

I32727WO

Método para la cuantificación absoluta de péptidos cancerosos restringidos a HLA que son procesados de forma natural

La presente invención se refiere a un método para la cuantificación absoluta de péptidos cancerosos restringidos a HLA que son procesados de forma natural, es decir, para la determinación del número de copias del péptido o péptidos que son presentados por cada célula. La presente invención no solo está destinada al desarrollo de terapias con anticuerpos o de vacunas peptídicas, sino que es también sumamente valiosa para la inmunovigilancia definida con criterios moleculares, y resulta útil en los procesos de identificación de nuevos antígenos peptídicos para estrategias inmunoterapéuticas, tales como vacunas, terapias con anticuerpos o transferencia adoptiva de linfocitos T contra el cáncer, enfermedades infecciosas o autoinmunitarias.

Campo de la invención

El desarrollo tanto de los agentes inmunoterapéuticos antitumorales como de las inmunoterapias contra las enfermedades infecciosas y autoinmunitarias destinadas a estimular a los linfocitos T del sistema inmunitario para que combatan el cáncer podría mejorar notablemente con el conocimiento profundo de los niveles de presentación de los péptidos que se unen a los antígenos leucocitarios humanos (HLA) en los tejidos primarios afectados por la enfermedad. Esta información resulta particularmente relevante en el caso de las terapias basadas en anticuerpos o de las vacunas peptídicas, así como para cualquier otro tipo de vacuna con linfocitos T que esté basada en entidades moleculares como proteínas, ADN o ARN. Este tipo de datos cuantitativos no habían estado disponibles hasta la fecha en lo que concierne al tejido del paciente en una escala de copias absolutas por cada célula individual.

La patente EP1508047B1 dio a conocer un método para identificar péptidos como los indicados arriba que evita el problema asociado con la «inmunología inversa». Pero tal y como se ha descrito antes, este método no sirve para cuantificar dichos péptidos. En WO 2005/076009 se dio a conocer otro método que recurre a una

estrategia de marcaje que permite cierta cuantificación, pero no en una escala absoluta. Otros marcadores se han dado a conocer, por ejemplo, en WO 03/025576 o por Martin et al. en Proteomics 2003, 3, 2208-2220.

Fortier et al. también han revelado otro método (The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome, JEM, Vol. 205, N.º 3, 17 de marzo de 2008, 595-610). Este método tiene el inconveniente de que precisa distinguir entre los péptidos que se mantienen unidos al MHC de los no unidos debido a la elución ácida. Esto se lleva a cabo mediante estirpes celulares cuyo gen b2m ha sido desactivado: Por tanto, el método no es aplicable a material tumoral primario, extraído del paciente. En este método, se comparan timocitos primarios murinos con la estirpe de células de ratón EL4. Las cantidades de partida se ajustaron midiendo las moléculas MHC I. Solo esto ya supone una importante limitación del método de Fortier et al. Además, no se efectúa ninguna normalización, como exigirían los tejidos primarios de distintos tamaños y orígenes. En su lugar, se opta por materiales de partida equilibrados que hacen innecesaria la normalización. Pero dicha normalización es absolutamente imprescindible en el caso de los materiales primarios, extraídos del paciente.

WO2011/128448 da a conocer un método para identificar cuantitativamente antígenos peptídicos unidos a HLA que son relevantes a partir de especímenes de tejido primario a gran escala sin necesidad de recurrir a marcajes. El método comprende las etapas de conseguir al menos una muestra de tejido primario enfermo y otra muestra de tejido primario sano preferentemente de la misma naturaleza que el tejido enfermo, el aislamiento de los ligandos peptídicos del MHC de dichas muestras, la ejecución de un análisis por HPLC-EM con dichos ligandos peptídicos del MHC, la extracción de la intensidad de la señal (área) del ión padre de cada señal, derivada de los análisis, la identificación de las secuencias de dichos ligandos peptídicos del MHC y las etapas de normalización y de control de calidad de los datos con objeto de proceder a la cuantificación relativa de dichos ligandos sin recurrir al marcaje.

Hassan et al. (en: 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>) dan a conocer una estrategia basada en la preparación de complejos de péptidos marcados con isótopos –monómeros de MHC (hpMHC) que se añaden directamente tras la lisis celular, es decir, antes del procesamiento ordinario de la muestra. Con tal estrategia es posible conocer todas las pérdidas que se producen durante el procesamiento de la muestra y determinar con precisión los ligandos específicos presentados por las moléculas MHC de clase I. El estudio consigue señalar con precisión a la etapa de inmunopurificación como la culpable de las enormes pérdidas que se producen durante el pretratamiento de la muestra y ofrece una solución para contabilizar tales pérdidas. La estrategia presentada sirve para obtener una estimación fiable del número de copias del epítipo, por lo que se afirma que permite mejorar el diseño de las vacunas y las estrategias de inmunoterapia.

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores y de antígenos propios de enfermedades ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. En particular los linfocitos T CD8-positivos (T-CD8⁺), que reconocen los péptidos unidos a las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Tales péptidos, normalmente compuestos por entre 8 y 12 residuos de aminoácidos, proceden de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol y desempeñan un importante papel en dicha respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: moléculas del MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores MHC de clase II). Su conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I presentan péptidos procedentes de la proteólisis de proteínas predominantemente endógenas, DRIPS y péptidos grandes. Las moléculas MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan predominantemente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC mediante endocitosis y después procesadas por las mismas. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Para desencadenar la respuesta inmunitaria celular el péptido ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 12 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados («anclajes») en su secuencia que interaccionan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De ese modo, cada alelo MHC cuenta con un motivo de unión que controla la capacidad del péptido para encajar específicamente en la hendidura de unión.

En la reacción inmunitaria dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos por linfocitos T portadores de receptores TCR específicos.

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del

tumor, esto es, los epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están regulados al alza en las células del tumor correspondiente.

La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores o a enfermedades comprende los siguientes grupos principales:

Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA [antígenos asociados a tumores; los antígenos asociados a enfermedades se abrevian DAA] descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase, que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatoцитos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y, por tanto, se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.

Antígenos de diferenciación: Estos TAA están presentes tanto en los tumores como en el tejido normal del que deriva el tumor; la mayoría se encuentran en melanomas y en melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son, sin limitación, la tirosinasa y Melan-A/MART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.

TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente distintos y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítomos procesados y posiblemente presentados por los tejidos normales lo sean por debajo del límite necesario para ser reconocidos por los linfocitos T, pero que la sobreexpresión por parte de las células tumorales rompa la tolerancia vigente hasta ese momento y desencadene la respuesta antitumoral. Ejemplos destacados de esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

Antígenos específicos de tumor: Estos TAA únicos son fruto de mutaciones de

genes normales (como β -catenina, CDK4, etc.) Algunos de esos cambios moleculares están relacionados con la transformación neoplásica y/o su progresión. Los antígenos específicos de tumor generalmente son capaces de inducir potentes respuestas inmunitarias sin riesgo de reacciones autoinmunitarias contra los tejidos normales. Por otro lado, casi siempre estos TAA solo son relevantes para el tumor exacto en el que fueron identificados y normalmente no se encuentran en muchos otros tumores.

TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítomos nuevos en tumores, tal y como sucede con MUC1, o de fenómenos como el ajuste de proteínas durante la degradación, que en algunos casos pueden ser específicos de tumor.

Proteínas de oncovirus: Estos TAA son proteínas virales que podrían desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y que, como extrañas a causa de su origen no humano, pueden desencadenar una respuesta de los linfocitos T. Ejemplos de tales proteínas son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor o antígenos específicos o asociados a enfermedad y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerequisites. El antígeno debe expresarse mayormente en las células tumorales o en las células infectadas y nada o comparativamente poco en los tejidos sanos normales, por ejemplo, 5 o 10 veces menos, o menos.

En el caso de las enfermedades infecciosas existen dos posibilidades: la primera es que las células infectadas expresen un antígeno que no expresan las células sanas –directamente asociado con la infección- o bien que las primeras sobreexpresen un antígeno que las segundas expresan únicamente en cantidad ínfima –la sobreexpresión de un antígeno que en condiciones normales forma parte del peptidoma de la célula sana.

Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, infección o cepa patógena, sino que lo esté también en altas concentraciones (es decir: número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor y los antígenos específicos de enfermedad y asociados a enfermedad proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral o en una infectada a causa de su función, por ejemplo: porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis.

En el caso del cáncer, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a tumores también pueden ser dianas en una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor o asociado a enfermedad debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula del MHC puede actuar como un epítomo de linfocito T. Un prerequisite para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia inmunitaria hacia ese epítomo en particular.

Por consiguiente, los TAA y los DAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA y los DAA están basados en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales.

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados

selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítomos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítomo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar sólo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que, tras la estimulación con un antígeno específico, puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo T_{H1} apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítomos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T colaboradores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

Conocer con precisión el número de copias de ligandos que son presentadas por las moléculas HLA de clase I o II es importante en la inmunología básica y clínica. En la actualidad, las mejores determinaciones del número de copias se logran con la espectrometría de masas, mediante el modo de monitorización selectiva de reacción (SRM, por sus siglas en inglés) combinado con una cantidad conocida de péptido marcado con un isótopo. Pese a ello, el método carece de la precisión necesaria para ser empleado de manera eficaz con los fines antes señalados.

A la vista de todo lo anterior, el objeto de la presente invención consiste en

proporcionar un método destinado a la determinación absoluta del número de copias de los ligandos presentados por HLA de clase I o II que sea preciso, eficaz, de fácil uso y que posibilite el análisis de gran capacidad (*high-throughput*). Otros objetos y ventajas de la presente invención se harán evidentes para toda persona versada en la materia que estudie la descripción facilitada a continuación.

En un primer aspecto de la presente invención, el objeto de la invención se resuelve mediante un método destinado a:

la cuantificación absoluta de al menos un ligando peptídico del MHC radicado sobre una célula, en que dicho método comprende

- a) preparación de las células que presenten, como mínimo, un ligando peptídico del MHC a partir de una muestra biológica que contenga células
 - b) determinación del número de células en la citada preparación resultante de la etapa a)
 - c) adición de una cantidad conocida de al menos el citado ligando peptídico-MHC y/o el complejo de ligando peptídico-MHC que se pretende cuantificar resultante de la citada preparación de la etapa a) ("1.º enriquecimiento")
 - d) aislamiento de al menos un ligando peptídico del MHC resultante de la citada preparación de la etapa c) con el fin de obtener un eluato de péptido,
 - e) adición de una cantidad conocida de al menos un ligando peptídico de MHC que se pretende cuantificar al citado eluato de péptido ("2.º enriquecimiento")
 - f) ejecución de un análisis por espectrometría de masas con al menos dicho ligando peptídico del MHC con el fin de generar al menos una
 - aa) señal para determinar la eficiencia del aislamiento efectuado en la etapa d)
 - bb) señal acerca de la cantidad conocida de dicho ligando peptídico del MHC que, como mínimo, se ha añadido en la etapa e), y
 - cc) señal correspondiente a, como mínimo, dicho ligando peptídico del MHC procedente de las células preparadas en la etapa a),
- y
- g) cuantificación de, al menos, el citado ligando peptídico del MHC basada en la comparación de las señales obtenidas en la etapa f) con:
 - aa) el recuento de células obtenido
 - bb) la cantidad conocida de, al menos, dicho ligando peptídico-MHC y/o complejo de ligando peptídico-MHC que se pretende cuantificar y que ha sido añadida en la

etapa c), y

cc) la cantidad conocida de, al menos, un ligando peptídico del MHC que se pretende cuantificar y que ha sido añadida en la etapa e), y

mediante el cual se consigue, al menos en parte, la cuantificación absoluta de al menos un ligando peptídico del MHC mostrado por la célula.

En un método acorde con la presente invención en el que se analizan en paralelo varias muestras, la susodicha etapa c) puede ser omitida una vez que se haya establecido la eficiencia del aislamiento, puesto que la eficiencia obtenida con una muestra permite estimar la eficiencia que se conseguirá con el segundo ligando peptídico del MHC y/o complejo de ligando peptídico-MHC (es decir, se puede usar como un valor de referencia).

Se prefiere un método que, además, use la señal obtenida en la calibración interna (2.º enriquecimiento) efectuada en la etapa e) como constante y la referencia conservada (control) correspondiente a la señal obtenida procedente de como mínimo un ligando peptídico del MHC aislado para el cálculo de la razón entre ambas señales. Esta razón se comparará con la curva de calibración establecida, que también incluirá el calibrador interno en la misma precisa cantidad, preferentemente mediante una alícuota idéntica a la del calibrador interno. La curva de calibración describirá así la relación entre ambas razones y las cantidades del péptido. Véase también la Figura 3 y su leyenda.

Sorprendentemente, en el contexto de la presente invención los inventores descubrieron que al combinar las etapas analíticas indicadas era posible, por primera vez, la cuantificación absoluta *directa* de los niveles del péptido ligado al MHC, preferentemente restringido a HLA, en tejidos cancerosos y en otros tejidos infectados comparándolos con otros tejidos y órganos no cancerosos o no infectados.

En el contexto de la presente invención, «enriquecimiento» se refiere a la adición de una cantidad o concentración conocidas de, por ejemplo, al menos un ligando peptídico de MHC no unido («libre») conocido que se pretende cuantificar en una muestra, como, por ejemplo, una preparación (aquí designada como «1.^{er}

enriquecimiento») o un eluato de péptido (aquí designado como «2.º enriquecimiento»). Las cantidades o concentraciones de péptido o péptidos que se han de añadir se pueden ajustar fácilmente y dependen, al menos en parte, de la muestra que se va a enriquecer y del método utilizado para el análisis.

Se prefiere un método acorde con la presente invención, en el que se selecciona al menos un ligando peptídico de MHC procedente de un péptido asociado a tumor (TAA) o de un péptido asociado a enfermedad (DAA).

Se prefiere aún más un método acorde con la presente invención en que la citada muestra biológica que contiene células se selecciona entre una muestra de tejido, una muestra de sangre, una muestra de tumor o una muestra de tejido infectado. En el ámbito de la presente invención las muestras que proceden directamente de individuos, como pacientes, se denominan muestras «primarias», como, por ejemplo, muestras primarias de tejido o de tumor, en contraste con las muestras de estirpes celulares, como, por ejemplo, de estirpes consolidadas de células tumorales. Las muestras pueden ser recientes o conservadas (p. ej., congeladas o preparadas), siempre que sean adecuadas para el método acorde con la invención. Se prefiere una muestra biológica que no incluya estirpes celulares permanentes.

A modo de ejemplo preferido, se pueden obtener conjuntos de péptidos HLA a partir de muestras de tejido (primarias) conservadas por congelación rápida mediante la inmunoprecipitación de tejidos sólidos con, por ejemplo, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C w6/32 o el anticuerpo específico del HLA-A*02 BB7.2 acoplado con sefarosa activada con CNBr, seguido de tratamiento ácido y ultrafiltración. Para otros alelos HLA se pueden usar otros anticuerpos específicos conocidos en la técnica, como, por ejemplo, el GAP-A3 para el alelo A*03 o el B1.23.2 para los alelos B. En la técnica también se conocen perfectamente los métodos necesarios para obtener los péptidos ligados a MHC de clase I en otros mamíferos.

El método acorde con la invención también resulta útil en el ámbito de las enfermedades infecciosas, como las infecciones víricas o bacterianas, por ejemplo, el dengue, el ébola, el virus de Marburg, la tuberculosis (TB), meningitis o sífilis; preferentemente el método se usa con cepas de bacterias infecciosas que son

resistentes a los antibióticos, o con enfermedades autoinmunitarias como, por ejemplo, la artritis, o parasitosis como, por ejemplo, el paludismo, y otras enfermedades como la esclerosis múltiple y el párkinson, siempre que la molécula diana sea un péptido unido a MHC de clase I.

Algunos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias (incluidas enfermedades que no han sido declaradas oficialmente como tales) son: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn (uno de los dos tipos de la enfermedad inflamatoria intestinal idiopática, «EII»), dermatomiositis, diabetes mellitus de tipo 1, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, enfermedad de Kawasaki, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, lupus eritematoso, enfermedad mixta del tejido conectivo, morfea, miastenia grave, narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, polimiositis, cirrosis biliar primaria, policondritis recidivante, artritis reumatoide, esquizofrenia, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, arteritis de la temporal (arteritis de células gigantes), colitis ulcerosa (uno de los dos tipos de la enfermedad inflamatoria intestinal idiopática, «EII»), vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

La presente invención no se limita a enfermedades humanas, sino que también es aplicable a otros mamíferos, como, por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, roedores como la rata o el ratón, la cabra y otros animales domésticos.

En otra forma de realización preferida del método acorde con la presente invención, la preparación de las células comprende, al menos en parte, la digestión enzimática de los tejidos y/o la lisis celular.

Se prefiere un método acorde con la presente invención, en que el citado recuento celular se efectúe con un método seleccionado entre el recuento de los núcleos celulares, fotometría del ADN, fluorometría del ADN (como por ejemplo, el uso de la tecnología Qubit®) o PCR cuantitativa.

Se prefiere aún más un método acorde con la presente invención, que además

comprende la determinación de la cantidad de al menos un tipo de molécula HLA en la citada preparación de la etapa a). La determinación de la cantidad se puede realizar con métodos habituales conocidos en la disciplina, como aquellos que implican el uso de anticuerpos específicos, por ejemplo: ELISA, geles, citometría y/o cromatografía.

Se prefiere aún más un método acorde con la presente invención, en el que el complejo de péptido-MHC y/o el ligando peptídico de MHC que como mínimo se añaden están marcados, y preferentemente marcados diferencialmente. Los marcajes respectivos son conocidos por las personas versadas en la técnica, e incluyen marcadores isotópicos, marcadores radioactivos y no radioactivos, enzimas y otros grupos de masas preferentemente distintas. Preferentemente, el marcaje será específico para los péptidos concretos que se pretende cuantificar. Se prefiere ante todo un TAA/TUMAP doblemente marcado, por ejemplo, en aquellas situaciones en que en un mismo experimento se precisen dos enriquecimientos con marcaje diferencial (véanse ejemplos más adelante).

Se prefiere un método acorde con la presente invención, en que el aislamiento comprende la cromatografía, como la cromatografía de afinidad. Así pues, los ligandos de MHC/HLA aislados se pueden separar en virtud de su hidrofobicidad mediante la cromatografía en fase inversa (p. ej., sistema nanoAcquity UPLC, Waters) seguida de la detección en un sistema híbrido de espectrómetro de masas con Orbitrap (ThermoElectron). Cada muestra se analiza preferentemente mediante la adquisición de análisis repetidos por CL-EM, por ejemplo. A continuación, los datos resultantes de la CL-EM se procesan analizándolos en un espectrómetro de masas en tándem (EM-EM).

Es preferible que los espectros de la EM en tándem registrados de modo dirigido y centrados en los valores m/z de los péptidos que se van a cuantificar sean evaluados mediante un software que extraiga las intensidades de los iones fragmento preseleccionados de las transiciones predefinidas. Un ejemplo de ese tipo de software es 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>), una aplicación que

analiza los datos del espectrómetro de masas generados en experimentos de adquisición independiente de datos (DIA) para la monitorización en paralelo de reacciones (PRM – EM en tándem dirigida). Este software se puede aplicar usando como referencia el péptido marcado isotópicamente que eluye conjuntamente con fines de especificidad, así como para extraer las intensidades de las transiciones únicas para seguir con el procesamiento.

Es posible comparar grupos peptídicos restringidos al mismo alelo HLA en muestras distintas si durante la purificación se usa el mismo anticuerpo específico de alelo, o alternativamente, si a cada alelo HLA en común se le asigna una secuencia a partir de los patrones de los aminoácidos de anclaje.

Por razones de carácter estadístico es preferible un método acorde con la presente invención en el que se ejecuten como mínimo dos análisis duplicados del espectrómetro de masas de cada uno de los ligandos peptídicos del MHC.

Así pues, otro aspecto más de la presente invención se refiere a un método acorde con la presente invención, que además comprende la selección para el análisis de ligandos peptídicos del MHC que aparezcan sobrerrepresentados, sobreexpresados o que sean específicos de tumor.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un método acorde con la presente invención, en que dicho método puede ser efectuado o se efectúa con técnicas analíticas de alta capacidad (*high-throughput*), preferentemente con el análisis en paralelo de entre 50 y 100 ligandos peptídicos.

En otra forma más de realización preferida del método acorde con la presente invención, las etapas de dicho método se efectúan en el orden indicado en las reivindicaciones adjuntas, o como se ha indicado antes. En otra forma más de realización preferida del método acorde con la presente invención dicho método consiste en las etapas indicadas previamente en la presente memoria.

En otro aspecto preferido del método acorde con la presente invención, dicho método se refiere al diagnóstico y al tratamiento personalizados. Por ello, la muestra

o muestras analizadas proceden de un individuo o de un grupo de individuos aquejados por la misma enfermedad, tal y como se describe en la presente memoria. Asimismo, el método acorde con la presente invención que se describe en la presente memoria permite generar un perfil personalizado de ligandos del MHC, preferentemente un perfil personalizado y cuantificado de ligandos del MHC específicos de una enfermedad que está basado en los citados ligandos peptídicos del MHC cuantificados.

Preferido ante todo es que el método acorde con la presente invención se efectúe en condiciones *in vitro*.

En otro aspecto más preferido del método acorde con la presente invención, dicho método comprende, además, la etapa de sintetizar, preferiblemente mediante síntesis química en un sintetizador automático o manualmente, el citado ligando peptídico del MHC que, como mínimo, se va a cuantificar con dicho método. Otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar un péptido inmunorreactivo con el que se cuantifica un péptido acorde con el método dado a conocer, y dicho péptido se sintetiza químicamente, en condiciones *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos se pueden preparar mediante la concatenación de aminoácidos a través de enlaces químicos con los métodos convencionales conocidos en la técnica.

Los péptidos se pueden preparar *in vitro*, por ejemplo, en sistemas sin células, o *in vivo* con células. Los péptidos se pueden formular tal y como se describe, por ejemplo, en la patente EP2111867 de Lewandrowski et al.

Otro aspecto más se refiere al método acorde con la invención, en que se efectúa una etapa adicional, en el cual se detecta la presencia de linfocitos T. Con este método es posible detectar concretamente hasta qué punto el paciente dispone de antemano de linfocitos T dirigidos contra los péptidos aislados e identificados. Con esta etapa es posible administrar como vacuna únicamente aquellos péptidos contra los que el paciente ya posea de antemano linfocitos T. Los péptidos servirán, pues, para activar específicamente esos linfocitos T.

Otro aspecto más se refiere al método acorde con la invención, en el que la detección de los linfocitos T específicos que están presentes de antemano se realiza marcando los leucocitos con complejos reconstituidos formados por las moléculas presentadoras de antígenos y el péptido antigénico.

En otra forma más de realización preferida del método acorde con la presente invención, dicho método excluye, además, el uso de células, estirpes celulares o animales portadores de genes inactivados (*knock-out*).

Otra etapa opcional preferida de la presente invención consiste en el control de calidad automático por medio de moléculas con las que se enriquecen las muestras en cantidades definidas.

Con el método acorde con la invención es posible, además, identificar los péptidos específicos del paciente, esto es, seleccionar con precisión los péptidos que estimularán una respuesta inmunitaria específica en el paciente y que formarán parte de la vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere, además, a una composición farmacéutica que comprende cantidades definidas de uno o más péptidos TAA y/o DAA que han sido cuantificados con el método acorde con la invención.

La composición se puede administrar, por ejemplo, por vía parenteral, es decir, por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, entre otras, o por vía oral, dependiendo de la formulación y de la enfermedad que se va a tratar. Para tal fin, los péptidos se disuelven o se mantienen en suspensión en un vehículo farmacéutico aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso; además, la composición puede comprender aditivos, por ejemplo: amortiguadores de pH, aglutinantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como, por ejemplo, citocinas.

Según un aspecto de la invención, los péptidos pueden servir para el tratamiento de enfermedades tumorales y para preparar un medicamento destinado al tratamiento

de ese tipo de enfermedades. Las enfermedades tumorales tratables comprenden tumores sólidos, como cánceres de riñón, mama, páncreas, estómago, testículo o piel, o cánceres hematológicos, como la leucemia mieloide aguda. Esta lista de enfermedades tumorales solo se ofrece a título de ejemplo y no pretender limitar el ámbito de la aplicación.

Los péptidos pueden servir, además, para evaluar el curso del tratamiento de la enfermedad tumoral.

Los péptidos también pueden servir para supervisar un tratamiento en otras vacunaciones o terapias. Así pues, el péptido no solo tiene utilidades terapéuticas sino también diagnósticas.

Otro aspecto más de la invención se refiere al uso de los péptidos como los cuantificados para la generación de un anticuerpo. De modo general, se pueden obtener anticuerpos policlonales mediante la inmunización de animales por medio de la inyección de los péptidos y la posterior purificación de las inmunoglobulinas. Se pueden crear anticuerpos monoclonales siguiendo protocolos estandarizados conocidos en la técnica.

La presente invención reviste particular relevancia para las estrategias basadas en anticuerpos, puesto que el número de copias de la molécula diana sobre la superficie de la célula diana determina y/o refleja si dicha diana es abordable por un anticuerpo y, de ser así, qué funciones efectoras se pueden usar, como, por ejemplo: medicamentos conjugados, toxinas o anticuerpos biespecíficos que reclutan a los linfocitos T o a otras células efectoras. Otros aspectos se refieren al uso en el contexto de las llamadas moléculas formadoras de estructuras de soporte (*scaffolding*), como los aptámeros (moléculas de péptidos o de ácidos oligonucleicos que se unen a la diana) y/o los receptores de linfocitos T solubles (sTCR). Aquí de nuevo, de modo similar a lo que sucede con los anticuerpos, el número de copias determina aproximadamente la afinidad y las funciones efectoras requeridas para dichas moléculas estructurales.

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos

que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar los mecanismos de defensa humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 12 residuos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas y presentan péptidos derivados de la escisión proteolítica principalmente de proteínas endógenas, citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerequisites. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, deben serlo en cantidades comparativamente pequeñas. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (es decir, número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo

de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una célula tumoral a causa de su función, por ejemplo, porque intervienen en el control del ciclo celular o en la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden servir como dianas para una estrategia de vacunación. En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor o a enfermedad debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítomo de linfocito T. Un prerequisite para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia inmunitaria hacia ese epítomo en particular. Por consiguiente, los TAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados, entre otros, en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales (Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27). No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítomos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítomo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar sólo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

A la luz de los efectos secundarios graves y el coste económico que supone el tratamiento contra el cáncer es evidente la urgente necesidad de mejora de los métodos diagnósticos y pronósticos.

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, aunque también hasta 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos de longitud.

El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantenga el epítipo o epítipos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 14, aproximadamente.

El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantengan los epítipos adecuados. En contraste con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a las moléculas de más de unos 30 residuos de aminoácidos de longitud.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es «inmunogénico» (y, por lo tanto, un «inmunógeno» en la presente invención), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En el caso de la presente invención, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para desatar una respuesta por parte de los linfocitos T. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T.

Un «epítipo» de linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor

MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que pueda ser reconocido por un linfocito T provisto de un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos.

En la presente descripción, la invención se describe tomando el cáncer como ejemplo. No obstante, el método de la invención también es aplicable a las enfermedades infecciosas, las enfermedades autoinmunitarias y las infecciones parasitarias, siempre que la respuesta inmunitaria pertinente sea una respuesta en la que intervenga el MHC de clase I.

A continuación, la invención pasará a ser descrita con los ejemplos siguientes, sin que con ello se quiera limitar el alcance de sus aplicaciones en las Figuras y en la Lista de secuencias que se adjuntan.

La Figura 1 muestra un esquema general sobre de la estrategia experimental según la presente invención.

La Figura 2 ofrece un análisis comparativo por EM de una mezcla de TUMAP con 10 fmol/TUMAP de los que figuran en la Tabla 1. Cada péptido genera una señal de EM diferente que muestra la detectabilidad dependiente del péptido. El péptido 5 no figura en la Tabla 1, por lo que las secuencias 1-4 de la Tabla 1 corresponden a los N.º 1 a 4 de la Figura 2, y las secuencias 5 a 11 de dicha tabla corresponden a los N.º 6 a 12 de la citada figura.

Asimismo, los péptidos 19, 21 y 22 de la Figura 2 no aparecen reflejados en la Tabla 2, es decir, las secuencias 13 a 18 de la citada figura corresponden a los N.º 12 a 17 de la citada tabla, la secuencia 20 de la Figura 2 corresponde a la N.º 18 de la Tabla 2, y las secuencias 23 a 28 de la figura corresponden a los N.º 19 a 24 de la tabla.

La Figura 3 expone el principio del método basado en el patrón interno. Es una curva de calibración que se traza a partir de la titulación de una versión del TUMAP

marcada con un isótopo (mostrada en gris claro). En todas las mediciones con el espectrómetro de masas (EM), las muestras de EM se enriquecen con una cantidad constante de otra versión marcada isotópicamente del péptido TUMAP que actúa como un patrón interno (en gris oscuro). A partir de la razón o cociente (*ratio*) entre las señales de EM se calcula la función de la curva de calibración mediante una regresión logística. El límite inferior de cuantificación (LIC) se define por examen visual y teniendo en cuenta la desviación con respecto a la linealidad. Las «muestras de cuantificación» (mostradas en verde) representan las intensidades de la señal medidas en las muestras tumorales seleccionadas para la cuantificación absoluta del número de TUMAP.

La Figura 4 expone las curvas de calibración de los TUMAP del alelo HLA-A*02 seleccionados para su cuantificación absoluta. En cada gráfica figuran los resultados de EM correspondientes a los TUMAP hallados en las muestras de tejido tumoral que fueron seleccionados para el análisis de su número absoluto por célula (“muestras de cuantificación”).

La Figura 5 expone más curvas de calibración de los TUMAP del alelo HLA-A*02 seleccionados para su cuantificación absoluta. En cada gráfica figuran los resultados de EM correspondientes a los TUMAP hallados en las muestras de tejido tumoral que fueron seleccionados para el análisis de su número absoluto por célula (“muestras de cuantificación”).

La Figura 6 muestra las curvas de calibración correspondientes a los TUMAP del alelo HLA-A*24 seleccionados para su cuantificación absoluta. En cada gráfica figuran los resultados de EM correspondientes a los TUMAP hallados en las muestras de tejido tumoral que fueron seleccionados para el análisis de su número absoluto por célula (“muestras de cuantificación”).

La Figura 7 expone más curvas de calibración de los TUMAP del alelo HLA-A*24 seleccionados para su cuantificación absoluta. En cada gráfica figuran los resultados de EM correspondientes a los TUMAP hallados en las muestras de tejido tumoral que fueron seleccionados para el análisis de su número absoluto por célula (“muestras de cuantificación”).

La Figura 8 muestra la variación estimada de las mediciones repetidas (réplicas) por EM correspondiente a todos los TUMAP analizados. Cada punto representa el coeficiente de variación (CV, en %) correspondiente a las réplicas de EM de cada TUMAP en una muestra de tejido concreta. La mediana de los CV con respecto al total de los TUMAP se considera la variación media de las series de análisis repetidos de la EM.

La Figura 9 muestra la eficiencia del aislamiento del péptido-MHC. La eficiencia del aislamiento del péptido-MHC se determinó en ocho muestras positivas para A*02 en el caso de los TUMAP de A*02 (A), y en seis muestras positivas para A*24 en el de los TUMAP de A*24 (B). La eficiencia del aislamiento varía en promedio un 24% en los TUMAP A*02 y un 32% en el de los TUMAP A*24 (C).

La Figura 10 muestra los métodos empleados para la evaluación del análisis del contenido de ADN. A. Comparación de los tres métodos usados para extrapolar el número de células a partir de una cantidad dada de ADN, a saber: curva patrón trazada a partir de estirpes de células tumorales (gris oscuro), curva patrón trazada a partir de PBMC de donantes sanos (gris), y por último, mediante la ponderación teórica de un genoma diploide humano (gris claro). Las réplicas biológicas, es decir, las preparaciones independientes de lisado tisular procedentes de piezas distintas del mismo tumor, se muestran resaltadas en gris. B. Gráfica de la curva patrón trazada con PBMC, usada para determinar el recuento total de células presente en las muestras de tejido analizadas para la cuantificación absoluta de los TUMAP.

La Figura 11 muestra la determinación del número de células presente en muestras congeladas de tejido sólido. (A) Análisis del recuento celular de las muestras tumorales positivas para A*02 y A*24; (B) variación estimada de dicho análisis de recuento. Las réplicas biológicas aparecen resaltadas en gris.

La Figura 12 expone los resultados de las copias del péptido por célula correspondientes a péptidos TUMAP del alelo HLA-A*02. Se analizaron ocho tumores distintos de cáncer gástrico, tres de ellos por duplicado (los duplicados biológicos se muestran agrupados y resaltados en gris). El LIC se refiere al intervalo

de cuantificación en un experimento de EM que se extrapola a un LIC específico del TUMAP y de la muestra, es decir, el número de copias más bajo de un TUMAP concreto que es cuantificable en una muestra concreta (mostrado en gris).

La Figura 13 muestra resultados adicionales de las copias del péptido por célula correspondientes a péptidos TUMAP del alelo HLA-A*02. Se analizaron ocho tumores distintos de cáncer gástrico, tres de ellos por duplicado (los duplicados biológicos se muestran agrupados y resaltados en gris). El LIC se refiere al intervalo de cuantificación en un experimento de EM que se extrapola a un LIC específico del TUMAP y de la muestra, es decir, el número de copias más bajo de un TUMAP concreto que es cuantificable en una muestra concreta (mostrado en gris).

La Figura 14 muestra los resultados de las copias del péptido por célula correspondientes a péptidos TUMAP del alelo HLA-A*24. Se analizaron seis tumores distintos de cáncer gástrico, tres de ellos por duplicado (los duplicados biológicos se muestran agrupados y resaltados en gris). El LIC se refiere al intervalo de cuantificación en un experimento de EM que se extrapola a un LIC específico del TUMAP y de la muestra, es decir, el número de copias más bajo de un TUMAP concreto que es cuantificable en una muestra concreta (mostrado en gris).

La Figura 15 muestra resultados adicionales de las copias del péptido por célula correspondientes a péptidos TUMAP del alelo HLA-A*24. Se analizaron seis tumores distintos de cáncer gástrico, tres de ellos por duplicado (los duplicados biológicos se muestran agrupados y resaltados en gris). El LIC se refiere al intervalo de cuantificación en un experimento de EM que se extrapola a un LIC específico del TUMAP y de la muestra, es decir, el número de copias más bajo de un TUMAP concreto que es cuantificable en una muestra concreta (mostrado en gris).

La Figura 16 muestra el análisis de la influencia del enriquecimiento de las muestras con 500 fmol de péptidos libres en la preparación del monómero de MHC-péptido. Tal y como aparece indicado, la presencia del péptido libre en el análisis no influye sustancialmente en los péptidos.

La Figura 17 muestra los resultados de las pruebas correspondientes a la

reproducibilidad del aislamiento del ADN mediante HS Qubit (fluorescencia) en comparación con una curva patrón. Las muestras (de cáncer, como cáncer de pulmón amicrocítico) exhiben una homogeneidad suficiente. El ADN se aisló de 3 alícuotas x 50 µl.

Las SEQ ID N.º 1 a 24 muestran los péptidos de las tablas 1 y 2 que fueron seleccionados para su cuantificación absoluta, tal y como se expone en los ejemplos.

Ejemplos:

Los ejemplos siguientes describen el método de la invención en el contexto de los TAA y del cáncer. La invención no se limita a los ejemplos, pues estos solo son una forma de realización preferida de la invención. A efectos de la presente invención, todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su integridad.

Tabla 1: TUMAP de HLA-A*02 seleccionados para su cuantificación absoluta

Se escogieron once péptidos para proceder a su cuantificación absoluta.

N.º	Código del péptido	Secuencia
1	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
2	FAP-003	YVYQNNIYL
3	COL12A1-002	FLVDGSWSV
4	MXRA5-001	TLSSIKVEV
5	NCAPG-001	YLLSYIQSI
6	COL6A3-002	FLLDGSANV
7	WNT5A-001	AMSSKFFLV
8	F2R-001	TLDPRSFL
9	HIF1A-001	ALDGFVMVL
10	MET-001	YVDPVITSI
11	CCNB1-002	ILIDWLQV

Tabla 2: TUMAP de HLA-A*24 seleccionados para su cuantificación absoluta

Se escogieron catorce péptidos para proceder a su cuantificación absoluta. Las

propiedades de uno de los péptidos (PLJ4-001) resultaron inadecuadas para proseguir con los experimentos. Los experimentos de cuantificación absoluta de los 13 péptidos restantes sí se completaron con éxito.

N.º	Código del péptido	Secuencia
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	NYLPPFIMEL
24	UQCRB-001	YYNAAGFNKL

La cuantificación de las copias de TUMAP por célula en muestras de tumores sólidos exige la (sub)cuantificación de:

- a) El TUMAP aislado
- b) La pérdida del TUMAP acaecida durante el aislamiento
- c) El recuento de las células presentes en la muestra de tejido analizada

La Figura 1 ofrece una visión general de la metodología experimental acorde con la presente invención.

Cuantificación del péptido mediante nanoCL-EM/EM

Para lograr la cuantificación precisa de los péptidos por medio de la espectrometría de masas (EM), antes que nada es preciso disponer de un conocimiento básico acerca de la correlación específica del péptido que existe entre la cantidad de péptido y la señal suministrada por el espectrómetro de masas. Como ejemplo, la medición por EM de una mezcla de péptidos compuesta por 10 fmol de cada péptido

revela grandes diferencias específicas de cada péptido en cuanto a su señal de EM (Figura 2). Esto también implica que el intervalo a lo largo del cual cada péptido puede ser cuantificado con fiabilidad por la EM depende de las características propias de cada péptido.

Asimismo, cabe esperar que la correlación entre la cantidad de cada péptido concreto y la señal suministrada por la EM solo sea lineal dentro de un cierto intervalo. Así pues, los inventores decidieron trazar una curva de calibración individual para cada péptido. El intervalo escogido para cada curva de calibración no solo refleja el intervalo de cuantificación propio de cada péptido, sino también el intervalo de señales de EM de cada péptido en muestras tumorales que han sido analizadas previamente. El objetivo era que cada curva de calibración comprendiera el intervalo de señal de EM específico del péptido de al menos el 80% de nuestro conjunto de muestras ordinarias.

Para que las curvas de calibración obtenidas sean exactas es preciso contar con un patrón sintético, que ha de ser cuantificado con un método independiente pero tener las mismas características que el TUMAP natural. Los inventores usaron versiones de los TUMAP con doble marcaje isotópico, es decir, que durante la síntesis de estos TUMAP se añadieron aminoácidos marcados con dos isótopos. Las versiones con marcaje doble se pueden distinguir del TUMAP natural en virtud de una diferencia de masa de 12 a 18 daltons dependiendo del aminoácido que esté marcado. Aparte de la masa, el marcaje isotópico no altera las propiedades del péptido en la EM, es decir, los péptidos provistos de la misma secuencia pero con marcajes isotópicos distintos generan idénticas intensidades de la señal de EM (Anderson et al., 2012). Concluida la síntesis, los TUMAP con doble marcaje fueron cuantificados con precisión mediante el análisis del nitrógeno para obtener así una correlación exacta entre la cantidad de péptido y la señal de EM.

Las curvas de calibración se prepararon como mínimo en tres matrices distintas, a saber, eluatos de péptidos de HLA procedentes de muestras naturales similares a las muestras de EM ordinarias, y cada preparación se sometió a análisis de EM por duplicado. A fin de compensar cualquier variación técnica acaecida en los sucesivos análisis de EM, en todas las mediciones se incluyó un péptido que actuó como

patrón interno. A continuación, se representó gráficamente la razón resultante de la señal de EM del péptido titulado con respecto a la del patrón interno fijo y se calculó la curva de calibración con la regresión logística (Figura 3). El límite inferior de cuantificación (LIC) se determinó visualmente teniendo en cuenta la desviación con respecto a la linealidad. En el supuesto de que la desviación con respecto a la linealidad no resultara evidente, como sucedió en el caso del péptido FAP-003 (Figura 4), el cálculo del LIC se hizo con la razón media de la cantidad más baja de péptido. El límite superior de cuantificación, es decir, la desviación con respecto a la linealidad a las concentraciones más altas, no se alcanzó en ninguna de las curvas de calibración.

En los experimentos de cuantificación reales, se añadió a cada muestra la misma cantidad de patrón interno que la utilizada para trazar la curva de calibración, y se calculó la razón del péptido natural con respecto al péptido usado como patrón interno. Este «método del patrón interno» es habitual en la cuantificación de proteínas mediante EM, p. ej., en el análisis de biomarcadores en muestras biológicas (Sturm et al., 2012; Prasad and Unadkat, 2014; Sato et al., 2012). Las curvas de calibración y los valores medidos en las muestras tumorales reales se muestran en las Figuras 4 y 5 en el caso del alelo HLA-A*02 y en las Figuras 6 y 7 en el del HLA-A*24 para todos los TUMAP escogidos para su cuantificación absoluta.

Con el objeto de estimar la variación de las mediciones cuantitativas con la EM, se calculó el coeficiente de variación (CV en %) del contenido de péptido de cada muestra de EM. Se representaron gráficamente los CV correspondientes a cada muestra de EM y se estimó la variación total de las mediciones de EM en forma de la mediana del CV (Figura 8).

Eficiencia del aislamiento de los complejos de péptido-MHC

Como en todo proceso de purificación de proteínas, el aislamiento de las proteínas a partir de las muestras de tejido conlleva cierta pérdida de la proteína de interés. Para determinar la eficiencia en el aislamiento de los TUMAP, se crearon complejos de péptido-MHC de todos los TUMAP que habían sido seleccionados para su cuantificación absoluta. A fin de poder distinguir entre los complejos aportados por el

enriquecimiento deliberado y los complejos naturales de péptido-MHC se usaron versiones de los TUMAP marcadas con un solo isótopo, es decir, durante la síntesis de estos TUMAP se introdujo un aminoácido marcado con un solo isótopo. Estos complejos se vertieron en lisados tisulares recién preparados (enriquecimiento), es decir, en cuanto fue posible a lo largo del procedimiento de aislamiento de los TUMAP, y después se capturaron del mismo modo que los complejos naturales de péptido-MHC con el subsiguiente proceso de purificación por afinidad. Así pues, medir la recuperación de los TUMAP provistos de un solo marcador permite extraer conclusiones acerca de la eficiencia del aislamiento de los diferentes TUMAP naturales.

La eficiencia del aislamiento se determinó en 13 muestras que habían sido seleccionadas para someterlas a la cuantificación absoluta de los TUMAP (7 positivas para el HLA-A*02, 5 positivas para el HLA-A*24 y 1 muestra doblemente positiva para el HLA-A*02 y el A*24). Para determinar la eficiencia del aislamiento de los TUMAP A*02 se analizaron ocho muestras positivas para A*02 y, en el caso de los TUMAP A*24, se emplearon seis muestras positivas para este último alelo (Figura 9 A, B). Los resultados apuntan a que la eficiencia del aislamiento de la mayoría de los péptidos resulta comparable en las diferentes muestras de tejido. En cambio, la eficiencia del aislamiento difiere entre los diversos péptidos. Este hecho sugiere que la eficiencia del aislamiento, si bien ha sido determinada con un pequeño número de muestras de tejido, se puede extrapolar a cualquier otra preparación de tejido. Con todo, es necesario analizar individualmente cada TUMAP puesto que la eficiencia de aislamiento podría no ser extrapolable de un péptido a otros.

En contados casos la eficiencia del aislamiento resulta absurdamente alta o varía enormemente, como, p. ej.: en el caso del péptido NCAPG-001 (Figura 9 A). En aquellos casos en que no se pudo determinar la eficiencia, p. ej.: a causa de dificultades con la cuantificación atribuibles al péptido (p. ej.: el LIC alto de los péptidos CCNB1-002 y ASPM-001) o porque la eficiencia calculada superó el 100%, los inventores supusieron una eficiencia del aislamiento del 100%. Se trata de un criterio conservador que seguramente sobreestima la eficiencia del aislamiento, con lo que en definitiva se subestima el número de copias del péptido por célula.

Para estimar la variación de la eficiencia en el aislamiento de los TUMAP, se representó gráficamente el coeficiente de variación (CV en %) correspondiente al aislamiento de cada TUMAP en 6 a 8 muestras (Figura 9 C). En total, la variación media correspondiente a los TUMAP del A*02 asciende al 24% y la de los TUMAP del A*24 al 32%.

Determinación del recuento de células en tejido sólido congelado

Otro factor crítico a la hora de calcular el número de copias de un péptido por célula lo constituye la estimación del número total de células presentes en las muestras de tejido usadas para el aislamiento de los TUMAP. Los inventores decidieron recurrir al análisis del contenido de ADN, puesto que es un método aplicable a una amplia gama de muestras de origen diverso y, más importante aún, a muestras congeladas (Forsey and Chaudhuri, 2009; Alcoser et al., 2011; Alcoser et al., 2011; Silva et al., 2013).

Teniendo en cuenta la heterogeneidad intratumoral, es necesario determinar el número de células de una fracción del tejido que sea representativa de la muestra entera de tejido tomada para el aislamiento de los TUMAP. El lisado de tejido preparado durante el aislamiento de los TUMAP constituye una muestra adecuada para el análisis del ADN, puesto que es más homogéneo que una fracción del tejido sólido. Tras el aislamiento del ADN se procede a cuantificar la concentración total de ADN con un ensayo de fluorescencia (Life Technologies, Qubit HS DNA Assay) y se calcula el contenido total de ADN de las muestras.

En su cálculo del número de células a partir de una cantidad dada de ADN, los inventores emplearon dos métodos distintos: En el primero, el número de células se puede calcular usando la masa teórica del genoma humano, que ha sido estimada en alrededor de 6,67 pg de ADN por genoma diploide (Alcoser et al., 2011; Konigshoff et al., 2003). La otra alternativa consiste en usar muestras que alberguen un número conocido de células para trazar una curva patrón de ADN con los mismos métodos aplicados a las muestras de tejido. Este método ya compensa cualquier influencia que el procedimiento de aislamiento y de cuantificación del ADN pueda tener, lo cual mejora la precisión de los resultados obtenidos. Los inventores

prepararon dos curvas patrón distintas: una obtenida con siete estirpes diferentes de células tumorales y otra con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) extraídas a seis donantes sanos.

Para comparar los tres métodos de evaluación (el de la masa teórica de ADN y las dos curvas patrón basadas en células), se calculó el número de células presentes en 1 gramo de tejido correspondiente a diversas muestras (Figura 10 A). Los cálculos realizados con el patrón de estirpes celulares dieron como resultado recuentos celulares sustancialmente más bajos (máx. una infraestimación de 3,6 veces) en comparación con el patrón a base de las PBMC. Este resultado era previsible, puesto que las estirpes de células tumorales tienden a contar con mayores porcentajes de células aneuploides que albergan mayor cantidad de ADN que las PBMC diploides sanas. En la bibliografía, el porcentaje de tumores gástricos diploides varía entre el 25% y el 67% según el estudio (Hiyama et al., 1995; Tamura et al., 1991; Wiksten et al., 2008; Zhang et al., 2005; Sugai et al., 2005). Puesto que la ploidía y el porcentaje de células aneuploides de las muestras de tejido se desconocen, ambas curvas patrón solo pueden ofrecer una estimación del número real de células pero no tienen en cuenta todas las propiedades de cada muestra individual de tejido. Otra causa de variación es el estado indeterminado de proliferación del tejido que conforma la muestra o la presencia de células necróticas en su seno. En particular la duplicación del contenido de ADN que acontece en las células proliferantes aumenta la cantidad de ADN con respecto al número de células, lo cual genera un sesgo en el cálculo del recuento. En dos muestras de tejido gástrico normal, los inventores calcularon un número de células por gramo de tejido que resultó inferior al arrojado por las muestras tumorales con los tres métodos indicados.

Como criterio conservador, los inventores decidieron optar por la curva patrón de PBMC (Figura 10 B), puesto que si bien puede derivar en una sobreestimación del número de células en las fracciones de las muestras de tejido que sean hiperdiploides, cosa que a su vez se traducirá en una infraestimación de las copias del péptido por célula en tales muestras, nunca sobreestimaré el número de copias del péptido por célula en ninguna muestra.

En el análisis de las muestras de tejido seleccionadas para la cuantificación absoluta de los TUMAP, los inventores aislaron el ADN de 2 o 3 alícuotas de lisado tisular, y cada preparación de ADN se cuantificó por partida doble o triple con el ensayo de fluorescencia. El número total de células y el número de células por gramo de tejido se calcularon a partir del contenido total de ADN con la curva patrón trazada con las PBMC (Figura 11 A). A fin de obtener una estimación de la variación total en el análisis del número de células, primero se calculó el coeficiente de variación (%) en cada una de las muestras o, si se disponía de ella, de la réplica biológica (es decir, preparaciones independientes de lisado tisular procedentes de otras piezas distintas del mismo tumor). En este cálculo se tuvo en cuenta la variación entre las alícuotas del lisado de tejido así como las mediciones repetidas efectuadas en el ensayo de fluorescencia. Estos CV se muestran en la Figura 11 B, y la variación global se determinó en forma de la mediana de los CV mostrados. La variabilidad se podría explicar en parte por el hecho de que los lisados del tejido no estuvieran totalmente homogeneizados, es decir, que las partículas remanentes de tejido contuvieran células no disociadas que después generarían un recuento celular más alto en las réplicas de aislamiento individuales (véase, por ejemplo, el GC816T en la Figura 11 A).

Copias del péptido por célula

Con los datos correspondientes a la cuantificación de los péptidos en los análisis por nanoCL-EM/EM («Péptido total»), a la eficiencia del aislamiento de los TUMAP («% de eficiencia de aislamiento») y al recuento celular de cada muestra tumoral disponible, es posible calcular el número de copias de TUMAP por célula en virtud de la fórmula siguiente:

La cantidad de péptido total se calcula a partir del resultado de entre 2 y 4 series de análisis con nanoCL-EM/EM («péptido/análisis [fmol]») mediante las curvas de calibración mostradas en las Figuras 4 a 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>péptido total</i>
peptide	péptido
run	análisis
fmol	fmol
mol	mol
peptide eluate	eluato de péptido
μl	μl
MS sample per run	muestra de EM por análisis
% of lisate used for TUMAP isolation	% de lisado usado para el aislamiento de los TUMAP

En el cálculo de las cifras absolutas de copias de cada péptido solo se tienen en cuenta las mediciones de EM que superen el LIC, definido con las curvas de calibración. Este LIC se refiere a la cantidad de TUMAP en un experimento de nanoCL-EM/EM (“LIC/análisis [fmol]”).

El número de copias por célula hallado en el conjunto de todos los péptidos, de los que pudieron ser cuantificados, varió entre 50 y 30.000 copias por célula (véase la Tabla 3).

Tabla 3: Resumen del número de copias por célula correspondiente a los TUMAP del HLA-A*02 y del HLA-A*24

Los TUMAP del HLA-A*02 se analizaron en ocho muestras y los TUMAP del HLA-A*24 en seis muestras. nq = no cuantificado porque la cantidad de péptido no alcanzó el LIC.

Alelo HLA	Código del péptido	Cuantificado en n muestras (% de muestras analizadas)	Copias por célula (intervalo de muestras individuales y de réplicas biológicas)
A*02	IGF2BP3-001	1 (13%)	350-450
A*02	FAP-003	1 (13%)	200-250
A*02	COL12A1-	0 (0%)	nq

	002		
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

Con el fin de visualizar el LIC en el contexto de las «copias de péptido por célula», se calculó el «LIC por célula» de cada TUMAP en cada muestra usando las dos fórmulas mostradas más adelante. Puesto que las muestras difieren en el número total de células contadas, el LIC por célula de cada muestra es distinto (véanse las Figuras 12 y 13 para los TUMAP de A*02 y las Figuras 14 y 15 para los TUMAP de A*24).

Estimación del error en la cuantificación absoluta de los TUMAP

Con el fin de estimar la variación en la cuantificación absoluta de los TUMAP, los inventores consideraron la variación relativa de los tres resultados experimentales principales, tal y como se ha descrito antes:

a) La cantidad de TUMAP aislado: desviación relativa del 1,8% (A*02) y del 2,1%

(A*24)

b) La eficiencia en el aislamiento de los TUMAP: desviación relativa del 24% (A*02) y del 32% (A*24)

c) El recuento de células en la muestra de tejido: desviación relativa del 27%

Suponiendo que los valores de una variable siguen la distribución normal, el error relativo (σ) de las «copias por célula» se puede calcular como la raíz cuadrada de la suma del error cuadrático relativo de cada variable:

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

<i>copies</i>	<i>copias</i>
<i>total cell count</i>	<i>recuento total de células</i>
<i>total peptide</i>	<i>péptido total</i>
<i>isolation efficiency</i>	<i>eficiencia del aislamiento</i>

Con los valores mencionados anteriormente, el coeficiente de variación de los números absolutos de copias del péptido por células es aproximadamente el 36% en el caso de los péptidos reconocidos por HLA-A*02, y el 42% en el caso de los péptidos reconocidos por HLA-A*24. Para obtener una impresión sobre la variación de los resultados, se calculó el error absoluto y el relativo de las copias de péptido por célula en el marco de un péptido y una muestra modelos (Tabla 4).

Tabla 4: Cálculo a título de ejemplo del error absoluto y relativo en la cuantificación absoluta de TUMAP en un péptido modelo

	Valor	A*02		A*24	
		error rel. (%)	error abs.	error rel. (%)	error abs.
Recuento total de células/muestra	1x10 ⁸	27%	-	27%	-
Péptido total [fmol]	16,25	1,8%	-	2,1%	-
Eficiencia del aislamiento del péptido-MHC	10%	24%	-	32%	--
Copias del péptido por	1000	36%	360	42%	420

célula					
--------	--	--	--	--	--

Este cálculo de modelo parece indicar que en el complejo análisis multietapa que entraña la cuantificación absoluta, la variación de los resultados se mantiene en un nivel aceptable. En cada uno de los TUMAP, el error relativo se puede desviar del error medio calculado aquí. El número de copias por célula de cada TUMAP se puede comparar cuantitativamente con el de otros TUMAP distintos y priorizar de ese modo los TUMAP en el momento de escoger el anticuerpo y/o el receptor de linfocito T soluble que será más adecuado como diana.

Comparación del método de cuantificación de los TUMAP con otros métodos conocidos y publicados

Hasta la fecha no se tiene constancia de un abordaje preciso que permita la cuantificación absoluta del número de copias por célula de un péptido asociado al MHC. Y más importante aún, los métodos publicados hasta el momento destinados a la cuantificación de los péptidos unidos a moléculas del MHC mediante el análisis por EM no tienen en cuenta la pérdida de antígeno que ocurre durante la preparación de la muestra (Tan et al., 2011; Hogan et al., 2005). El grupo de Peter A. von Velen ha publicado recientemente un método destinado a la «cuantificación precisa de péptidos unidos al MHC» (Hassan et al., 2014). En esta nota técnica se usó una estrategia para cuantificar dos antígenos de histocompatibilidad menores, LB-NISCH-1A y LB-SSR1-1S, en células EBV-LCL JYpp65. No obstante, las etapas experimentales, que a continuación se resumen en la tabla siguiente, difieren sustancialmente:

Tabla 5: Comparación del método de cuantificación de TUMAP ideado por Hassan et al. con el método de la presente invención

	Hassan et al.	Presente invención
Curvas de calibración del péptido	Usadas únicamente para determinar el intervalo lineal, suponiendo que todos los péptidos comparten la misma correlación entre la cantidad de péptido y la señal de EM	Destinadas a determinar el intervalo lineal, el LIC y a cuantificar los péptidos; supone que la correlación entre la cantidad de péptido y la señal de EM es específica de cada

	(pendiente = 1)	péptido
Cuantificación del péptido	Calibración de un punto: Razón (<i>ratio</i>) de la señal con respecto al péptido patrón añadido deliberadamente (enriquecimiento)	Método del patrón interno, basado en una curva de calibración que es específica para cada péptido, cuantificación de las muestras cerca del LIC
Eficiencia del aislamiento	Complejos de péptido-MHC añadidos deliberadamente al lisado (enriquecimiento) tras 2 horas de lisis y eliminación por centrifugación; no tiene en cuenta la pérdida de péptido en ambas etapas	Complejos de péptido-MHC añadidos directamente (enriquecimiento) tras la homogenización del tejido, es decir, el primer punto en que es posible hacerlo en el proceso de aislamiento del péptido
Muestras	Estirpe celular	Tejido de tumor sólido
Preparación de la muestra	Etapas adicionales de cromatografía con C18 antes de la nanoCL-EM/EM final, destinada a reducir la complejidad de la muestra.	La muestra, previa inmunoprecipitación y filtración, se introduce de inmediato en la nanoCL-EM/EM.
Determinación del número de células	Recuento celular durante la preparación del sedimento de células	Análisis del contenido de ADN del lisado obtenido de los tejidos sólidos
Cálculo del error	Considera únicamente la variación de los replicados de la EM (CV 0,1 a 7,1%), pero no la variación generada en el aislamiento del péptido-MHC (26% y 91%, respectivamente) ni en el recuento celular.	Se tienen en cuenta las variaciones propias de los replicados de la EM (CV medio del 1,8% al 2,1%), de la eficiencia del aislamiento del péptido-MHC (CV medio del 24% al 32%) y de la determinación del número de células (CV medio del 27%).

El número de copias de los dos péptidos analizados por Hassan et al. variaron entre 800 y 3500 copias por célula (desviación relativa del 74%) y entre 3000 y 12 000 copias por célula (desviación relativa del 60%) entre los replicados biológicos, respectivamente. El motivo de tal variación no se comenta con claridad, pero podría deberse al uso de distintos espectrómetros de masas.

En resumen, cabe esperar que el método más refinado de la presente invención contribuya a obtener resultados más precisos y fiables.

Cuantificación de los péptidos que presentan un bajo número de copias

Con objeto de mostrar la potencia del método de la invención, se generaron los datos que se presentan en la tabla siguiente. Se identificaron aquellos péptidos que estaban presentes con muy escaso número de copias, entre ellos el péptido PDE11-001. Se puede apreciar que el método permite la determinación de tan solo unas 10 copias de péptido por célula.

Tabla 6: Cuantificación de los péptidos que presentan un bajo número de copias

CP – cáncer de próstata – La secuencia de PDE11-001 es ALLESRVNL (SEQ ID N.º 25)

Código del péptido	Copias por célula			Número de muestras			Fuente/HLA
	Mín.	Media	Máx.	LIC	> LD	evaluable	
Péptido 1	20	20	20	1	5	16	NSCLC/A*02
Péptido 2	10	30	300	13	16	17	NSCLC/A*02
Péptido 3	10	30	50	4	10	18	NSCLC/A*02
Péptido 4	10	30	100	17	17	19	NSCLC/A*02
Péptido 5	20	20	90	7	8	11	NSCLC/A*02
Péptido 6	10	20	50	6	6	10	NSCLC/A*02
Péptido 7	< 10	30	200	9	12	15	PC/A*02
PDE11-001	< 10	10	30	8	9	10	PC/A*02

El PDE11-001 es un péptido que se une a HLA-A*02 y que procede de la fosfodiesterasa 11A (PDE11A), enzima que cataliza la hidrólisis del cAMP y del cGMP, por lo que regula a la baja las vías de transducción de la señal respectivas. Algunas mutaciones de PDE11A han sido vinculadas con la hiperplasia corticosuprarrenal, así como con tumores de células germinales testiculares de carácter familiar. El péptido ha sido detectado en muestras de cáncer de próstata, así como de carcinoma hepatocelular, de páncreas y de células renales, pero no en tejidos normales.

Lista de referencias citadas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tan CT, Croft NP, Dudek NL, Williamson NA, Purcell AW (2011). Direct quantitation

of MHC-bound peptide epitopes by selected reaction monitoring. *Proteomics*. *11*, 2336-2340.

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

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