng độ cao (tức là số lượng bản sao của peptit tương ứng cho một tế bào). Kháng nguyên đặc hiệu khối u và liên quan đến khối u và kháng nguyên đặc hiệu bệnh hoặc liên quan đến bệnh thường có nguồn gốc từ các protein tham gia trực tiếp vào quá trình biến đổi tế bào bình thường thành tế bào khối u/tế bào nhiễm khuẩn do chức năng kiểm soát hoặc ức chế sự chết tế bào theo chương trình trong chu trình tế bào chẳng hạn.

Trong trường hợp bệnh ung thư, các đích xuôi dòng khác của protein trực tiếp gây ra biến đổi có thể được điều chỉnh tăng và do đó có thể liên quan gián tiếp đến khối u. Các kháng nguyên liên quan gián tiếp đến khối u này cũng có thể là đích của các phương pháp tiêm chủng (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. tháng 3 năm 2004; 453 (3):

187-95). Trong cả hai trường hợp, điều quan trọng là epitop có mặt trong trình tự axit amin của kháng nguyên, do peptit (“peptit sinh miễn dịch”) có nguồn gốc kháng nguyên liên quan đến khối u hoặc liên quan đến bệnh này sẽ dẫn tới đáp ứng tế bào T *in vitro* hoặc *in vivo*.

Về cơ bản, peptit bất kỳ có thể gắn kết với phân tử MHC có thể hoạt động như epitop tế bào T. Điều kiện tiên quyết để gây ra đáp ứng tế bào T *in vitro* hoặc *in vivo* là sự có mặt của tế bào T cùng với thụ thể TCR tương ứng và không xuất hiện tính dung nạp miễn dịch đối với epitop cụ thể này.

Do đó, TAA và DAA là điểm bắt đầu để phát triển vaccin phòng ngừa khối u. Phương pháp nhận dạng và xác định TAA và DAA là dựa trên việc sử dụng CTL có thể được phân lập từ bệnh nhân hoặc đối tượng khoẻ mạnh, hoặc dựa trên sự tạo ra các kiểu phiên mã khác nhau hoặc các kiểu biểu hiện peptit khác nhau giữa khối u và mô bình thường.

Tuy nhiên, việc xác định các gen được biểu hiện quá mức trong các mô khối u hoặc dòng tế bào khối u của người hoặc được biểu hiện chọn lọc trong các mô hoặc dòng tế bào này không cung cấp thông tin chính xác về việc sử dụng các kháng nguyên được phiên mã từ các gen này trong liệu pháp miễn dịch. Điều này là do chỉ một tập hợp nhỏ riêng biệt các epitop của các kháng nguyên này là thích hợp đối với việc sử dụng này do tế bào T cùng với thụ thể TCR tương ứng cần phải có mặt và tính dung nạp miễn dịch đối với epitop cụ thể này cần phải không có mặt hoặc có mặt với lượng rất nhỏ. Do đó, điều quan trọng là chỉ chọn các peptit từ các protein được biểu hiện quá mức hoặc được biểu hiện chọn lọc được trình diện cùng với phân tử MHC mà dựa vào chúng, tế bào T chức năng có thể được phát hiện. Tế bào T chức năng này được định nghĩa là tế bào T mà khi kích thích bằng kháng nguyên đặc hiệu có thể được nhân lên bằng cách tạo dòng và có thể thực hiện các chức năng thực hiện (“tế bào T thực hiện”).

Tế bào T hỗ trợ đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra chức năng thực hiện của CTL trong tính miễn dịch kháng khối u. Epitop tế bào T hỗ trợ gây ra đáp ứng tế bào T hỗ trợ của các chức năng thực hiện hỗ trợ dạng T_H1 của tế bào T giết tự nhiên dương tính với CD8, các chức năng này bao gồm chức năng gây độc tế bào chống lại tế bào khối u biểu hiện phức chất peptit/MHC liên quan đến khối u trên bề mặt tế bào của chúng. Theo cách này, các epitop của peptit tế bào T hỗ

trợ liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác, có thể dùng làm thành phần dược chất có hoạt tính của chế phẩm vacxin có tác dụng kích thích các đáp ứng miễn dịch kháng khối u.

Sự hiểu biết về số lượng bản sao chính xác của phối tử được trình diện bởi HLA nhóm I hoặc II là quan trọng trong miễn dịch học cơ bản và lâm sàng. Hiện nay, việc xác định số lượng bản sao tốt nhất là dựa trên phương pháp phổ khối sử dụng việc theo dõi phản ứng đơn (SRM) kết hợp với lượng đã biết của peptit được đánh dấu bằng chất đồng vị. Tuy nhiên, các phương pháp này vẫn không đủ chính xác để được sử dụng hiệu quả trong các phương pháp nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp xác định tuyệt đối số lượng bản sao của phối tử được trình diện bởi HLA nhóm I hoặc II, phương pháp này có độ chính xác, hiệu quả, dễ thực hiện, và cũng có thể được thực hiện với “năng suất cao”. Các mục đích và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên dễ hiểu đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này khi nghiên cứu phần mô tả sau đây.

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, mục đích của sáng chế đạt được bằng phương pháp định lượng tuyệt đối phối tử peptit MHC trên tế bào, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra tế bào biểu hiện phối tử peptit MHC nêu trên từ mẫu sinh học được chọn từ mẫu mô, mẫu máu, mẫu khối u, hoặc mẫu mô nhiễm khuẩn chứa tế bào nêu trên, bao gồm phân giải mô bằng enzym, và/hoặc phân giải tế bào,
- b) xác định số lượng tế bào của chế phẩm thu được trong bước a) bao gồm phương pháp được chọn từ đếm nhân tế bào, xác định ADN bằng cách đo quang, xác định ADN bằng cách đo huỳnh quang, hoặc PCR định lượng,
- c) bổ sung lượng đã biết của phối tử peptit-MHC và/hoặc phức chất phối tử peptit-MHC cần định lượng vào chế phẩm thu được trong bước a) ngay sau khi làm đồng nhất mô (“chế phẩm bổ sung I”),
- d) phân lập phối tử peptit MHC ra khỏi chế phẩm thu được trong bước c) để thu được dịch rửa giải peptit,
- e) bổ sung lượng đã biết của phối tử peptit MHC cần định lượng vào dịch rửa

giải peptit này (“chế phẩm bổ sung II”) làm chất hiệu chỉnh nội,

f) tiến hành phân tích bằng phương pháp phổ khối đối với phối tử peptit MHC này để tạo ra:

aa) tín hiệu về hiệu quả phân lập trong bước d),

bb) tín hiệu về chất hiệu chỉnh nội trong bước e), và

cc) tín hiệu của phối tử peptit MHC từ các tế bào được tạo ra trong bước a) nêu trên,

và

g) định lượng phối tử peptit MHC này dựa trên việc so sánh các tín hiệu thu được trong bước f) với

aa) số lượng tế bào thu được,

bb) lượng đã biết của phối tử peptit MHC và/hoặc phức chất peptit-MHC cần định lượng được bổ sung trong bước c), và

cc) lượng đã biết của phối tử peptit MHC cần định lượng được bổ sung trong bước e),

trong đó việc định lượng bao gồm bước tính toán tỷ lệ giữa các tín hiệu của chất hiệu chỉnh nội trong bước e) và tín hiệu của phối tử peptit MHC được phân lập, và so sánh tỷ lệ này với đường cong hiệu chỉnh được thiết lập của phối tử peptit MHC, và

trong đó việc định lượng còn bao gồm bước tạo ra đường cong hiệu chỉnh đặc hiệu của peptit dựa trên tỷ lệ với chất hiệu chỉnh nội được sử dụng với cùng lượng, và xác định giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của phối tử peptit MHC cần được định lượng nêu trên,

nhờ đó đạt được việc định lượng tuyệt đối phối tử peptit MHC trên tế bào của phối tử peptit MHC nếu lượng được định lượng cao hơn giá trị LLOQ như được xác định.

Trong phương pháp theo sáng chế, trong đó một số mẫu được phân tích song song, bước c) như nêu trên có thể được bỏ qua khi hiệu quả phân lập đã được thiết lập, do hiệu quả của một mẫu có thể được sử dụng để ước lượng hiệu quả phân lập của phối tử peptit MHC và/hoặc phức chất phối tử peptit MHC thứ hai (tức là có thể được sử dụng làm giá trị tham chiếu chéo).

Phương pháp sử dụng tín hiệu thu được từ việc hiệu chỉnh nội (chế phẩm

bổ sung II) trong bước e) dưới dạng hằng số và dùng làm đối chứng cho tín hiệu thu được từ ít nhất một phối tử peptit MHC được phân lập bằng cách tính tỷ lệ giữa hai tín hiệu này. Tỷ lệ này được so sánh với đường cong hiệu chỉnh đã được thiết lập, đường cong này cũng bao gồm chất chuẩn nội ở chính cùng lượng đó, tốt hơn là bằng cách sử dụng phần phân ước giống nhau của chất chuẩn nội này. Khi đó, đường cong hiệu chỉnh thể hiện mối quan hệ giữa các tỷ lệ này và lượng peptit. Cũng xem Fig.3 và phần chú thích của nó.

Bất ngờ là theo sáng chế, tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng bằng cách kết hợp các bước phân tích nêu trên, lần đầu tiên có thể định lượng tuyệt đối trực tiếp lượng peptit giới hạn bởi MHC, tốt hơn là giới hạn bởi HLA trên các mô ung thư hoặc các mô nhiễm khuẩn khác so với một số mô không ung thư và mô hoặc cơ quan không nhiễm khuẩn khác nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ chung thể hiện phương pháp thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.2 thể hiện kết quả phân tích MS so sánh hỗn hợp TUMAP với 10 fmol cho mỗi TUMAP nêu trong bảng 1. Mỗi peptit dẫn đến tín hiệu MS khác nhau cho thấy khả năng phát hiện phụ thuộc peptit. Peptit 5 không được nêu trong bảng 1, tức là các trình tự từ 1 đến 4 trong bảng 1 tương ứng với các số từ 1 đến 4 trên Fig.2 và các trình tự từ 5 đến 11 trong bảng 1 tương ứng với các số từ 6 đến 12 trên Fig.2.

Ngoài ra, các peptit 19, 21, và 22 trên Fig.2 không được nêu trong bảng 2, tức là các trình tự từ 13 đến 18 trên Fig.2 tương ứng với các số từ 12 đến 17 trong bảng 2, trình tự 20 trên Fig.2 tương ứng với số 18 trong bảng 2, và trình tự từ 23 đến 28 trên Fig.2 tương ứng với số từ 19 đến 24 trong bảng 2.

Fig.3 thể hiện nguyên lý của phương pháp chuẩn nội. Đường cong hiệu chỉnh được tạo ra bằng cách chuẩn độ dạng được đánh dấu bằng chất đồng vị của TUMAP (thể hiện bằng màu xám nhạt). Đối với tất cả các lần ghi phổ MS, lượng không đổi của dạng được đánh dấu bằng chất đồng vị khác của peptit chuẩn nội TUMAP (thể hiện bằng màu xám đậm) được bổ sung vào các mẫu phân tích MS. Hàm số thể hiện đường cong hiệu chỉnh được tính từ tỷ lệ các tín hiệu MS bằng phương pháp hồi quy logic. LLOQ được xác định bằng cách kiểm tra bằng mắt

thường và xem xét độ lệch so với đường tuyến tính. “Mẫu định lượng” (thể hiện bằng màu xanh lá cây) thể hiện cường độ tín hiệu được xác định trong các mẫu khối u được chọn để định lượng tuyệt đối số TUMAP.

Fig.4 thể hiện đường cong hiệu chỉnh của các TUMAP HLA-A*02 được chọn để định lượng tuyệt đối. Kết quả phân tích MS của các TUMAP tương ứng trong mẫu mô khối u dùng để phân tích số TUMAP tuyệt đối cho một tế bào (“mẫu định lượng”) được đưa vào mỗi đồ thị.

Fig.5 thể hiện các đường cong hiệu chỉnh khác của các TUMAP HLA-A*02 được chọn để định lượng tuyệt đối. Kết quả phân tích MS của các TUMAP tương ứng trong mẫu mô khối u dùng để phân tích số TUMAP tuyệt đối cho một tế bào (“mẫu định lượng”) được đưa vào mỗi đồ thị.

Fig.6 thể hiện đường cong hiệu chỉnh của các TUMAP HLA-A*24 được chọn để định lượng tuyệt đối. Kết quả phân tích MS của TUMAP tương ứng trong mẫu mô khối u dùng để phân tích số TUMAP tuyệt đối cho một tế bào (“mẫu định lượng”) được đưa vào mỗi đồ thị.

Fig.7 thể hiện các đường cong hiệu chỉnh khác của các TUMAP HLA-A*24 được chọn để định lượng tuyệt đối. Kết quả phân tích MS của các TUMAP tương ứng trong mẫu mô khối u dùng để phân tích số TUMAP tuyệt đối cho một tế bào (“mẫu định lượng”) được đưa vào mỗi đồ thị.

Fig.8 thể hiện độ biến thiên ước tính của các lần phân tích MS lặp lại của tất cả các TUMAP được phân tích. Mỗi dấu chấm thể hiện hệ số biến thiên (CV tính theo %) của các lần phân tích MS lặp lại của mỗi TUMAP trong một mẫu mô cụ thể. Giá trị trung bình của các CV của tất cả các TUMAP được coi là độ biến thiên trung bình của các lần phân tích MS lặp lại.

Fig.9 thể hiện hiệu quả phân lập peptit MHC. Hiệu quả phân lập peptit MHC được xác định trong tám mẫu dương tính với A*02 của TUMAP A*02 (A), và trong sáu mẫu dương tính với A*24 của TUMAP A*24 (B). Hiệu quả phân lập thay đổi trung bình 24% đối với các TUMAP A*02 và 32% đối với các TUMAP A*24 tương ứng (C).

Fig.10 thể hiện phương pháp đánh giá để phân tích hàm lượng ADN. A. So sánh ba phương pháp khác nhau để nội suy số lượng tế bào từ lượng ADN cho trước: bằng cách sử dụng đường cong chuẩn thu được từ các dòng tế bào khối u

(màu xám đậm), từ PBMC của người cho khỏe mạnh (màu xám), và sử dụng trọng lượng lý thuyết của hệ gen lưỡng bội người (màu xám nhạt). Các mẫu sinh học lặp lại, tức là các chế phẩm phân giải mô độc lập của các mẫu khác nhau của cùng một khối u được thể hiện bằng màu xám. B. Vẽ đường cong chuẩn PBMC, đường cong này được sử dụng để xác định tổng số lượng tế bào của các mẫu mô được phân tích trong phương pháp định lượng TUMAP tuyệt đối.

Fig.11 thể hiện kết quả xác định số lượng tế bào của các mẫu mô rắn đông lạnh: kết quả phân tích số lượng tế bào của các mẫu khối u dương tính với A*02 và A*24 (đồ thị A) và độ biến thiên ước tính của việc phân tích số lượng tế bào (đồ thị B). Các mẫu sinh học lặp lại được thể hiện bằng màu xám.

Fig.12 thể hiện kết quả số lượng bản sao peptit cho một tế bào của HLA-A*02 TUMAP. Tám khối u GC khác nhau được phân tích, ba khối u trong số chúng được phân tích theo hai mẫu (các mẫu sinh học lặp lại được nhóm lại với nhau và được thể hiện bằng màu xám). LLOQ để chỉ phạm vi định lượng trong một lần phân tích MS và được ngoại suy cho LLOQ đặc trưng cho mẫu và TUMAP, tức là số lượng bản sao thấp nhất có thể định lượng được trong mẫu cụ thể của TUMAP cụ thể (được thể hiện bằng màu xám).

Fig.13 thể hiện các kết quả phân tích khác về số lượng bản sao peptit cho một tế bào của các TUMAP HLA-A*02. Tám khối u GC khác nhau được phân tích, ba khối u trong số chúng được phân tích theo hai mẫu lặp (các mẫu sinh học lặp lại được nhóm lại và thể hiện bằng màu xám). LLOQ để chỉ phạm vi định lượng trong một lần phân tích MS và được ngoại suy cho LLOQ đặc trưng cho mẫu và đặc trưng cho TUMAP, tức là số lượng bản sao thấp nhất có thể định lượng được trong một mẫu cụ thể đối với TUMAP cụ thể (được thể hiện bằng màu xám).

Fig.14 thể hiện kết quả phân tích số lượng bản sao peptit cho một tế bào của các TUMAP HLA-A*24. Sáu khối u GC khác nhau được phân tích, ba khối u trong số chúng được phân tích theo hai mẫu lặp lại (hai mẫu sinh học lặp lại được nhóm lại và thể hiện bằng màu xám). LLOQ để chỉ phạm vi định lượng trong một lần phân tích MS và được ngoại suy cho LLOQ đặc trưng cho mẫu và đặc trưng cho TUMAP, tức là số lượng bản sao thấp nhất có thể định lượng được trong một mẫu cụ thể đối với TUMAP cụ thể (được thể hiện bằng màu xám).

Fig.15 thể hiện các kết quả khác về số lượng bản sao peptit cho một tế bào của các TUMAP HLA-A*24. Sáu khối u GC khác nhau được phân tích, ba khối u trong số chúng được phân tích theo hai mẫu lặp lại (hai mẫu sinh học lặp lại được nhóm lại và thể hiện bằng màu xám). LLOQ để chỉ phạm vi định lượng trong một lần phân tích MS và được ngoại suy cho LLOQ đặc trưng cho mẫu và đặc trưng cho TUMAP, tức là số lượng bản sao thấp nhất có thể định lượng được trong một mẫu cụ thể đối với TUMAP cụ thể (được thể hiện bằng màu xám).

Fig.16 thể hiện thử nghiệm về sự ảnh hưởng của việc bổ sung cho mẫu bằng cách sử dụng 500 fmol peptit tự do trong chế phẩm monome MHC/peptit. Peptit tự do trong phân tích này không có ảnh hưởng đáng kể đối với các peptit đã nêu.

Fig.17 thể hiện kết quả thử nghiệm về tính lặp lại của phương pháp phân lập ADN bằng cách sử dụng thử nghiệm Qubit HS (huỳnh quang) so với đường cong chuẩn. Các mẫu (mẫu mô ung thư, như NSCLC) có độ đồng nhất đủ. ADN được phân lập từ ba mẫu 50µl.

Các trình tự nhận biết SEQ ID No. 1 đến 24 thể hiện các peptit nêu trong các bảng 1 và 2 được chọn để định lượng tuyệt đối theo các ví dụ của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, thuật ngữ “bổ sung” để chỉ việc bổ sung lượng hoặc nồng độ đã biết của ít nhất một phối tử peptit MHC đã biết, ví dụ không gắn kết (“tự do”) cần định lượng vào một mẫu, ví dụ, vào một chế phẩm (ở đây được gọi là “chế phẩm bổ sung I”) hoặc dịch rửa giải peptit (ở đây được gọi là “chế phẩm bổ sung II”). Lượng/nồng độ peptit cần bổ sung có thể được điều chỉnh dễ dàng và phụ thuộc ít nhất một phần vào mẫu cần bổ sung và phương pháp dùng để phân tích.

Phương pháp theo sáng chế được ưu tiên là phương pháp trong đó ít nhất một phối tử peptit MHC được chọn từ peptit liên quan đến khối u (TAA) hoặc peptit liên quan đến bệnh (DAA).

Phương pháp theo sáng chế là phương pháp trong đó mẫu sinh học chứa tế bào nêu trên được chọn từ mẫu mô, mẫu máu, mẫu khối u, hoặc mẫu mô nhiễm khuẩn. Theo sáng chế, các mẫu thu được trực tiếp từ đối tượng, như bệnh nhân

được gọi là mẫu “sơ cấp”, như mẫu khối u hoặc mô sơ cấp, khác với các mẫu dòng tế bào, như dòng tế bào khối u đã biết. Các mẫu này có thể là mẫu mới hoặc được bảo quản (ví dụ, được đông lạnh hoặc điều chế), miễn là chúng thích hợp đối với phương pháp theo sáng chế. Mẫu được ưu tiên là mẫu sinh học không chứa các dòng tế bào vĩnh viễn.

Để làm ví dụ được ưu tiên, mẫu peptit HLA của các mẫu mô (sơ cấp) được đông lạnh sốc có thể thu được bằng cách kết tủa miễn dịch từ các mô rắn bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu HLA-A, -B, -C w6/32 hoặc kháng thể đặc hiệu HLA-A*02 BB7.2 gắn kết với sepharosa được hoạt hóa bằng CNBr chẳng hạn, sau đó xử lý bằng axit, và siêu lọc. Đối với các alen HLA khác nhau, các kháng thể đặc hiệu khác đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng, ví dụ GAP-A3 đối với alen A*03, B1.23.2 đối với alen B. Các phương pháp tương ứng để thu được peptit MHC-nhóm I của các động vật có vú khác là đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Phương pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các bệnh nhiễm khuẩn, như bệnh nhiễm virus hoặc vi khuẩn, ví dụ bệnh sốt Dengue, bệnh nhiễm virus Ebola, bệnh nhiễm Marburg, bệnh lao (TB), bệnh viêm màng não hoặc bệnh giang mai, tốt hơn nếu phương pháp này được sử dụng đối với các chủng sinh vật gây bệnh kháng thuốc kháng sinh, bệnh tự miễn, như bệnh viêm khớp, bệnh nhiễm ký sinh trùng, như bệnh sốt rét và các bệnh khác như bệnh xơ cứng rải rác (MS) và bệnh Morbus Parkinson, miễn là gốc được hướng đích là peptit gắn kết với MHC nhóm I.

Ví dụ về các bệnh tự miễn (kể cả các bệnh không được tuyên bố chính thức là bệnh tự miễn) là bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, bệnh viêm loét dạ dày tá tràng, bệnh Crohn (một trong hai loại bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease: IBD) tự phát, bệnh viêm da cơ, bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh lạc nội mạc tử cung, hội chứng Goodpasture, bệnh Graves, hội chứng Guillain-Barre (Guillain-Barre syndrome: GBS), bệnh Hashimoto, bệnh viêm tuyến mô hôi mủ, bệnh Kawasaki, bệnh thận IgA, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, bệnh viêm bàng quang kẽ, bệnh lupút ban đỏ, bệnh mô liên kết hỗn hợp, bệnh cứng bì, bệnh nhược cơ năng, cơn ngủ kịch phát, tăng trương lực cơ thần kinh, bệnh pemphigut thông thường, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến,

bệnh viêm đa cơ, bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm đa sụn hay tái phát, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh cứng bì, hội chứng Sjogren, hội chứng người cứng đờ, bệnh viêm động mạch thái dương (viêm động mạch tế bào khổng lồ), bệnh viêm ruột kết mạn loét (một trong hai loại bệnh viêm ruột "IBD" tự phát), bệnh viêm mạch, bệnh bạch biến và bệnh u hạt Wegener.

Sáng chế không chỉ giới hạn ở bệnh ở người, mà có thể được sử dụng cho động vật có vú, ví dụ bò, lợn, ngựa, mèo, chó, động vật gặm nhấm, như chuột, chuột nhắt, dê, và các động vật nuôi khác.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa của phương pháp theo sáng chế, bước tạo ra tế bào ít nhất một phần bao gồm phân giải mô bằng enzym, và/hoặc phân giải tế bào.

Số lượng tế bào được xác định bằng cách sử dụng phương pháp được chọn từ đếm số nhân tế bào, xác định ADN bằng cách đo quang, xác định ADN bằng cách đo huỳnh quang (ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp Qubit®), và PCR định lượng.

Phương pháp được ưu tiên hơn theo sáng chế là phương pháp còn bao gồm bước xác định lượng của ít nhất một loại phân tử HLA trong chế phẩm thu được trong bước a). Việc xác định này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp thông thường trong lĩnh vực này, như phương pháp liên quan đến các kháng thể đặc hiệu, ví dụ phương pháp ELISA, gel, phân loại tế bào, và/hoặc sắc ký.

Phương pháp được ưu tiên hơn nữa theo sáng chế là phương pháp trong đó ít nhất một phức chất peptit-MHC bổ sung vào và/hoặc ít nhất một phối tử peptit MHC bổ sung vào được đánh dấu, và tốt hơn là được đánh dấu khác nhau. Chất đánh dấu tương ứng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và bao gồm chất đánh dấu đồng vị, chất đánh dấu có hoạt tính phóng xạ và chất đánh dấu không có hoạt tính phóng xạ, enzym, và các chất khác có khối lượng khác nhau. Tốt hơn, nếu việc đánh dấu này là đặc hiệu đối với peptit cụ thể cần định lượng. Tốt nhất nếu TAA/TUMAP được đánh dấu kép, ví dụ trong các trường hợp trong đó cần hai chất bổ sung được đánh dấu khác nhau trong cùng một thử nghiệm (xem các ví dụ dưới đây).

Phương pháp được ưu tiên theo sáng chế là phương pháp trong đó bước

phân lập bao gồm sắc ký, như sắc ký ái lực. Theo đó phối tử MHC/HLA có thể được phân lập theo độ kỵ nước của chúng bằng phương pháp sắc ký đảo pha (ví dụ, hệ thống sắc ký nanoAcquity UPLC, Waters), sau đó phát hiện trong phổ khối kế Orbitrap hybrid (ThermoElectron). Tốt hơn, nếu mỗi mẫu được phân tích nhiều lần bằng phương pháp LCMS. Sau đó, dữ liệu LCMS được xử lý bằng cách phân tích dữ liệu phổ MS nối tiếp (MS/MS).

Phổ MS nối tiếp được ghi theo cách hướng đích tập trung vào các giá trị m/z của peptit cần định lượng, tốt hơn là được đánh giá bằng chương trình phần mềm trích xuất cường độ của các ion phân mảnh đã chọn trước của các đỉnh chuyển tiếp định trước. Một ví dụ về chương trình phần mềm này là chương trình Skyline (MacLean B et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 1.4.2010; 26(7):966-8., <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>) dùng để phân tích dữ liệu phổ khối của các thử nghiệm ghi dữ liệu độc lập (data independent acquisition: DIA) để theo dõi phản ứng song song (MS/MS nhằm theo dõi phản ứng song song). Chương trình phần mềm này có thể được sử dụng đối với peptit được đánh dấu bằng chất đồng vị đồng rửa giải nhằm mục đích riêng cũng như để trích xuất cường độ các đỉnh chuyển tiếp đơn để xử lý tiếp.

Có thể so sánh các nhóm peptit giới hạn bởi cùng một alen HLA giữa các mẫu khác nhau dựa trên kháng thể đặc hiệu alen thông thường sử dụng để tinh chế, nếu có, hoặc theo cách khác, dựa trên việc gán trình tự cho các alen HLA thông thường bằng cách dùng kiểu axit amin neo.

Đối với lý do thống kê, phương pháp được ưu tiên theo sáng chế là phương pháp trong đó ít nhất hai lần ghi phổ khối lặp lại được thực hiện đối với ít nhất mỗi một peptit phối tử MHC.

Do đó, theo một khía cạnh khác, phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước chọn phối tử MHC peptit được trình diện quá mức, được biểu hiện quá mức và/hoặc đặc hiệu khối u để phân tích.

Theo một khía cạnh khác của phương pháp theo sáng chế, phương pháp này có thể được thực hiện hoặc được thực hiện với năng suất cao, tốt hơn là có tới 50 đến 100 phối tử peptit có thể được phân tích song song.

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của phương pháp theo sáng

chế, các bước của phương pháp này được thực hiện theo thứ tự như đã chỉ ra trong yêu cầu bảo hộ kèm theo, hoặc như nêu trên. Theo một phương án được ưu tiên khác nữa của phương pháp theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước như nêu trên và nêu ở đây.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác của phương pháp theo sáng chế, phương pháp này liên quan đến việc điều trị hoặc chẩn đoán được cá nhân hóa. Đối với phương pháp này, (các) mẫu được phân tích có nguồn gốc từ một đối tượng, hoặc từ một nhóm đối tượng mắc cùng một tình trạng bệnh như được mô tả ở đây. Ngoài ra, profin phối tử MHC được cá nhân hóa, tốt hơn là profin phối tử MHC đặc trưng cho bệnh được định lượng cá nhân hóa dựa trên phối tử MHC peptit được định lượng này có thể được tạo ra dựa vào phương pháp theo sáng chế như được mô tả ở đây.

Tốt nhất nếu phương pháp theo sáng chế được thực hiện *in vitro*.

Phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước tổng hợp, tốt hơn là tổng hợp hoá học, ít nhất một phối tử peptit MHC được định lượng bằng phương pháp này trên thiết bị tổng hợp hoặc tổng hợp bằng tay. Do đó, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế peptit phản ứng miễn dịch mà bằng peptit này một peptit được định lượng theo phương pháp của sáng chế và peptit này được tổng hợp hoá học *in vitro* hoặc *in vivo*. Peptit có thể được điều chế bằng cách liên kết hóa học axit amin bằng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Peptit có thể được điều chế *in vitro*, ví dụ, trong các hệ không chứa tế bào, và *in vivo* bằng cách sử dụng tế bào. Peptit này có thể được điều chế như được bộc lộ trong EP2111867 bởi Lewandrowski và các đồng tác giả.

Phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước phát hiện sự có mặt của tế bào lymphô T. Bằng cách sử dụng phương pháp này, có thể phát hiện cụ thể mức độ xuất hiện từ trước của tế bào lymphô T kháng lại các peptit được phân lập và xác định ở bệnh nhân. Bằng cách thực hiện bước này, có thể chỉ sử dụng các peptit mà các tế bào lymphô T đã xuất hiện từ trước ở bệnh nhân kháng lại chúng để làm vaccin. Do đó, các peptit này có thể được sử dụng để hoạt hoá các tế bào lymphô T đặc hiệu.

Sáng chế bộc lộ phương pháp, trong đó bước phát hiện các tế bào lymphô

T đặc hiệu xuất hiện từ trước được thực hiện bằng cách đánh dấu tế bào lymphô này bằng phức chất tái tạo của phân tử trình diện kháng nguyên và peptit kháng nguyên.

Sáng chế bộc lộ phương pháp, trong đó phương pháp này còn không sử dụng tế bào bất hoạt gen, dòng tế bào hoặc động vật.

Sáng chế bộc lộ bước kiểm soát chất lượng tự động dựa trên các phân tử được bổ sung vào mẫu với lượng xác định.

Bằng phương pháp theo sáng chế, cũng có thể xác định các peptit đặc trưng cho bệnh nhân, tức là có thể xác định chính xác peptit thích hợp để sử dụng làm vacxin cho bệnh nhân để gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

Trong bản mô tả này, sáng chế được mô tả với ví dụ là bệnh ung thư. Tuy nhiên, phương pháp theo sáng chế cũng có thể được áp dụng trong bệnh nhiễm khuẩn, bệnh tự miễn, và bệnh nhiễm ký sinh trùng, miễn là đáp ứng miễn dịch tương ứng là đáp ứng liên quan đến MHC nhóm I.

Sáng chế sẽ được mô tả thêm trong các ví dụ sau đây, tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này trong các hình vẽ và danh mục trình tự kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau mô tả phương pháp theo sáng chế trong ngữ cảnh TAA/bệnh ung thư. Sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này do chúng chỉ là một phương án được ưu tiên của sáng chế.

Bảng 1: TUMAP HLA-A*02 được chọn để định lượng tuyệt đối

11 peptit được chọn để định lượng tuyệt đối

Số	Ký hiệu peptit	Trình tự
1	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
2	FAP-003	YVYQNNIYL
3	COL12A1-002	FLVDGSWSV
4	MXRA5-001	TLSSIKVEV
5	NCAPG-001	YLLSYIQSI

6	COL6A3-002	FLLDGSANV
7	WNT5A-001	AMSSKFFLV
8	F2R-001	TLDPRSFLL
9	HIF1A-001	ALDGFVMVL
10	MET-001	YVDPVITSI
11	CCNB1-002	ILIDWLVQV

Bảng 2: TUMAP HLA-A*24 được chọn để định lượng tuyệt đối

14 peptit được chọn để định lượng tuyệt đối. Đặc tính của một peptit (PLK4-001) hóa ra là không thích hợp cho các thử nghiệm tiếp theo. Đối với 13 peptit còn lại, thử nghiệm định lượng tuyệt đối được thực hiện.

Số	Ký hiệu peptit	Trình tự
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

Việc định lượng số lượng bản sao TUMAP cho một tế bào trong các mẫu khối u rắn đòi hỏi phải thực hiện các phân tích định lượng (phụ) bao gồm:

- a) xác định lượng TUMAP được phân lập,
- b) xác định lượng TUMAP tồn thất trong quá trình phân lập, và
- c) xác định số lượng tế bào của mẫu mô được phân tích.

Phần mô tả chung về phương pháp thử nghiệm theo sáng chế được thể hiện trên Fig.1.

Định lượng peptit bằng phương pháp nanoLC-MS/MS

Để định lượng chính xác peptit bằng phương pháp phổ khối, kiến thức cơ bản về mối tương quan đặc trưng cho peptit của lượng peptit và tín hiệu MS cần được nghiên cứu trước. Theo một ví dụ, việc phân tích MS hỗn hợp peptit với 10 fmol đối với mỗi peptit cho thấy rằng có sự khác nhau lớn đặc trưng cho peptit trong tín hiệu MS (Fig.2). Điều này cũng ngụ ý rằng phạm vi định lượng mà trong đó peptit có thể được định lượng đáng tin cậy bằng phương pháp MS tùy thuộc vào đặc tính của từng peptit.

Ngoài ra, mối tương quan tuyến tính giữa lượng peptit cụ thể và tín hiệu MS chỉ có thể được kỳ vọng trong một phạm vi nhất định. Do đó, tác giả sáng chế đã quyết định phải xác định đường cong hiệu chỉnh riêng cho mỗi peptit. Phạm vi định lượng của mỗi đường cong hiệu chỉnh được chọn để thể hiện không chỉ phạm vi định lượng riêng biệt của peptit, mà cả phạm vi tín hiệu MS của mỗi peptit trong các mẫu khối u đã phân tích trước đó. Mục đích là mỗi đường cong hiệu chỉnh cần phải bao gồm phạm vi tín hiệu MS đặc trưng cho peptit bằng ít nhất 80% so với các mẫu thông thường.

Việc lập đường cong hiệu chỉnh chính xác đòi hỏi phải có chất chuẩn tổng hợp, chất này cần được định lượng bằng phương pháp độc lập và có đặc tính giống như TUMAP tự nhiên. Tác giả sáng chế sử dụng các dạng được đánh dấu bằng chất đồng vị kép của TUMAP, tức là hai axit amin được đánh dấu bằng chất đồng vị được đưa vào quá trình tổng hợp TUMAP. Các dạng được đánh dấu kép này có thể được phân biệt với TUMAP tự nhiên bởi mức độ khác nhau về khối lượng bằng 12-18 Dalton phụ thuộc vào axit amin được đánh dấu. Ngoài thay đổi về khối lượng, việc đánh dấu bằng chất đồng vị không làm thay đổi đặc tính của peptit trong phân tích MS, tức là các peptit có trình tự giống nhau nhưng chất đồng vị đánh dấu khác nhau sẽ dẫn đến cường độ tín hiệu MS giống nhau

(Anderson et al., 2012). Sau khi tổng hợp, TUMAP được đánh dấu kép này được định lượng chính xác bằng cách phân tích nitơ để cho phép xác định mối tương quan chính xác giữa lượng peptit và tín hiệu MS.

Đường cong hiệu chỉnh được lập theo ít nhất ba chất nền khác nhau, tức là dịch rửa giải peptit HLA của các mẫu tự nhiên giống với các mẫu MS thông thường, và mỗi chế phẩm được xác định theo hai lần phân tích MS lặp lại. Để bù lại sự biến thiên do kỹ thuật bất kỳ giữa các lần phân tích MS, peptit chuẩn nội được sử dụng trong tất cả các lần phân tích. Tỷ lệ tín hiệu MS của peptit đã chuẩn độ với chất chuẩn nội cố định được vẽ đồ thị, và đường cong hiệu chỉnh được tính bằng cách hồi quy logic (Fig.3). Giới hạn định lượng dưới (lower limit of quantitation: LLOQ) được xác định bằng mắt khi tính đến độ lệch khỏi đường tuyến tính. Nếu độ lệch khỏi đường tuyến tính là không rõ ràng như đối với peptit FAP-003 (Fig.4), tỷ lệ trung bình của lượng peptit nhỏ nhất được sử dụng để tính LLOQ. Giới hạn định lượng trên, tức là độ lệch khỏi đường tuyến tính ở nồng độ cao hơn là không đạt được đối với đường cong hiệu chỉnh bất kỳ.

Trong các thử nghiệm định lượng thực tế, chất chuẩn nội được bổ sung vào mỗi mẫu với lượng giống như để lập đường cong hiệu chỉnh, và tỷ lệ của peptit tự nhiên với peptit chuẩn nội được tính. “Phương pháp chất chuẩn nội” này là phương pháp thông thường để định lượng protein trên cơ sở phân tích MS, ví dụ, để phân tích dấu ấn sinh học trong các mẫu sinh học (Sturm et al., 2012; Prasad and Unadkat, 2014; Sato et al., 2012). Đường cong hiệu chỉnh và các giá trị xác định được trong các mẫu khối u thực tế được thể hiện trên Fig.4 và Fig.5 đối với dạng HLA-A*02 và trên Fig.6 và Fig.7 đối với dạng HLA-A*24 của tất cả các TUMAP được chọn để định lượng tuyệt đối.

Để ước lượng độ biến thiên của các lần phân tích định lượng MS, hệ số biến thiên (CV tính theo %) của hàm lượng peptit của mỗi mẫu phân tích MS được tính. CV của mỗi mẫu phân tích MS được vẽ đồ thị và độ biến thiên chung của các lần phân tích MS được ước lượng là CV trung bình (Fig.8).

Hiệu quả phân lập peptit/MHC

Giống như đối với phương pháp tinh chế protein bất kỳ, việc phân lập protein từ các mẫu mô đi kèm với lượng tổn hao nhất định của protein cần quan

tâm. Để xác định hiệu quả phân lập TUMAP, phức chất peptit MHC được tạo ra đối với tất cả các TUMAP được chọn để định lượng tuyệt đối. Để có thể phân biệt phức chất bổ sung với các phức chất peptit MHC tự nhiên, các dạng được đánh dấu bằng chất đồng vị đơn của TUMAP được sử dụng, tức là một axit amin được đánh dấu bằng chất đồng vị được đưa vào sử dụng trong quá trình tổng hợp TUMAP. Các phức chất này được bổ sung vào các dịch phân giải mô mới điều chế, tức là ở thời điểm sớm nhất có thể của quá trình phân lập TUMAP, và sau đó được bắt giữ giống như phức chất peptit MHC tự nhiên trong quá trình tinh chế ái lực sau đó. Do đó, việc xác định lượng thu hồi của TUMAP được đánh dấu đơn cho phép kết luận hiệu quả phân lập của từng TUMAP tự nhiên.

Hiệu quả phân lập được xác định trong 13 mẫu đã chọn để định lượng TUMAP tuyệt đối (7 mẫu dương tính với HLA-A*02, 5 mẫu dương tính với HLA-A*24, và một mẫu dương tính kép với HLA-A*02/A*24). Tám mẫu dương tính với A*02 được phân tích hiệu quả phân lập các TUMAP A*02 và sáu mẫu dương tính với A*24 được phân tích hiệu quả phân lập các TUMAP A*24 (Fig.9A, Fig.9B). Các kết quả này gợi ý rằng đối với phần lớn các peptit, hiệu quả phân lập là tương đương trong các mẫu mô khác nhau. Ngược lại, hiệu quả phân lập là khác nhau giữa các peptit riêng biệt. Điều này gợi ý rằng hiệu quả phân lập, mặc dù chỉ được xác định ở một số lượng giới hạn các mẫu mô, có thể được ngoại suy cho chế phẩm mô bất kỳ khác. Tuy nhiên, cần phân tích mỗi TUMAP riêng biệt do hiệu quả phân lập có thể không được ngoại suy từ peptit này sang các peptit khác.

Trong một số trường hợp, hiệu quả phân lập là cao không thực tế và/hoặc thay đổi nhiều, ví dụ đối với peptit NCAPG-001 (Fig.9A). Trong các trường hợp trong đó hiệu quả phân lập không thể xác định được, ví dụ do các khó khăn liên quan đến việc định lượng phụ thuộc vào peptit (ví dụ, LLOQ cao đối với các peptit CCNB1-002, ASPM-001) hoặc hiệu quả tính được là cao hơn 100%, tác giả sáng chế cho rằng hiệu quả phân lập là 100%. Đây là một phương pháp dè dặt, có thể ước tính quá cao hiệu quả phân lập và cuối cùng dẫn tới ước tính quá thấp số lượng bản sao peptit cho một tế bào.

Để đánh giá sự biến thiên của hiệu quả phân lập TUMAP, hệ số biến thiên (CV tính theo %) của quá trình phân lập từng TUMAP của 6-8 mẫu được vẽ đồ

thị (Fig.9C). Nói chung, độ biến thiên trung bình của các TUMAP A*02 là 24%, của các TUMAP A*24 là 32% tương ứng.

Xác định số lượng tế bào trong mô rắn được đông lạnh

Một yếu tố quan trọng khác để tính số lượng bản sao peptit cho một tế bào là ước tính tổng số lượng tế bào của các mẫu mô sử dụng để phân lập TUMAP. Tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng phương pháp phân tích hàm lượng ADN, do phương pháp này có thể áp dụng cho một phạm vi rộng các mẫu có nguồn gốc khác nhau và điều quan trọng nhất là các mẫu đông lạnh (Forsey and Chaudhuri, 2009; Alcoser et al., 2011; Alcoser et al., 2011; Silva et al., 2013).

Khi tính đến tính không đồng nhất trong khối u, cần xác định số lượng tế bào của phần mô đại diện cho cả mẫu mô sử dụng để phân lập TUMAP. Dịch phân giải mô được điều chế trong quá trình phân lập TUMAP là mẫu thích hợp để phân tích ADN, do nó đồng nhất hơn so với phần mô rắn. Sau khi phân lập ADN, nồng độ ADN tổng số được định lượng bằng thử nghiệm huỳnh quang (Life Technologies, thử nghiệm ADN Qubit HS), và nồng độ ADN tổng số của các mẫu được tính.

Để tính số lượng tế bào từ lượng ADN cho trước, tác giả sáng chế cân nhắc hai phương pháp khác nhau: thứ nhất là số lượng tế bào có thể được tính bằng cách sử dụng khối lượng lý thuyết của hệ gen người, khối lượng này được ước tính là khoảng 6,67pg ADN cho hệ gen lưỡng bội (Alcoser et al., 2011; Konigshoff et al., 2003). Theo cách khác, các mẫu có số lượng tế bào đã biết có thể được sử dụng để lập đường cong ADN chuẩn bằng các phương pháp giống như được sử dụng cho các mẫu mô. Phương pháp này đã bù lại sự ảnh hưởng bất kỳ của quá trình phân lập và định lượng ADN, do vậy làm tăng độ chính xác của kết quả phân tích. Tác giả sáng chế đã lập hai đường cong chuẩn khác nhau, một đường cong từ bảy dòng tế bào khối u khác nhau và đường cong còn lại từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) của 6 người cho khỏe mạnh khác nhau.

Để so sánh cả ba phương pháp đánh giá (khối lượng ADN lý thuyết và hai đường cong chuẩn dựa trên tế bào khác nhau), số lượng tế bào cho 1g mô được tính đối với một số mẫu (Fig.10A). Việc tính toán sử dụng tiêu chuẩn dòng tế bào

đến làm giảm đáng kể số lượng tế bào (ước lượng thấp hơn tối đa 3,6 lần) so với khi sử dụng tiêu chuẩn PBMC. Điều này xảy ra khi cho rằng các dòng tế bào khối u có xu hướng có tỷ lệ cao hơn của tế bào thể bội không chính với lượng ADN cao hơn so với các tế bào PBMC lưỡng bội khỏe mạnh. Trong tài liệu chuyên ngành, tỷ lệ của các khối u dạ dày lưỡng bội nằm trong khoảng từ 25 đến 67% tùy thuộc vào thử nghiệm (Hiyama et al., 1995; Tamura et al., 1991; Wiksten et al., 2008; Zhang et al., 2005; Sugai et al., 2005). Do mức bội thể và tỷ lệ tế bào thể bội không chính của các mẫu mô là chưa biết, cả hai đường cong chuẩn có thể chỉ đưa ra ước lượng về số lượng tế bào chính xác nhưng không tính đến tất cả các đặc tính của từng mẫu mô. Một nguồn gây biến thiên khác là tình trạng tăng sinh chưa biết của mẫu mô hoặc sự có mặt của tế bào hoại tử. Cụ thể, sự tăng gấp đôi lượng ADN trong các tế bào tăng sinh làm tăng lượng ADN so với số lượng tế bào và do đó sẽ làm lệch kết quả tính số lượng tế bào. Trong hai mẫu mô dạ dày bình thường, tác giả sáng chế đã tính được số lượng tế bào cho 1g mô thấp hơn so với các mẫu khối u với cả ba phương pháp.

Theo phương pháp đề xuất, tác giả sáng chế đã quyết định sử dụng đường cong chuẩn PBMC (Fig.10B), điều này có thể dẫn tới sự ước lượng quá cao số lượng tế bào trong phần mẫu mô thể dư lưỡng bội, dẫn tới sự ước lượng quá thấp số lượng bản sao peptit cho một tế bào trong các mẫu này, nhưng cần không bao giờ ước tính quá cao số lượng bản sao peptit cho một tế bào trong mẫu bất kỳ.

Để phân tích các mẫu mô được chọn để định lượng TUMAP tuyệt đối, tác giả sáng chế đã phân lập ADN từ 2-3 mẫu dịch phân giải mô, và mỗi chế phẩm ADN được định lượng theo 2-3 mẫu lặp lại trong thử nghiệm huỳnh quang. Tổng số lượng tế bào và số lượng tế bào cho 1g mô được tính từ nồng độ ADN tổng số bằng cách sử dụng đường cong chuẩn PBMC (Fig.11A). Để ước lượng độ biến thiên chung của kết quả phân tích số lượng tế bào, hệ số biến thiên (%) trước hết được xác định ở cấp độ mỗi mẫu hoặc nếu có thể, mỗi mẫu lặp sinh học (tức là chế phẩm phân giải mô độc lập của các mẫu khác nhau của cùng một khối u). Việc tính toán này có tính đến độ biến thiên giữa các mẫu dịch phân giải mô cũng như các lần đo lặp lại trong thử nghiệm huỳnh quang. Các CV này được thể hiện trên Fig.11B, và độ biến thiên chung được xác định là giá trị trung bình của các CV. Độ biến thiên này có thể được giải thích một phần bằng thực tế là các dịch

phân giải mô không được làm đồng nhất hoàn toàn, tức là các hạt mô còn lại chứa các tế bào không được phân ly dẫn đến số lượng tế bào cao hơn của các mẫu phân lập lặp lại (ví dụ, GC816T trên Fig.11A).

Số lượng bản sao peptit cho một tế bào

Dựa vào dữ liệu định lượng peptit trong các lần phân tích nanoLC-MS/MS (“tổng lượng peptit”), hiệu quả phân lập TUMAP (“hiệu quả phân lập theo tỷ lệ %”), và số lượng tế bào của mỗi mẫu khối u, có thể tính số lượng bản sao TUMAP cho một tế bào theo công thức sau:

Tổng lượng peptit được tính từ kết quả của 2 đến 4 lần phân tích nanoLC-MS/MS (“peptit/lần [fmol]”) bằng cách sử dụng đường cong hiệu chỉnh thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.4 đến Fig.7.

$$\frac{\text{tổng lượng peptit}}{100\%} = \left(\frac{\text{lượng peptit}}{\text{lượng mẫu}} [\text{fmol}] \right) \times \frac{6,022 \times 10^{23} \left[\frac{\text{t}}{\text{mol}} \right]}{10^2 \left[\frac{\text{fmol}}{\text{mol}} \right]} \times \frac{\text{lượng dịch phân giải peptit } [\mu\text{l}]}{\text{lượng mẫu MS cho một lần phân tích } [\mu\text{l}]} \times \text{\% dịch phân giải sử dụng để tách TUMAP} \quad (2)$$

Chỉ các kết quả phân tích MS cao hơn LLOQ như được xác định bằng cách sử dụng đường cong hiệu chỉnh được sử dụng để tính số lượng bản sao peptit tuyệt đối. LLOQ này để chỉ lượng TUMAP trong phân tích nanoLC-MS/MS (“LLOQ/lần phân tích [fmol]”).

Số lượng bản sao cho một tế bào của tất cả các peptit có thể được định lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 30000 số lượng bản sao cho một tế bào (xem bảng 3).

Bảng 3: Mô tả chung về số lượng bản sao TUMAP HLA-A*02 và HLA-A*24 cho một tế bào

TUMAP HLA-A*02 được phân tích trong 8 mẫu, TUMAP HLA-A*24 được phân tích trong 6 mẫu. nq = không được định lượng do lượng peptit thấp hơn LLOQ

Alen HLA	Ký hiệu peptit	Định lượng trong n mẫu (% các mẫu được phân tích)	Số lượng bản sao cho một tế bào (khoảng giá trị của các mẫu riêng biệt và các mẫu sinh học lặp lại)
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

Để quan sát LLOQ trong trường hợp “số lượng bản sao peptit cho một tế bào”, “LLOQ cho một tế bào” được tính đối với mỗi TUMAP trong mỗi mẫu bằng cách sử dụng hai công thức nêu trên. Do các mẫu này khác nhau về tổng số

lượng tế bào, LLOQ cho một tế bào là khác nhau đối với mỗi mẫu (xem Fig.12 và Fig.13 đối với TUMAP A*02 và Fig.14 và Fig.15 đối với TUMAP A*24).

Ước lượng sai số trong phương pháp định lượng tuyệt đối TUMAP

Để ước lượng mức độ biến thiên trong phương pháp định lượng tuyệt đối TUMAP, tác giả sáng chế xem xét độ biến thiên tương đối của ba kết quả thử nghiệm chính Như được mô tả trên đây:

- a) lượng TUMAP được phân lập: độ lệch tương đối 1,8% (A*02) và 2,1% (A*24)
- b) hiệu quả phân lập TUMAP: độ lệch tương đối 24% (A*02) và 32% (A*24)
- c) số lượng tế bào trong mẫu mô: độ lệch tương đối 27%

Khi giả thiết sự phân bố bình thường của các giá trị của biến số, sai số tương đối (σ) của “số lượng bản sao cho một tế bào” có thể được tính bằng căn bậc hai của tổng các sai số tương đối bình phương của mỗi biến số:

$$\sigma \text{ số bản sao} = \sqrt{(\sigma \text{ tổng số tế bào})^2 + (\sigma \text{ tổng số peptit})^2 + (\sigma \text{ hiệu quả tách})^2}$$

Với các giá trị nêu trên, hệ số biến thiên của số lượng bản sao tuyệt đối cho một tế bào là khoảng 36% đối với peptit HLA-A*02, và 42% đối với peptit HLA-A*24. Để tạo ấn tượng về mức độ biến thiên của kết quả, sai số tương đối và tuyệt đối của số lượng bản sao peptit cho một tế bào của peptit làm mẫu và mẫu được tính (bảng 4).

Bảng 4: Ví dụ tính toán sai số tương đối và tuyệt đối trong phương pháp định lượng TUMAP tuyệt đối đối với peptit làm mẫu

	Giá trị	A*02		A*24	
		Sai số tương đối (%)	Sai số tuyệt đối	Sai số tương đối (%)	Sai số tuyệt đối
Tổng số lượng tế bào/mẫu	1×10^8	27%	-	27%	-
Tổng lượng peptit [fmol]	16,25	1,8%	-	2,1%	-
Hiệu quả phân lập peptit MHC	10%	24%	-	32%	--
Số lượng bản sao peptit cho một tế bào	1000	36%	360	42%	420

Việc tính toán mẫu này gợi ý rằng đối với việc phân tích định lượng tuyệt đối qua nhiều bước phức tạp, mức độ biến thiên của các kết quả vẫn nằm trong khoảng chấp nhận được. Đối với các TUMAP riêng biệt, sai số tương đối có thể lệch khỏi sai số trung bình tính được ở đây. Số lượng bản sao TUMAP cho một tế bào có thể được so sánh về mặt định lượng giữa các TUMAP khác nhau để cho phép TUMAP ưu tiên chọn đích kháng thể và/hoặc thụ thể tế bào T tan thích hợp.

So sánh phương pháp định lượng TUMAP với các phương pháp đã biết

Phương pháp chính xác để định lượng tuyệt đối số lượng bản sao peptit liên quan đến MHC cho một tế bào là chưa từng được thể hiện trước đây. Điều quan trọng nhất là các phương pháp trước đây để định lượng peptit gắn kết với MHC bằng cách sử dụng phương pháp phân tích MS không tính đến sự tổn thất kháng nguyên trong quá trình điều chế mẫu (Tan et al., 2011; Hogan et al., 2005). Gần đây, nhóm của Peter A. von Velen đã công bố phương pháp “định lượng chính xác peptit gắn kết với MHC” (Hassan et al., 2014). Trong phương pháp này, cách tiếp cận được sử dụng để định lượng hai kháng nguyên hòa hợp mô thứ yếu là LB-NISCH-1A và LB-SSR1-1S trên tế bào EBV-LCL JYpp65. Tuy nhiên, các bước thử nghiệm riêng biệt khác nhau đáng kể, các bước này được nêu tóm tắt

trong bảng dưới đây:

Bảng 5: so sánh phương pháp định lượng TUMAP của Hassan và các đồng tác giả và phương pháp theo sáng chế

	Phương pháp của Hassan và các đồng tác giả	Phương pháp theo sáng chế
Đường cong hiệu chỉnh peptit	Chỉ được sử dụng để xác định khoảng giá trị tuyến tính khi giả thiết rằng tất cả các peptit có cùng mối tương quan giữa lượng peptit và tín hiệu MS (độ dốc = 1)	Để xác định khoảng giá trị tuyến tính, LLOQ và để định lượng peptit; xem xét mối tương quan đặc trưng cho peptit của lượng peptit và tín hiệu MS của mỗi peptit riêng biệt
Định lượng peptit	Hiệu chỉnh một điểm: tỷ lệ tín hiệu với peptit chuẩn được bổ sung	Phương pháp chất chuẩn nội, dựa trên đường cong hiệu chỉnh đặc trưng cho peptit, định lượng các mẫu gần giá trị LLOQ
Hiệu quả phân lập	Phức chất peptit MHC được bổ sung vào dịch phân giải sau khi phân giải trong 2 giờ và loại bỏ bằng cách ly tâm, không quan tâm tới lượng peptit tổn hao trong các bước này	Phức chất peptit MHC được bổ sung ngay sau khi làm đồng nhất mô, tức là thời điểm sớm nhất trong quá trình phân lập peptit
Mẫu	Dòng tế bào	Mô khối u rắn
Điều chế mẫu	Bước sắc ký bổ sung trên cột C18 trước khi phân tích nanoLC-MS/MS lần cuối được sử dụng để làm giảm tính phức tạp của mẫu.	Sử dụng ngay mẫu đã kết tủa miễn dịch và lọc để phân tích nanoLC-MS/MS

Xác định số lượng tế bào	Đếm số lượng tế bào trong quá trình điều chế viên vón tế bào	Phân tích hàm lượng ADN từ dịch phân giải các mô rắn
Tính toán sai số	Chỉ tính đến mức độ biến thiên của các lần phân tích MS lặp lại (CV 0,1-7,1%) mà không tính đến mức độ biến thiên của hiệu quả phân lập peptit MHC (26% và 91% tương ứng), và mức độ biến thiên của số lượng tế bào.	Mức độ biến thiên trong các lần phân tích MS lặp lại (CV trung bình là 1,8-2,1%), hiệu quả phân lập peptit MHC (CV trung bình là 24-32%), và xác định số lượng tế bào (CV trung bình là 27%) được tính đến.

Số lượng bản sao của hai peptit được phân tích bằng phương pháp của Hassan và các đồng tác giả thay đổi trong khoảng từ 800 đến 5300 (độ lệch tương đối 74%), và 3000 đến 12000 (độ lệch tương đối 60%) số lượng bản sao cho một tế bào trong các mẫu sinh học lặp lại tương ứng. Nguyên nhân của sự biến thiên này không được bàn luận rõ, nhưng có thể là do việc sử dụng các thiết bị MS khác nhau.

Tóm lại, phương pháp cải tiến hơn theo sáng chế được cho là góp phần tạo ra kết quả chính xác hơn và đáng tin cậy hơn.

Định lượng các peptit có số lượng bản sao thấp

Để chứng minh khả năng áp dụng của phương pháp theo sáng chế, các dữ liệu như được thể hiện trong bảng sau đây được tạo ra. Các peptit được xác định chỉ có mặt với số lượng bản sao rất nhỏ, trong số chúng có peptit PDE11-001. Có thể thấy rằng phương pháp theo sáng chế cho phép xác định số lượng bản sao nhỏ tới mức chỉ khoảng 10 bản sao peptit cho một tế bào.

Bảng 6: Định lượng các peptit có số lượng bản sao thấp

PC –bệnh ung thư tuyến tiền liệt– trình tự của PDE11-001 là ALLESRVNL (SEQ ID No. 25)

Ký hiệu peptit	Số lượng bản sao cho một tế bào			Số mẫu			Nguồn/HLA
	Nhỏ nhất	Trung bình	Lớn nhất	> LLOQ	> LOD	có thể đánh giá được	
Peptit 1	20	20	20	1	5	16	NSCLC/A*02
Peptit 2	10	30	300	13	16	17	NSCLC/A*02
Peptit 3	10	30	50	4	10	18	NSCLC/A*02
Peptit 4	10	30	100	17	17	19	NSCLC/A*02
Peptit 5	20	20	90	7	8	11	NSCLC/A*02
Peptit 6	10	20	50	6	6	10	NSCLC/A*02
Peptit 7	< 10	30	200	9	12	15	PC/A*02
PDE11-001	< 10	10	30	8	9	10	PC/A*02

PDE11-001 là peptit gắn kết HLA-A*02 có nguồn gốc từ phosphodiesteraza 11A (PDE11A), enzyme này có tác dụng xúc tác quá trình thủy phân cAMP và cGMP, do vậy có tác dụng điều hoà giảm các con đường truyền tín hiệu tương ứng. Các đột biến trong PDE11A có liên quan đến tình trạng tăng sản tuyến thượng thận cũng như có liên quan đến khối u tế bào mầm có tính gia đình. Peptit này được phát hiện trên các mẫu ung thư tuyến tiền liệt, và còn được phát hiện trong các mẫu caxinom tế bào gan, caxinom tụy và caxinom tế bào thận nhưng không được phát hiện trên mô bình thường bất kỳ.

Tài liệu tham khảo

- 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 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.

YÊU CẦU BẢO HỘ

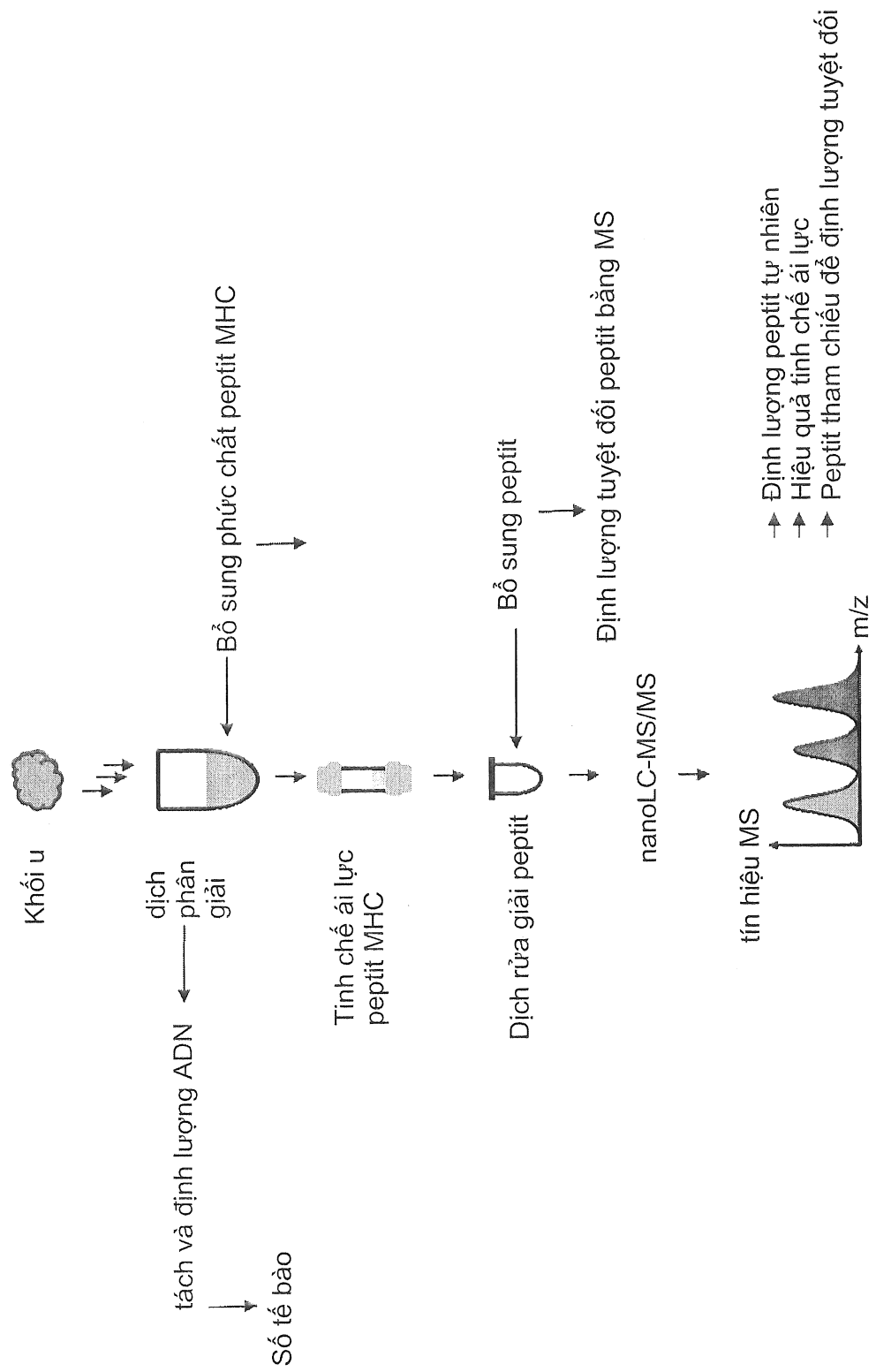
1. Phương pháp định lượng tuyệt đối phối tử peptit phức hợp tương thích mô chính (MHC) trên tế bào, phương pháp này bao gồm các bước:
 - a) tạo ra tế bào biểu hiện phối tử peptit MHC nêu trên từ mẫu sinh học được chọn từ mẫu mô, mẫu máu, mẫu khối u, hoặc mẫu mô nhiễm khuẩn chứa tế bào nêu trên, bao gồm phân giải mô bằng enzym, và/hoặc phân giải tế bào,
 - b) xác định số lượng tế bào của chế phẩm thu được trong bước a) bao gồm đếm nhân tế bào, xác định ADN bằng cách đo quang, xác định ADN bằng cách đo huỳnh quang, hoặc PCR định lượng,
 - c) bổ sung lượng đã biết của phối tử peptit-MHC và/hoặc phức chất peptit-MHC cần định lượng vào chế phẩm thu được trong bước a) ngay sau khi làm đồng nhất mô (“chế phẩm bổ sung I”),
 - d) phân lập phối tử peptit MHC ra khỏi chế phẩm thu được trong bước c) để thu được dịch rửa giải peptit,
 - e) bổ sung lượng đã biết của phối tử peptit MHC cần định lượng vào dịch rửa giải peptit này (“chế phẩm bổ sung II”) làm chất hiệu chỉnh nội,
 - f) tiến hành phân tích bằng phương pháp phổ khối đối với phối tử peptit MHC này để tạo ra:
 - aa) tín hiệu về hiệu quả phân lập trong bước d),
 - bb) tín hiệu về chất hiệu chỉnh nội trong bước e), và
 - cc) tín hiệu của phối tử peptit MHC nêu trên từ các tế bào được tạo ra trong bước a) nêu trên,
- và
- g) định lượng phối tử peptit MHC nêu trên dựa trên việc so sánh các tín hiệu thu được trong bước f) với
 - aa) số lượng tế bào thu được,
 - bb) lượng đã biết của phối tử peptit MHC và/hoặc phức chất peptit-MHC cần định lượng được bổ sung trong bước c), và
 - cc) lượng đã biết của phối tử peptit MHC cần định lượng được bổ sung trong bước e), trong đó việc định lượng bao gồm bước tính toán tỷ lệ giữa các tín hiệu của chất hiệu chỉnh nội trong bước e) và tín hiệu của phối tử

peptit MHC được phân lập, và so sánh tỷ lệ này với đường cong hiệu chỉnh được thiết lập của phối tử peptit MHC, và trong đó việc định lượng còn bao gồm bước tạo ra đường cong hiệu chỉnh đặc hiệu của peptit dựa trên tỷ lệ với chất hiệu chỉnh nội được sử dụng với cùng lượng, và xác định giới hạn định lượng dưới (lowest level of quantification: LLOQ) của phối tử peptit MHC cần được định lượng nêu trên, nhờ đó đạt được việc định lượng tuyệt đối phối tử peptit MHC trên tế bào của phối tử peptit MHC nếu lượng được định lượng cao hơn giá trị LLOQ như được xác định.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phối tử peptit MHC nêu trên là peptit liên quan đến khối u (TAA) hoặc peptit liên quan đến bệnh (DAA).
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước xác định lượng của ít nhất một loại trong số các phân tử HLA trong chế phẩm thu được trong bước a) nêu trên.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phức chất peptit-MHC để bổ sung và/hoặc phối tử peptit MHC để bổ sung được đánh dấu.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó phức chất peptit-MHC để bổ sung và/hoặc phối tử peptit MHC để bổ sung được đánh dấu khác nhau bằng chất đồng vị.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó bước phân lập bao gồm sắc ký, như sắc ký ái lực.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chọn các phối tử peptit MHC được trình diện quá mức, được biểu hiện quá mức và/hoặc đặc hiệu khối u để phân tích.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó phương pháp này được thực hiện với năng suất cao.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phương pháp này bao gồm các bước như đã nêu.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó (các) mẫu sinh học có nguồn gốc từ một đối tượng, hoặc từ nhóm các đối tượng mắc cùng một tình trạng bệnh.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tạo ra profin phổi tử MHC được cá nhân hóa dựa trên các phổi tử MHC peptit như được định lượng nêu trên.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong profin phổi tử MHC được cá nhân hóa là profin phổi tử MHC đặc trưng cho bệnh được cá nhân hóa.

Fig.1



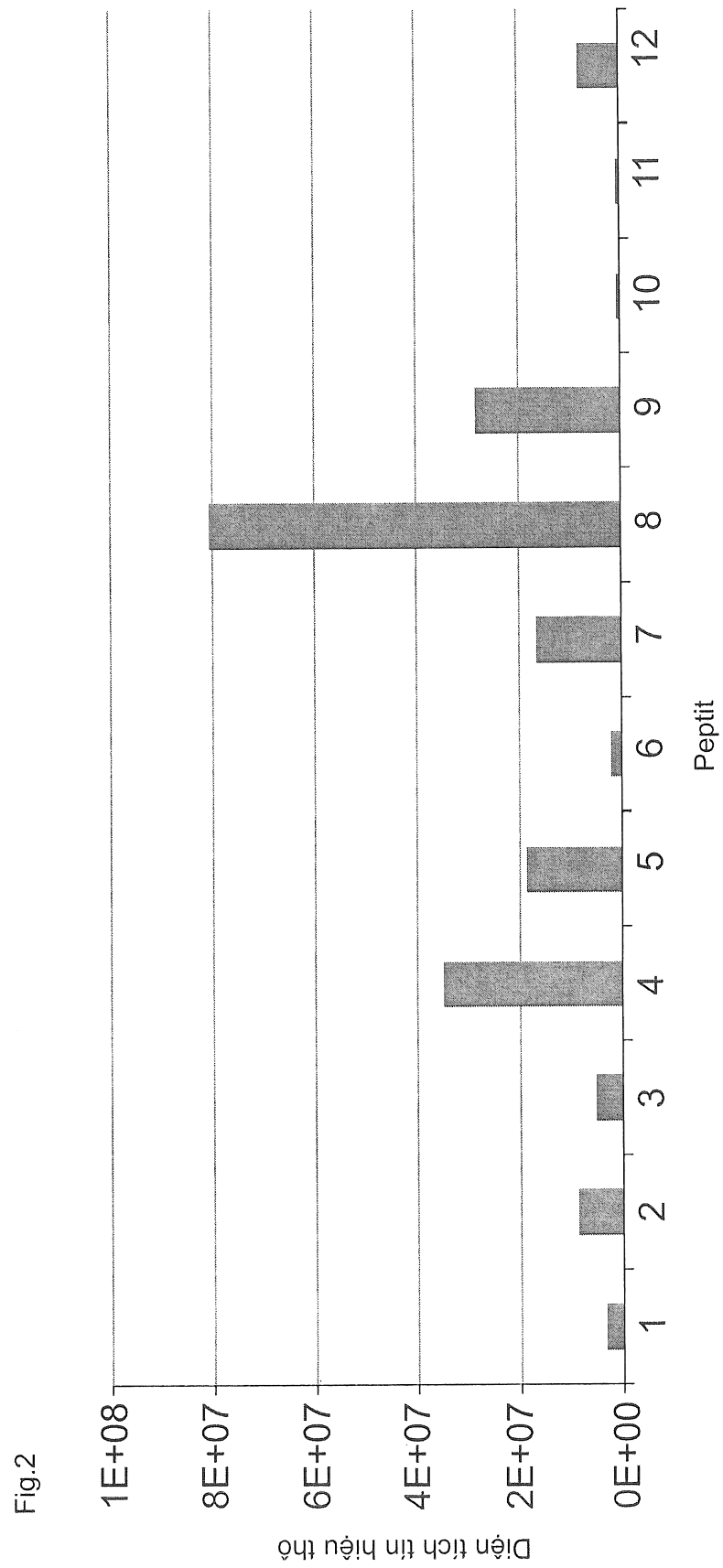


Fig.3

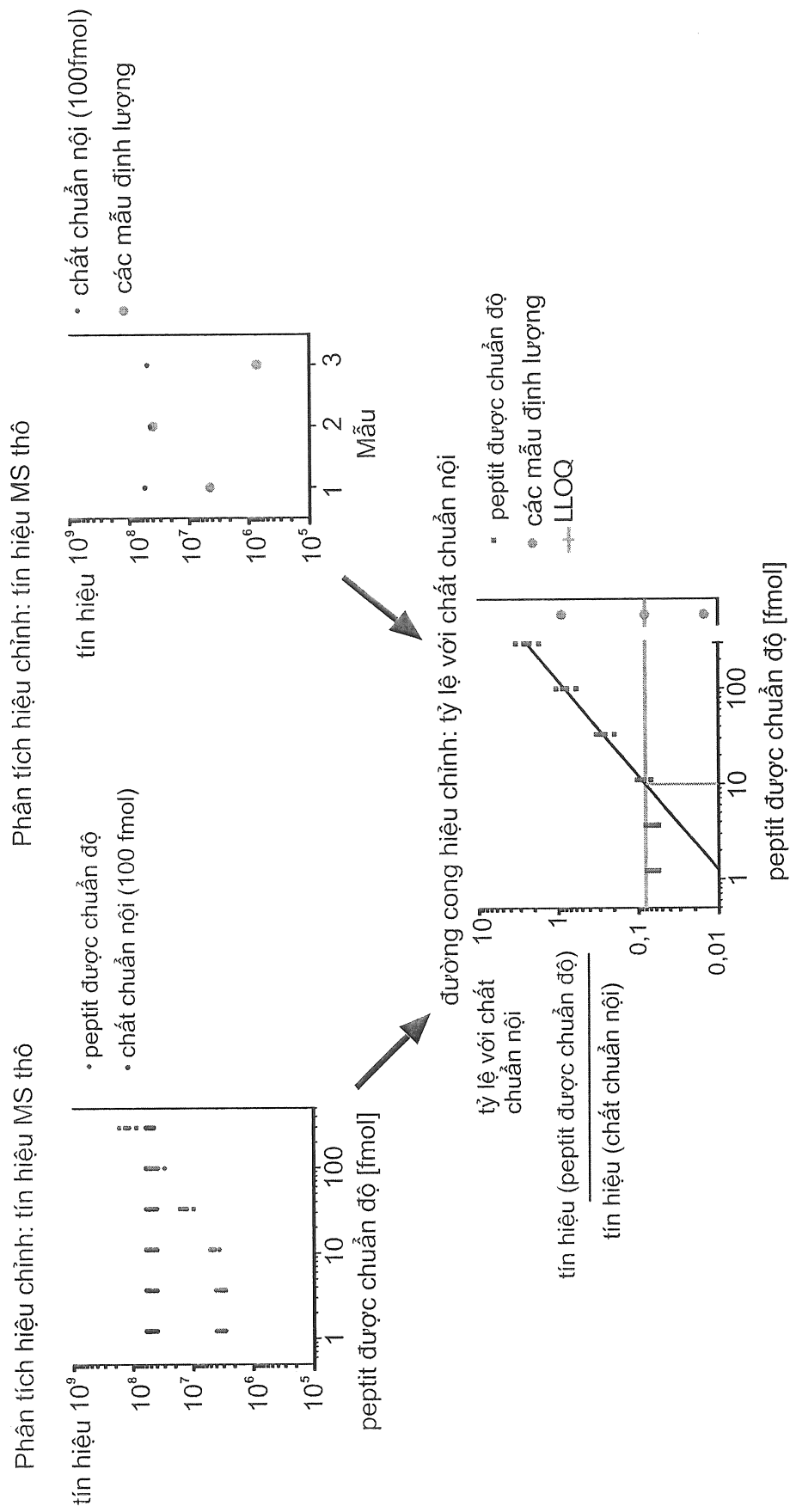


Fig.4

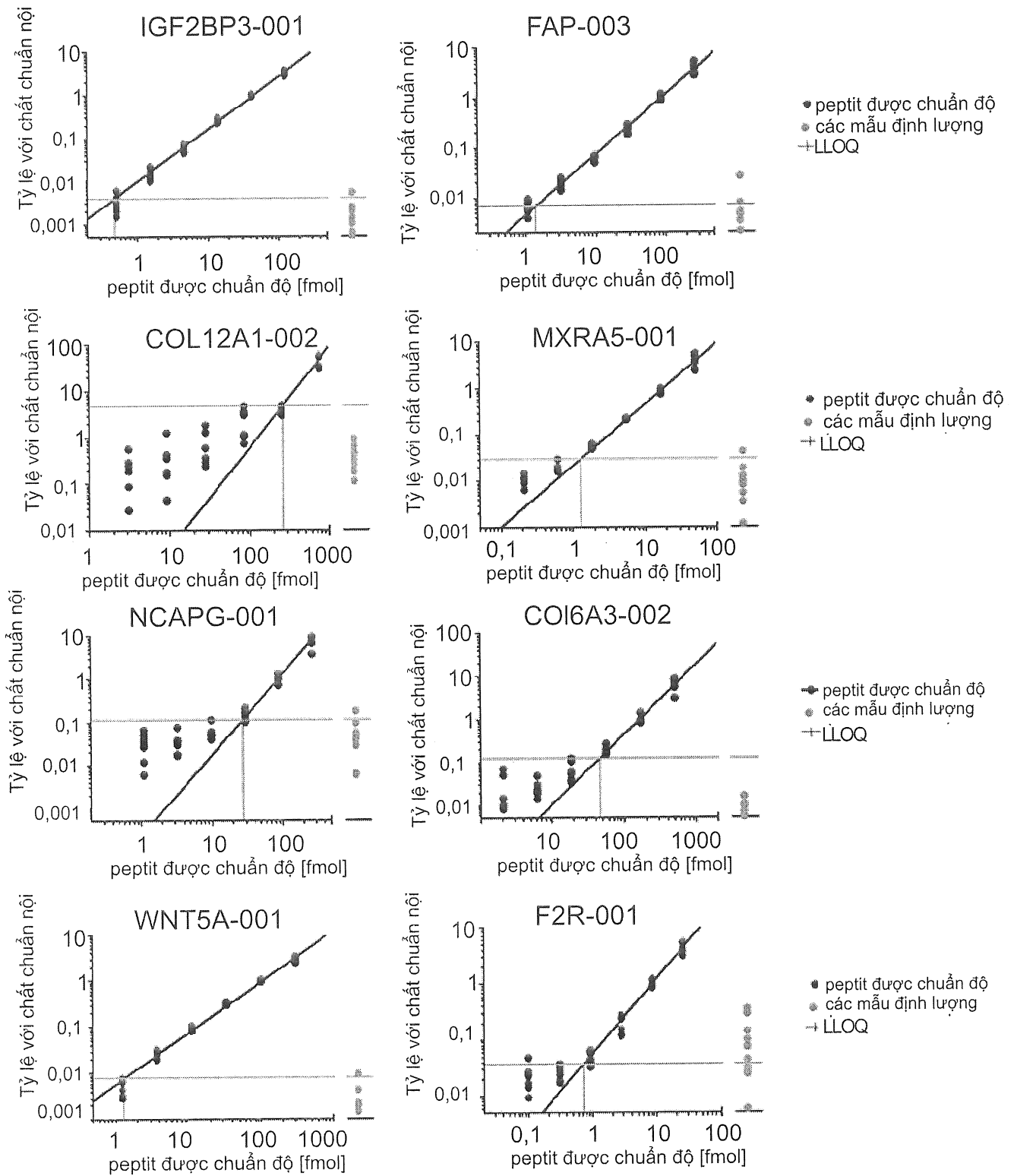


Fig.5

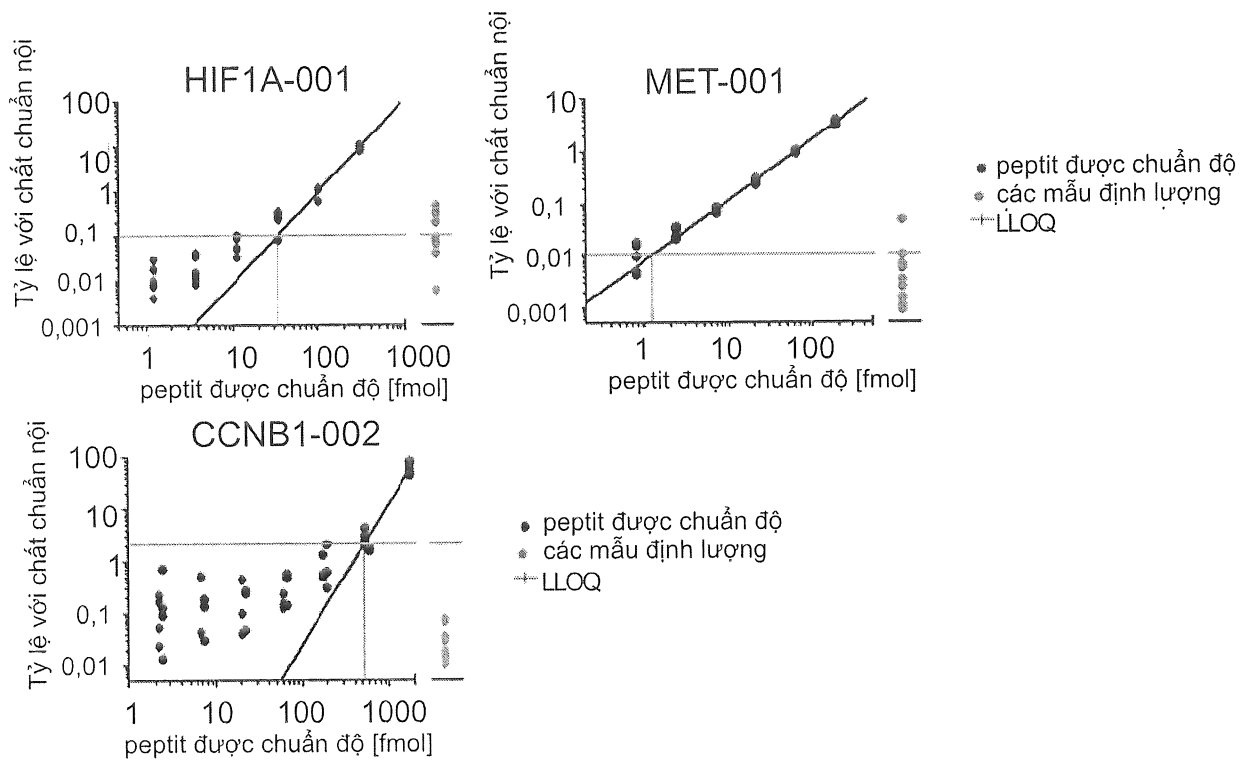


Fig.6

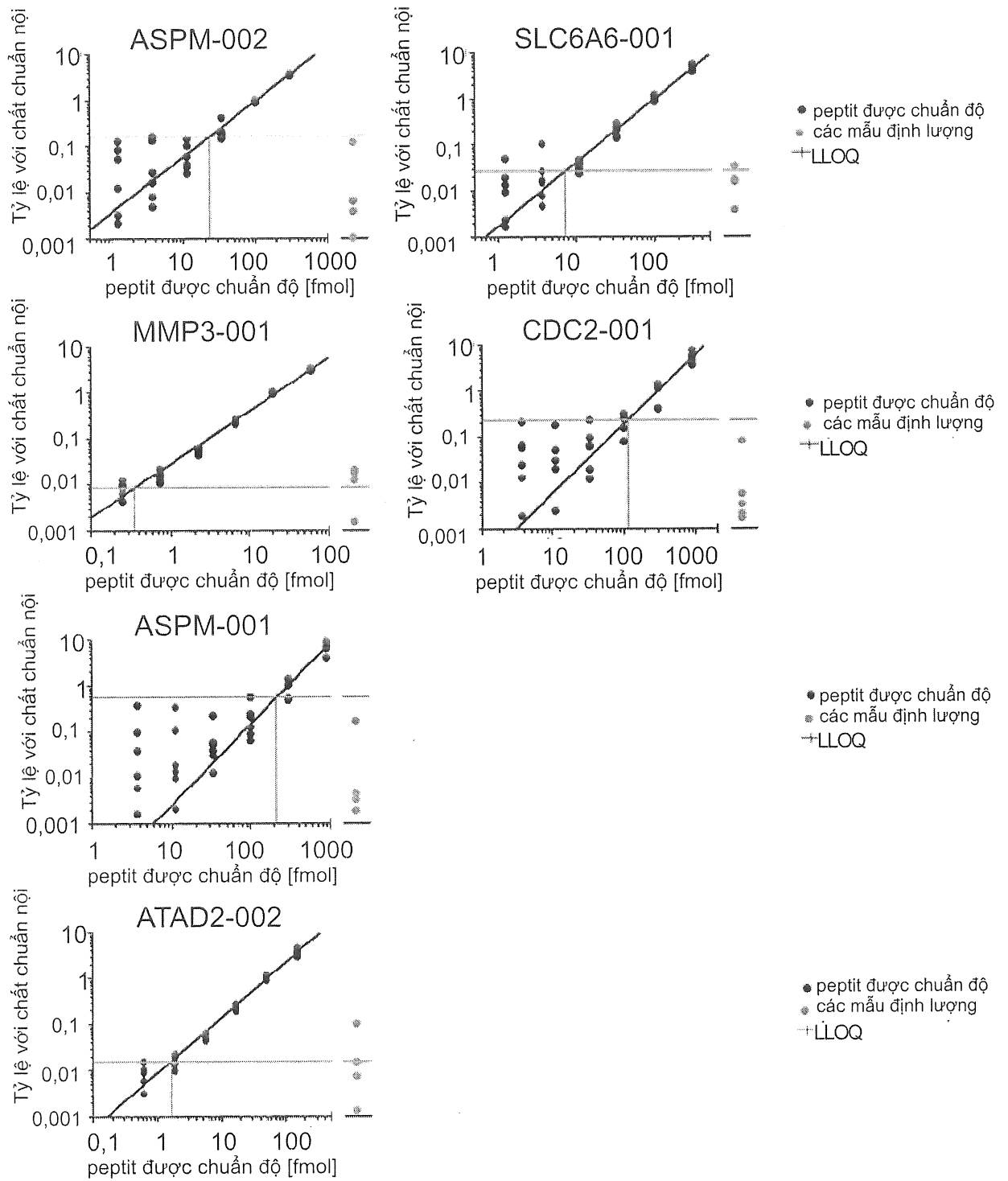


Fig.7

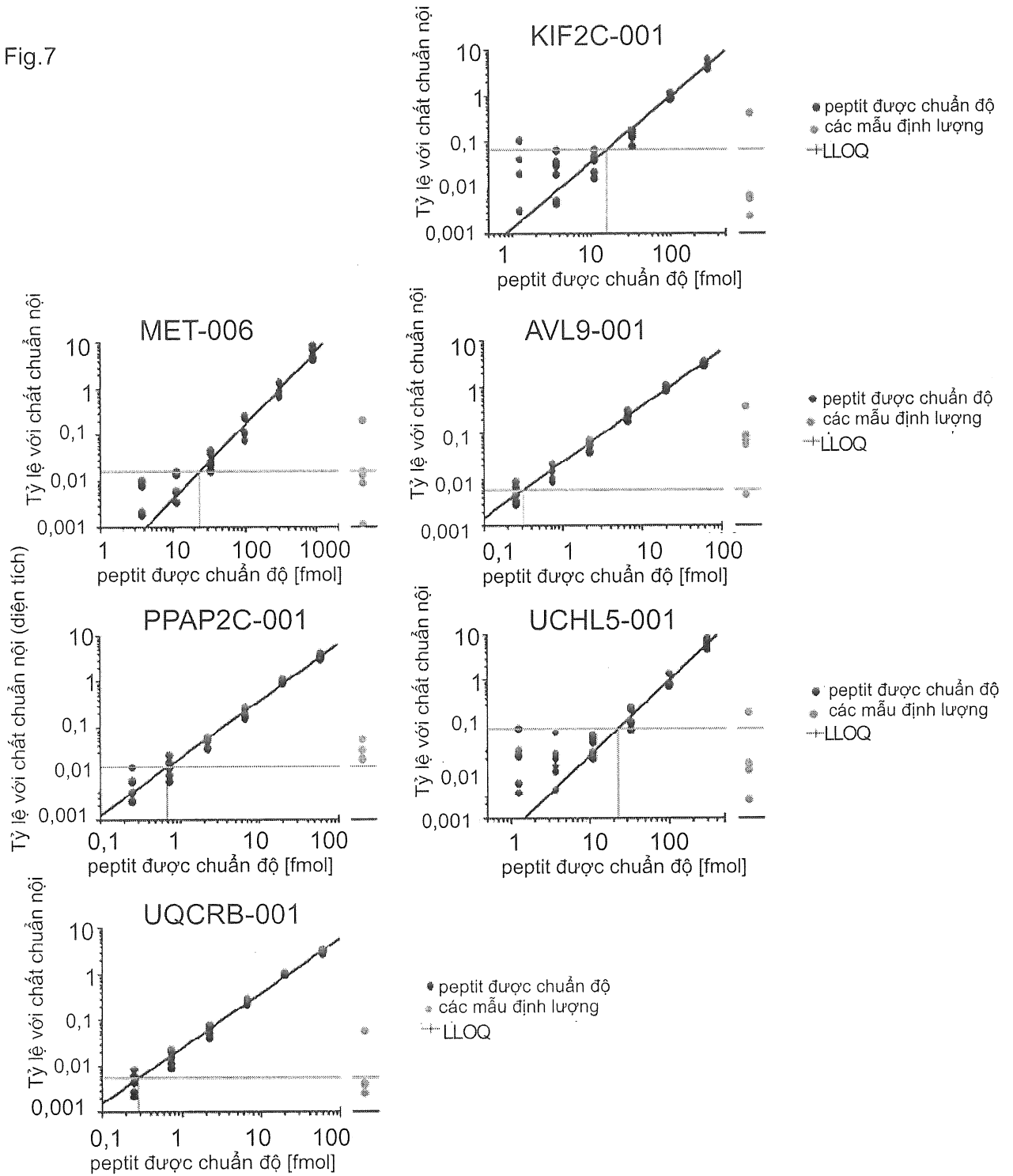


Fig.8

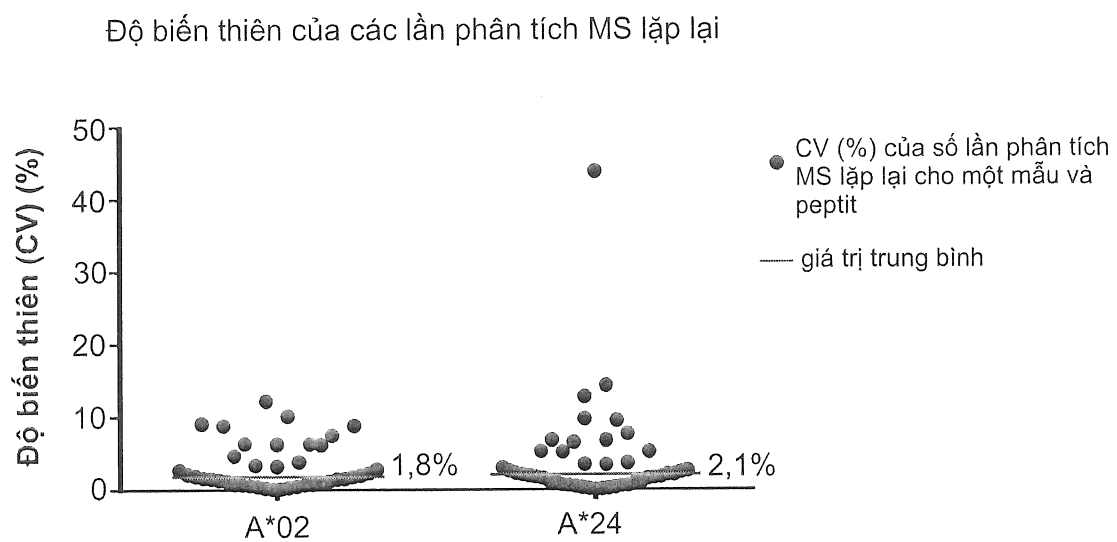


Fig.9

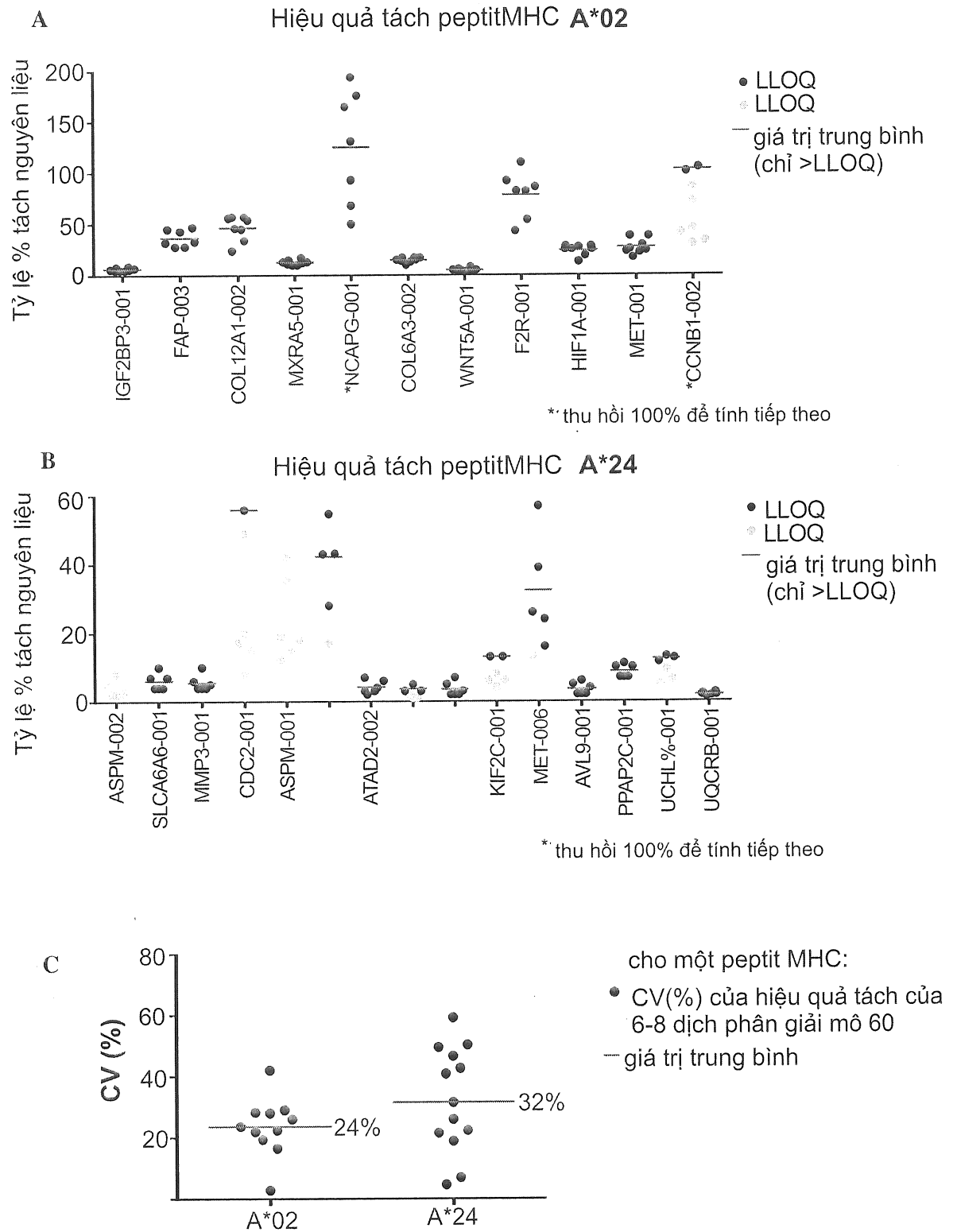


Fig.10

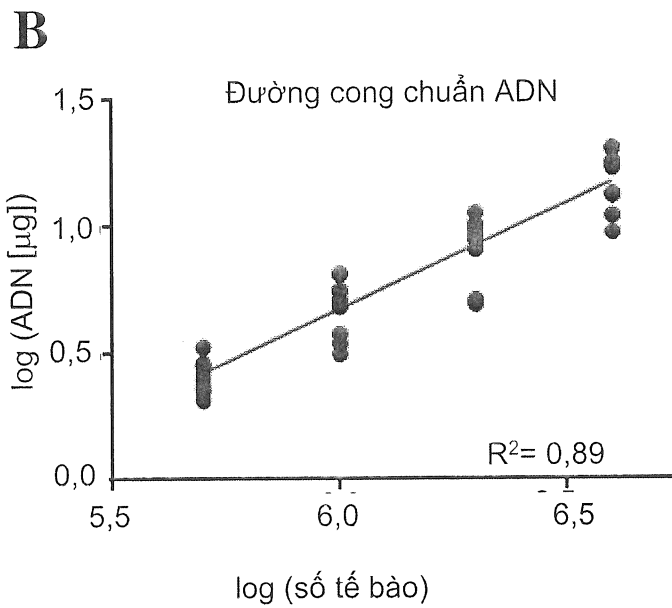
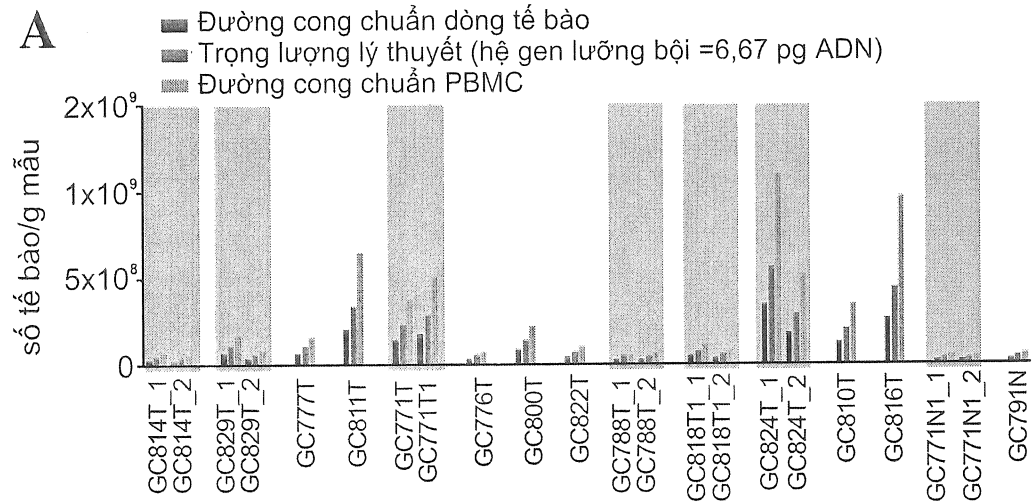
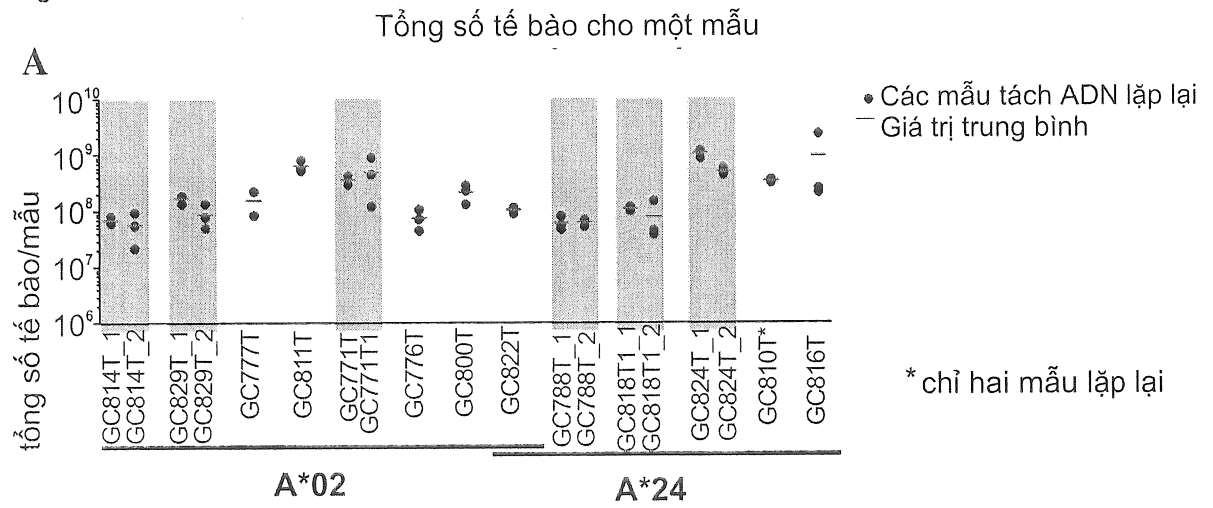


Fig.11



B Độ biến thiên của số tế bào

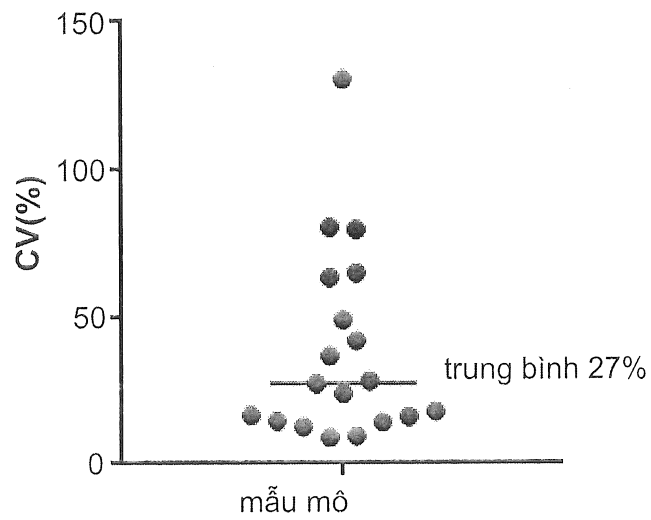


Fig.12

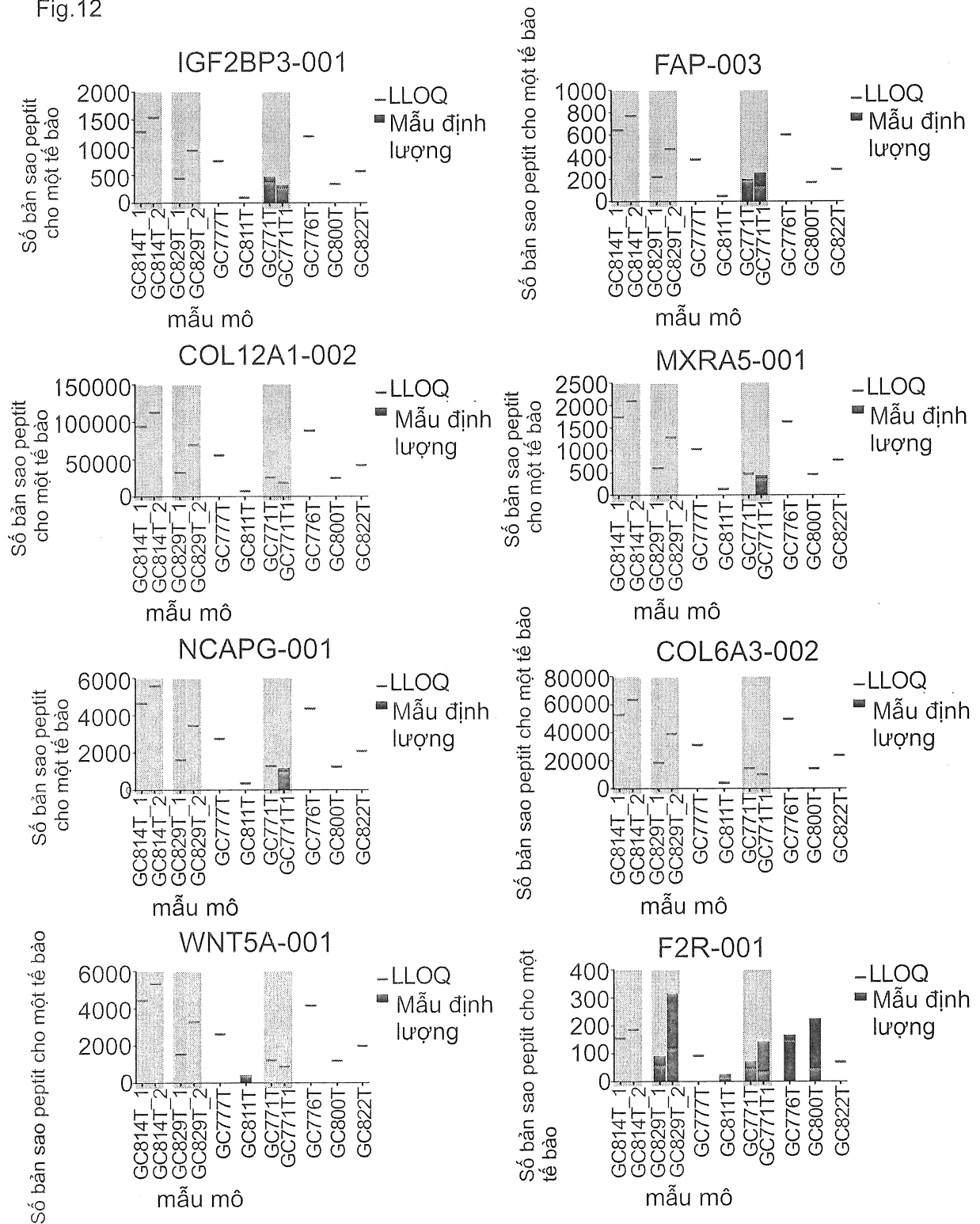


Fig.13

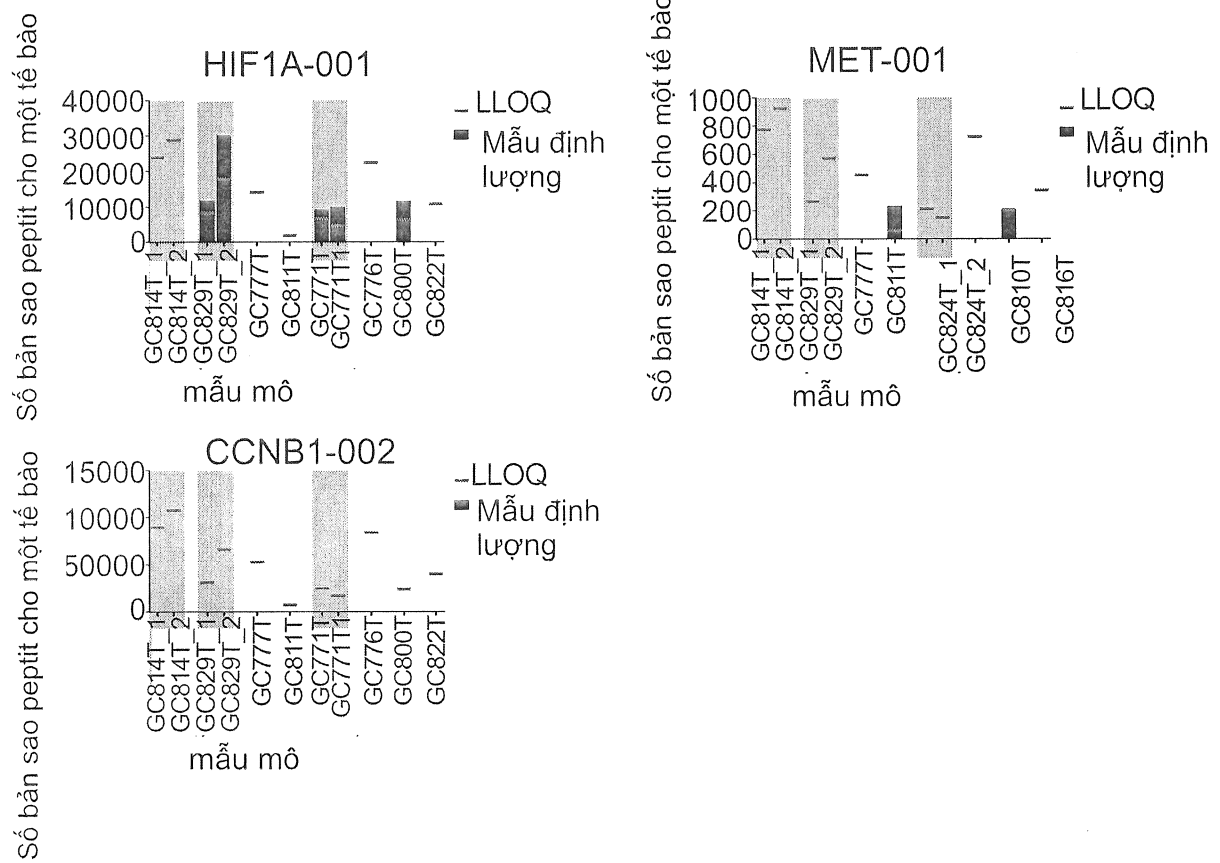


Fig.14

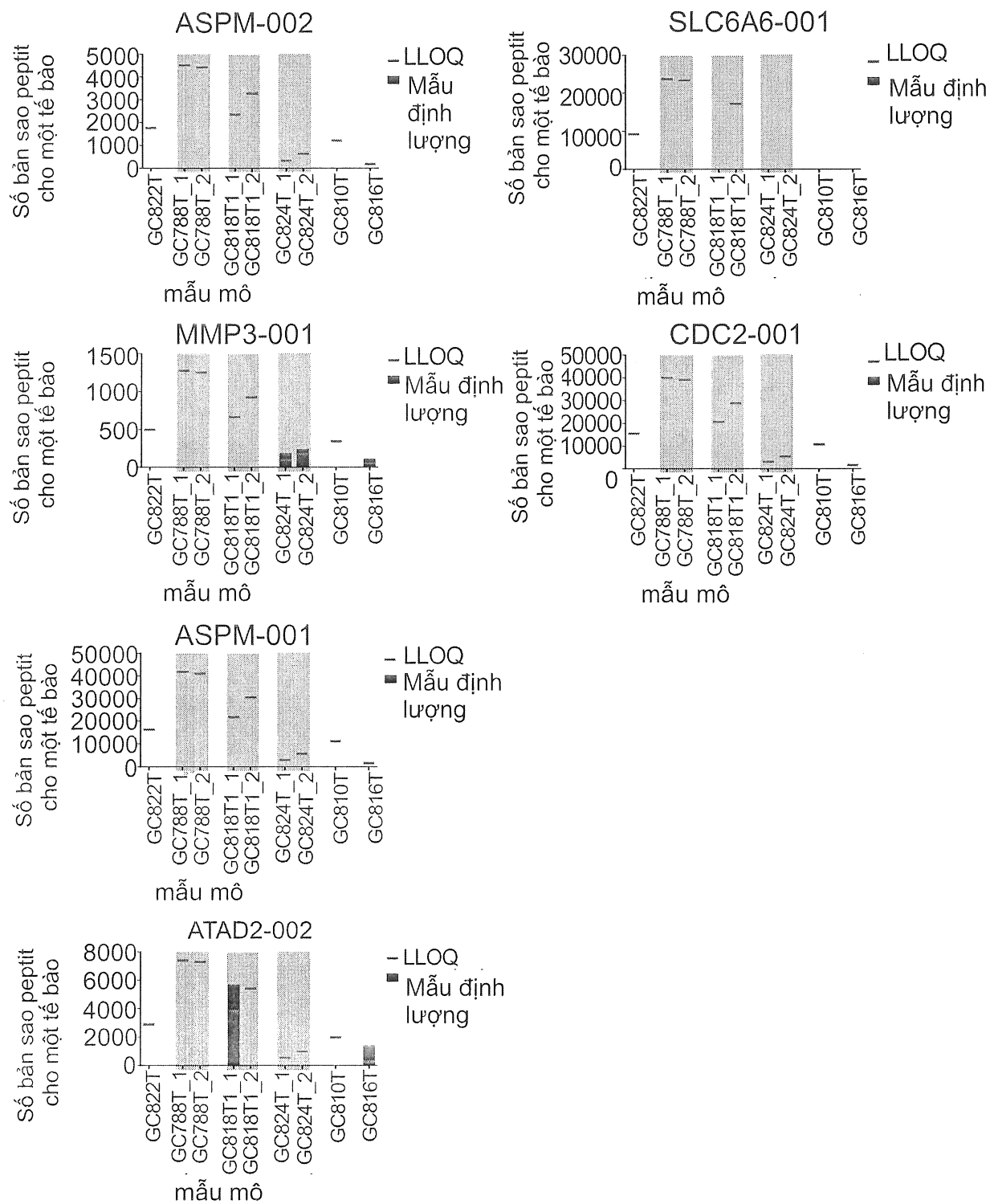


Fig.15

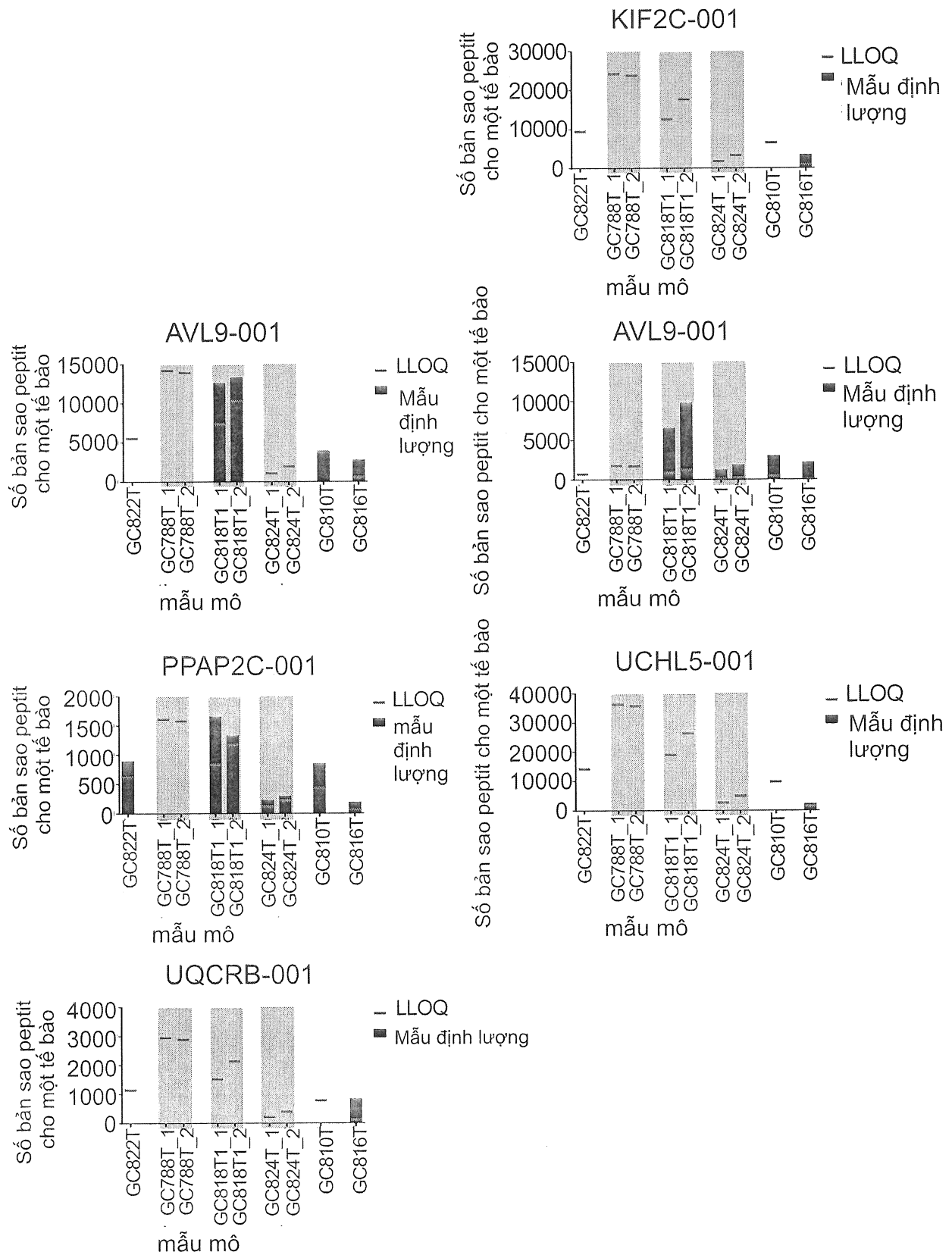


Fig.16

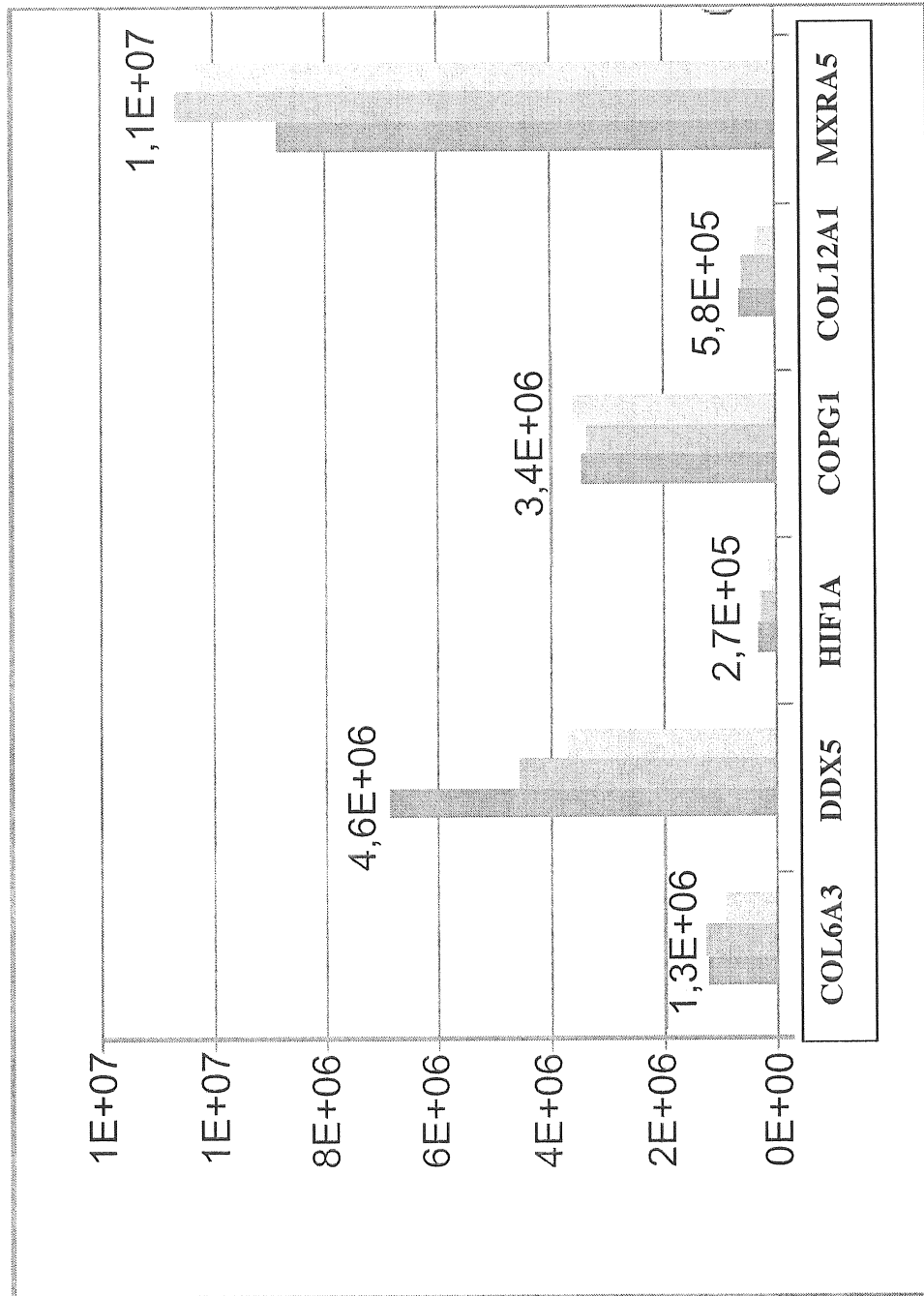
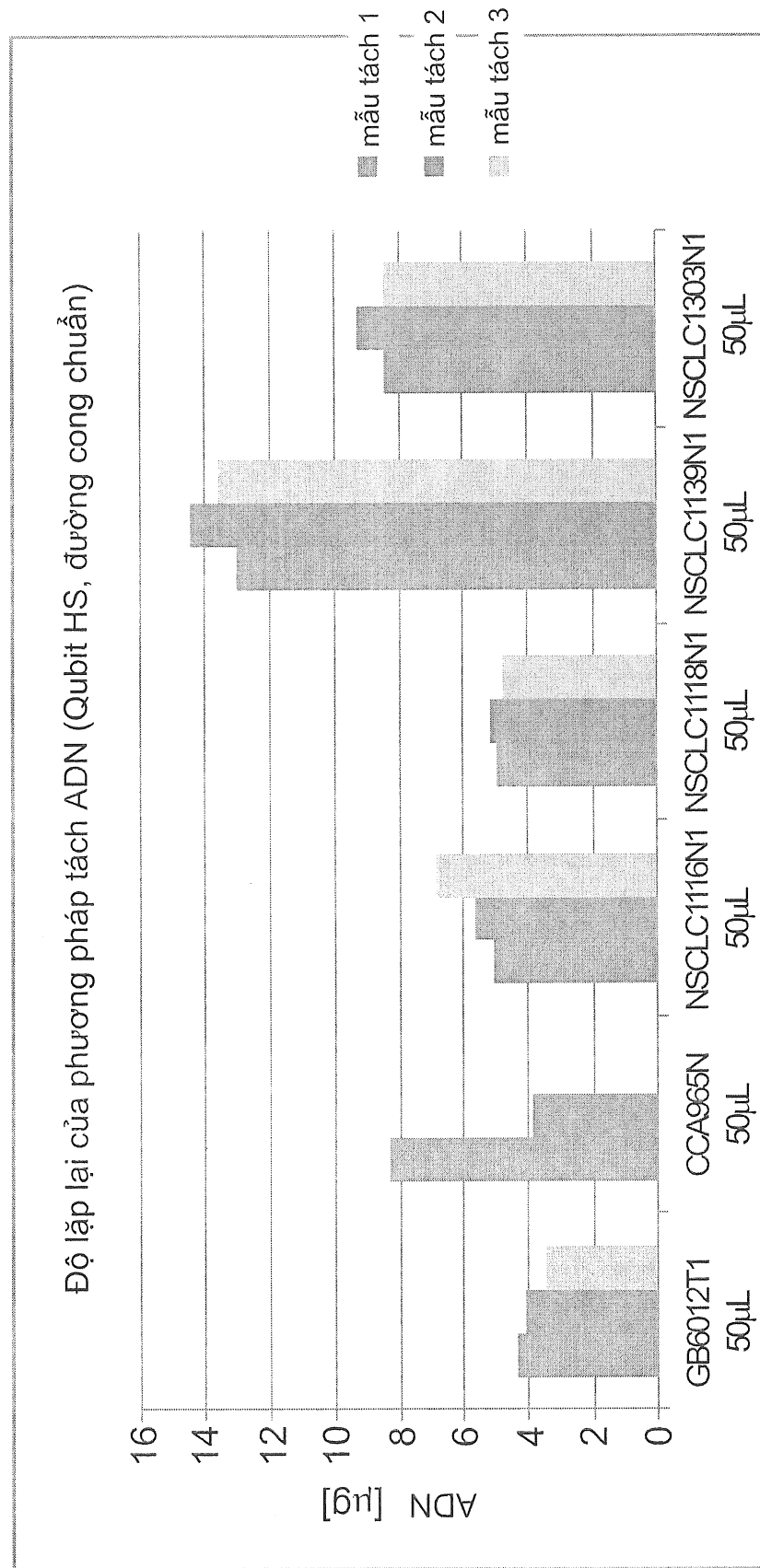


Fig.17



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics biotechnologies GmbH
 <120> Phương pháp định lượng tuyệt đối ít nhất một phối tử peptit phức hợp tương thích mô chính trên tế bào
 <130> I32727WO
 <150> US61/097,994
 <151> 2014-12-30
 <150> GB1423361.3
 <151> 2014-12-30
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 1

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
 1 5

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 2

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 3

Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 4

Thr Leu Ser Ser Ile Lys Val Glu Val
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 5

Tyr Leu Leu Ser Tyr Ile Gln Ser Ile
 1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 6

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
 1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 7

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val
 1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 8

Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu
 1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 9

Ala Leu Asp Gly Phe Val Met Val Leu
 1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 10

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile
 1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 11

Ile Leu Ile Asp Trp Leu Val Gln Val

1

5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 12

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 13

Val Tyr Pro Asn Trp Ala Ile Gly Leu
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 14

Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe
 1 5

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 16

Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 17

Arg Tyr Leu Trp Ala Thr Val Thr Ile
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 18

Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu
 1 5

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 20

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 21

Phe Tyr Ile Ser Pro Val Asn Lys Leu
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 22

Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu
 1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 23

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu
 1 5

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 24

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

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 25

Ala Leu Leu Glu Ser Arg Val Asn Leu
1 5