

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 41287 B1** (51) Cl. internationale : **G01N 33/68**

(43) Date de publication :
29.07.2021

(21) N° Dépôt :
41287

(22) Date de Dépôt :
15.12.2015

(30) Données de Priorité :
30.12.2014 GB 201423361

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/EP2015/079873 15.12.2015

(71) Demandeur(s) :
Immatics Biotechnologies GmbH, Paul-Ehrlich-Strasse 15 72076 Tübingen (DE)

(72) Inventeur(s) :
WEINSCHENK, Toni ; LEIBOLD, Julia

(74) Mandataire :
ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)

(86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: **EP15822924.5**

(54) Titre : **PROCÉDÉ PERMETTANT LA QUANTIFICATION ABSOLUE DES PEPTIDES CONTRE LE CANCER RESTREINTS AUX MOLÉCULES HLA TRAITÉS NATURELLEMENT**

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un procédé permettant la quantification absolue des peptides contre le cancer restreints aux molécules HLA traités naturellement, à savoir la détermination du nombre de copies d'un ou de plusieurs peptides tel que présenté par cellule. La présente invention peut non seulement être utilisée pour le développement des traitements par anticorps ou des vaccins peptidiques mais est également très précieuse pour une immunosurveillance dont la composition moléculaire a été définie, et utile dans les procédés d'identification de nouveaux antigènes peptidiques pour des stratégies immunothérapeutiques, telles que des vaccins respectifs, des thérapies à base d'anticorps ou des approches de transfert adoptif de lymphocytes T dans la lutte contre le cancer et/ou les maladies auto-immunes.

Revendications

1. Procédé pour la quantification absolue d'un ligand peptidique du CMH sur une cellule, ledit procédé comprenant
 - a) la préparation des cellules présentant ledit ligand peptidique du CMH à partir d'un échantillon biologique sélectionné à partir d'un échantillon de tissu, d'un échantillon de sang, d'un échantillon de tumeur ou d'un échantillon de tissu infecté comprenant lesdites cellules, comprenant la digestion enzymatique des tissus et/ou la lyse cellulaire,
 - b) la détermination de la numération cellulaire de ladite préparation de l'étape a) comprenant le comptage des noyaux cellulaires, la détermination photométrique d'ADN, la détermination fluorimétrique d'ADN ou la PCR quantitative,
 - c) l'ajout d'une quantité connue du ligand peptidique du CMH et/ou du complexe peptide-CMH à quantifier à ladite préparation de l'étape a) directement après l'homogénéisation tissulaire (« ensemencement I »),
 - d) l'isolement du ligand peptidique du CMH de ladite préparation de l'étape c) afin d'obtenir un éluat peptidique,
 - e) l'ajout d'une quantité connue du ligand peptidique du CMH à quantifier audit éluat peptidique (« ensemencement II ») en tant que calibrant interne,
 - f) la réalisation d'une analyse par spectrométrie de masse sur ledit ligand peptidique du CMH afin de générer
 - aa) un signal pour l'efficacité de l'isolement à l'étape d),
 - bb) un signal pour le calibrant interne de l'étape e), et
 - cc) un signal pour ledit ligand peptidique du CMH desdites cellules préparées de l'étape a),et
 - g) la quantification dudit ligand peptidique du CMH d'après la comparaison des signaux obtenus à l'étape f) avec
 - aa) la numération cellulaire obtenue,
 - bb) la quantité connue dudit ligand peptidique du CMH et/ou complexe peptide-CMH à quantifier ajouté à l'étape c), et
 - cc) la quantité connue du ligand peptidique du CMH à quantifier ajouté à l'étape e), où la quantification comprend le calcul d'un ratio entre les signaux du calibrant interne de l'étape e) et du ligand peptidique du CMH isolé, et la comparaison du ratio à une courbe de calibration établie du ligand peptidique du CMH, etoù la quantification comprend également la génération d'une courbe de calibration spécifique au peptide basée sur un ratio avec le calibrant interne utilisé à la même quantité, et la détermination

de la limite inférieure de quantification (LLOQ) pour ledit ligand peptidique du CMH à quantifier, par laquelle une quantification absolue du ligand peptidique du CMH sur une cellule est obtenue pour le ligand peptidique du CMH si la quantité quantifiée est supérieure à la LLOQ déterminée.

2. Procédé conforme à la revendication 1, où ledit ligand peptidique du CMH est un peptide associé à une tumeur ou un peptide associé à une maladie.
3. Procédé conforme à la revendication 1 ou 2 comprenant également la détermination de la quantité d'au moins un type de molécules HLA dans ladite préparation de l'étape a).
4. Procédé conforme à l'une des revendications 1 à 3, où le complexe peptide-CMH ajouté et/ou le ligand peptidique du CMH ajouté est/sont marqué(s), et est/sont de préférence différenciellement marqué(s) par isotopes.
5. Procédé conforme à l'une des revendications 1 à 4, où l'isolement comprend la chromatographie, notamment la chromatographie d'affinité.
6. Procédé conforme à l'une des revendications 1 à 5, comprenant également la sélection de ligands peptidiques du CMH surprésentés, surexprimés ou spécifiques d'une tumeur pour l'analyse.
7. Procédé conforme à l'une des revendications 1 à 6, où ledit procédé est mis en œuvre à grande échelle.
8. Procédé conforme à l'une des revendications 1 à 7, où ledit procédé consiste en les étapes indiquées.
9. Procédé conforme à l'une des revendications 1 à 8, où ledit ou lesdits échantillon(s) biologique(s) analysé(s) provient/proviennent d'un patient ou d'un groupe de patients atteints de la même maladie.
10. Procédé conforme à la revendication 9, comprenant également l'étape de génération d'un profil personnalisé de ligands du CMH, de préférence un profil personnalisé de ligands du CMH spécifique à une maladie, basé sur lesdits ligands peptidiques du CMH quantifiés.