



(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)



1-0026228

(51)⁷ C12N 15/09; A61P 35/00; C12N 5/10; (13) B
A61K 35/17; A61P 35/02

(21) 1-2018-04472

(22) 15/03/2017

(86) PCT/JP2017/010437 15/03/2017

(87) WO 2017/159736 21/09/2017

(30) 2016-053913 17/03/2016 JP

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2018 369A

(73) Yamaguchi University (JP)

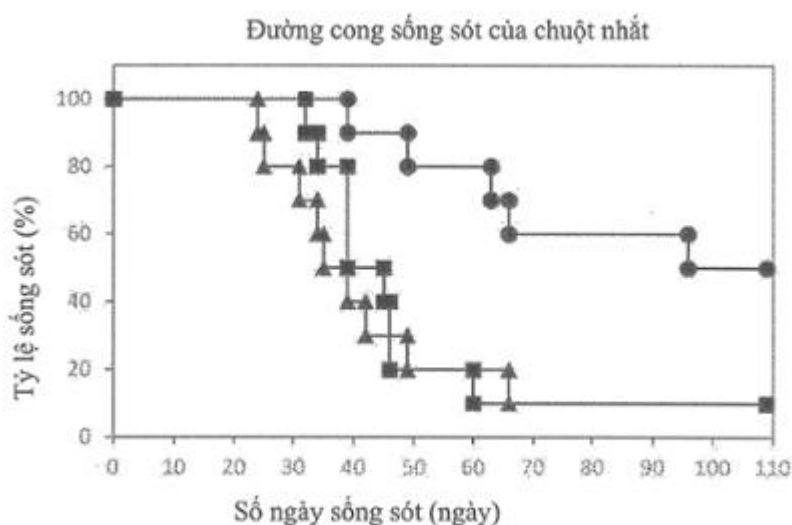
1677-1 Yoshida, Yamaguchi-shi, Yamaguchi 7538511, Japan

(72) TAMADA, Koji (JP); SAKODA, Yukimi (JP); ADACHI, Keishi (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) TẾ BÀO CÓ KHẢ NĂNG MIỄN DỊCH VÀ VECTƠ BIỂU HIỆN ĐỂ TẠO RA TẾ BÀO CÓ KHẢ NĂNG MIỄN DỊCH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến tế bào có khả năng miễn dịch mà biểu hiện các yếu tố điều hòa của chức năng miễn dịch tế bào có khả năng miễn dịch và có tất cả khả năng tăng sinh, khả năng sống được, và khả năng tích tụ tế bào T, và vectơ biểu hiện của các yếu tố điều hòa của chức năng miễn dịch để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch. Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19 được tạo ra. Tốt hơn là, phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư là thụ thể tế bào T nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và tế bào có khả năng miễn dịch là tế bào T.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19, chất chống ung thư chứa tế bào có khả năng miễn dịch, và vector biểu hiện để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư là bệnh ảnh hưởng đến nhiều người trên thế giới. Nói chung, liệu pháp hóa trị, xạ trị, hoặc điều trị bằng phẫu thuật được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên, việc áp dụng các liệu pháp điều trị này xảy ra một số phản ứng bất lợi; mất đi một số chức năng; và khó điều trị sự di căn.

Do đó, liệu pháp miễn dịch đang được phát triển trong những năm gần đây để giữ cho bệnh nhân có cuộc sống tốt hơn. Theo liệu pháp miễn dịch này, liệu pháp miễn dịch tế bào là liệu pháp bao gồm việc thu gom các tế bào có khả năng miễn dịch của bệnh nhân, điều trị và khuếch đại các tế bào có khả năng miễn dịch để tăng cường chức năng miễn dịch của chúng, và chuyển các tế bào có khả năng miễn dịch trở lại bệnh nhân. Đặc biệt, liệu pháp này được biết đến là bao gồm việc thu gom tế bào T của bệnh nhân, đưa gen mã hóa CAR vào tế bào T, khuếch đại tế bào T, và chuyển tế bào T trở lại bệnh nhân (xem tài liệu không phải sáng chế 1). Liệu pháp này hiện đang được thử nghiệm lâm sàng trên khắp thế giới và đạt được kết quả có hiệu quả đối với, ví dụ, khối u ác tính ở cơ quan tạo máu, như bệnh bạch cầu hoặc u lympho.

Ít nhất vài trăm dạng yếu tố khác nhau như xytokin, chemokin, và các protein điều tiết tín hiệu được biết đến là các yếu tố điều tiết của chức năng miễn dịch của các tế bào có khả năng miễn dịch như các tế bào T. Trong đó, interleukin 7 (IL-7) là xytokin cần thiết cho sự sống sót của tế bào T và được biết là được tạo ra từ các tế bào không tạo máu như các tế bào cơ chất của tủy xương, tuyến ức, và các cơ quan bạch

huyết hoặc mô. Tế bào T biểu hiện thụ thể xytokin khả năng bao gồm IL-7 và IL-7R alpha được dung hợp với nhau (xem tài liệu sáng chế 1) được bộc lộ dưới dạng tế bào T sử dụng chức năng của IL-7. Tuy nhiên, thụ thể xytokin khả năng trong tế bào T được biểu hiện dưới dạng một protein dung hợp theo cách giới hạn ở bề mặt màng của tế bào T được đưa vào, và chỉ chuyển đổi tín hiệu của xytokin như IL-7R theo cách độc lập phối tử đối với duy nhất tế bào cùng nguồn. Do đó, thụ thể xytokin khả năng không thể tăng cường chức năng của tế bào T không được đưa thụ thể này vào.

Đã bộc lộ rằng: sự biểu hiện giảm của CCL19, CCL21, và IL-7 là nguyên nhân gây ra sự thiếu hụt trong việc duy trì vùng tế bào T ở lách của chuột nhất đột biến SIRP alpha (xem tài liệu không phải sáng chế 2); và CCL19, CCL21, và IL-7 thực hiện việc duy trì nội cân bằng của tế bào T ở các mô lympho thứ cấp (mô lách hoặc hạch bạch huyết) (xem tài liệu không phải sáng chế 3). Tuy nhiên, các tài liệu không phải sáng chế 2 và 3 đã mô tả ở trên thể hiện hiệu quả trên các tế bào T bất hoạt luôn có mặt trong vùng tế bào T của các mô lympho thứ cấp và không thể hiện mối quan hệ trực tiếp với đáp ứng miễn dịch kháng khối u. Hơn nữa, các tế bào biểu hiện CCL19, CCL21, hoặc IL-7 được mô tả trong các tài liệu không phải sáng chế 2 và 3 không phải là các tế bào T nhưng là các tế bào lưới nội mô có mặt trong các mô lympho thứ cấp.

Trong lúc đó, thụ thể tế bào T (dưới đây, còn được gọi là "TCR") là phân tử thụ thể kháng nguyên biểu hiện trên màng tế bào của tế bào T. TCR có mặt dưới dạng heterodime bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta, hoặc chuỗi gama và chuỗi delta và được biết để hoạt hóa tế bào T bằng cách nhận diện phân tử kháng nguyên liên kết với phân tử phức tương hợp mô chính (major histocompatibility complex - MHC).

Liệu pháp miễn dịch bao gồm việc đưa gen TCR có khả năng nhận diện kháng nguyên khối u biểu hiện trên tế bào ung thư vào tế bào T lấy từ bệnh nhân bị ung thư, khuếch đại tế bào T, và sau đó chuyển tế bào T trở lại bệnh nhân đang trong giai đoạn phát triển bằng cách áp dụng chức năng của TCR. Đặc biệt, được phẩm để điều trị u màng não chứa tế bào biểu hiện TCR nhận diện đặc hiệu tế bào biểu hiện WT1 (xem tài liệu sáng chế 2) được bộc lộ.

Mặc dù một số kỹ thuật đã mô tả ở trên bộc lộ tác dụng kháng khối u trên khối u ác tính ở cơ quan tạo máu, nhưng không có trường hợp nào bộc lộ tác dụng rõ rệt đối với bệnh ung thư dạng rắn. Điều này được coi là do các vấn đề về hiệu quả sống sót thấp của tế bào có khả năng miễn dịch được chuyển vào in vivo hoặc hoạt tính không đủ của tế bào có khả năng miễn dịch nội sinh gây ra bởi các tế bào có khả năng miễn dịch được chuyển vào hoặc sự tích tụ cục bộ của nó không đủ đối với khối u. Do đó, mong muốn phát triển kỹ thuật để giải quyết các vấn đề này.

Tài liệu kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO 2013/123061

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2013-116891

Tài liệu không phải sáng chế

Tài liệu không phải sáng chế 1: Yozo Nakazawa, The Shinshu Medical Journal, 61 (4): 197-203 (2013)

Tài liệu không phải sáng chế 2: SATO-HASHIMOTO M. et al., J. Immunol., 2011, vol. 187, no. 1, 291-7

Tài liệu không phải sáng chế 3: SIEGERT S. et al., Front. Immunol., 2012, vol. 3, article 285

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được sáng chế giải quyết

Các tế bào có khả năng miễn dịch để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch thông thường không đủ khả năng tác dụng gây miễn dịch của tế bào có khả năng miễn dịch nội sinh hoặc khả năng tăng sinh, khả năng sống sót, hoặc khả năng của tế bào có khả năng miễn dịch để tích tụ tế bào T. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện các yếu tố điều hòa của chức năng miễn dịch tế bào có

khả năng miễn dịch và có tất cả khả năng tăng sinh, khả năng sống sót, và khả năng tích tụ tế bào T, và vector biểu hiện của các yếu tố điều hòa của chức năng miễn dịch để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch.

Biện pháp giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực để cải thiện các tế bào biểu hiện các yếu tố điều hòa của chức năng miễn dịch nhằm mục đích đạt được tác dụng gây miễn dịch hoặc hoạt tính kháng khối u tốt hơn nhiều trong liệu pháp miễn dịch ung thư sử dụng tế bào có khả năng miễn dịch. Trong quá trình này, các tác giả sáng chế đã tập trung vào xytokin, chemokin, và protein điều hòa tín hiệu là các yếu tố điều hòa chức năng miễn dịch của tế bào có khả năng miễn dịch, và cấu thành vector đối với sự biểu hiện của các yếu tố điều hòa chức năng miễn dịch của tế bào có khả năng miễn dịch. Kết quả của việc đưa vector biểu hiện này vào tế bào có khả năng miễn dịch là các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng có thể tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch có tác dụng gây miễn dịch, khả năng tăng sinh, khả năng sống sót và khả năng tích tụ tế bào T tốt hơn so với tế bào có khả năng miễn dịch thông thường, và nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Đặc biệt, sáng chế được bộc lộ trong các mục từ (1) đến (9) sau:

- (1) Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19.
- (2) Tế bào có khả năng miễn dịch theo mục (1), trong đó phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư là thụ thể tế bào T nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư.
- (3) Tế bào có khả năng miễn dịch theo mục (1) hoặc (2), trong đó tế bào có khả năng miễn dịch này là tế bào T.
- (4) Tế bào có khả năng miễn dịch theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó kháng nguyên ung thư là WT1, MART-1, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, Glypican-3, KIF20A, Survivin, AFP-1, gp100, MUC1, PAP-10, PAP-5, TRP2-1, SART-1, VEGFR1, VEGFR2, NEIL3, MPHOSPH1, DEPDC1, FOXM1,

CDH3, TTK, TOMM34, URLC10, KOC1, UBE2T, TOPK, ECT2, MESOTHELIN, NKG2D, P1A, GD2, hoặc GM2.

(5) Vector biểu hiện để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), vector biểu hiện là vector bất kỳ trong số các vector biểu hiện từ (a) đến (e) sau:

(a) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7, và axit nucleic mã hóa CCL19;

(b) hai vector biểu hiện (b-1) và (b-2) sau:

(b-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư; và

(b-2) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19;

(c) hai vector biểu hiện (c-1) và (c-2) sau:

(c-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa IL-7; và

(c-2) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa CCL19;

(d) hai vector biểu hiện (d-1) và (d-2) sau:

(d-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7; và

(d-2) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa CCL19; và

(e) ba vector biểu hiện (e-1), (e-2) và (e-3) sau:

(e-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư;

(e-2) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7; và

(e-3) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa CCL19.

(6) Vector biểu hiện theo mục (5), trong đó phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư là thụ thể tế bào T nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư.

(7) Vector biểu hiện theo mục (5) hoặc (6), trong đó:

axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7, và axit nucleic mã hóa CCL19 trong vector biểu hiện (a)

axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 trong vector biểu hiện (b-2)

axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa IL-7 trong vector biểu hiện (c-1), hoặc

axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa CCL19 trong vector biểu hiện (d-2)

được liên kết qua trình tự mã hóa peptit tự phân cắt.

(8) Vector biểu hiện theo mục bất kỳ trong số các mục từ (5) đến (7), trong đó vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát.

(9) chất chống ung thư chứa tế bào có khả năng miễn dịch theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) và chất phụ gia được dụng.

Hiệu quả của sáng chế

Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, IL-7, và CCL19 (dưới đây, còn được gọi là "tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19") theo sáng chế có hoạt tính kháng khối u, và việc sử dụng tế bào có khả năng miễn dịch này cho phép ngăn chặn sự giảm về tỷ lệ sống sót gây ra bởi khối u được tạo thành từ tế bào ung thư có kháng nguyên đặc hiệu được nhận diện bởi phân tử bề mặt tế bào. Hơn nữa, việc sử dụng vector biểu hiện theo

sáng chế cho phép tạo thành tế bào có khả năng miễn dịch có tất cả khả năng tăng sinh, khả năng sống sót và khả năng tích tụ tế bào T.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện bản đồ của vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19.

Fig. 2A là sơ đồ thể hiện kết quả của việc nghiên cứu số lượng tế bào của tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19.

Fig. 2B là sơ đồ thể hiện kết quả của việc nghiên cứu tỷ lệ sống sót của tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19.

Fig. 3 là sơ đồ thể hiện kết quả của thử nghiệm di trú tế bào T sử dụng tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19.

Fig. 4 là sơ đồ thể hiện bản đồ của vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 $\times$ HSV-TK.

Fig. 5 là sơ đồ thể hiện bản đồ của vector biểu hiện TCR $\times$ IL-7 $\times$ CCL19.

Fig. 6 là sơ đồ thể hiện bản đồ của vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 $\times$ eGFP.

Fig. 7 là sơ đồ thể hiện tỷ lệ sống sót của chuột nhắt không được điều trị, chuột nhắt cho tế bào T biểu hiện TCR/eGFP đặc hiệu P1A, và chuột nhắt cho tế bào T biểu hiện TCR/IL-7/CCL19/eGFP đặc hiệu P1A.

Fig. 8 là sơ đồ thể hiện kết quả của việc nghiên cứu thể tích khối u của chuột nhắt không được điều trị, chuột nhắt cho tế bào T biểu hiện TCR/eGFP đặc hiệu P1A, và chuột nhắt cho tế bào T biểu hiện TCR/IL-7/CCL19/eGFP đặc hiệu P1A.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là tế bào có khả năng miễn dịch này biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19. Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế có thể còn biểu hiện các

yếu tố điều hòa khác của chức năng miễn dịch, như IL-15, CCL21, IL-2, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IP-10, CCL4, Flt3L, interferon-gama, MIP-1 alpha, GM-CSF, M-CSF, TGF-beta, và TNF-alpha.

Kháng nguyên ung thư nghĩa là chất, như protein hoặc glycolipit, được biểu hiện trong tế bào ung thư cao hơn so với trong tế bào bình thường hoặc biểu hiện đặc hiệu trong tế bào ung thư. Ví dụ về kháng nguyên ung thư này có thể bao gồm kháng nguyên liên quan khối u, kháng nguyên ung thư tinh hoàn, kháng nguyên liên quan tạo mạch, và epitop peptit của kháng nguyên ung thư tân sinh có thể quy cho đột biến gen và cụ thể có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein như WT1, MART-1, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, Glypican-3, KIF20A, Survivin, AFP-1, gp100, MUC1, PAP-10, PAP-5, TRP2-1, SART-1, VEGFR1, VEGFR2, NEIL3, MPHOSPH1, DEPDC1, FOXM1, CDH3, TTK, TOMM34, URLC10, KOC1, UBE2T, TOPK, ECT2, MESOTHELIN, NKG2D, và P1A, và glycolipit như GD2 và GM2.

Ví dụ về phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư có thể bao gồm thụ thể bề mặt tế bào, thụ thể nhân tạo, và yếu tố dính kết nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư và tốt hơn là có thể bao gồm phân tử tạo ra khả năng đánh dấu đặc hiệu ung thư thông qua biểu hiện của nó trên bề mặt tế bào, như thụ thể tế bào T nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư và thụ thể androstan cơ định (constitutive androstane receptor - CAR) nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, tốt hơn nữa là TCR. TCR có thể là heterodime bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta (TCR alpha-beta) hoặc có thể là heterodime bao gồm chuỗi gama và chuỗi delta (TCR gama-delta) miễn là TCR nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư. Phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư có thể gián tiếp nhận diện kháng nguyên ung thư miễn là sự nhận diện là đặc hiệu. Ví dụ, phân tử (ví dụ, kháng thể) nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư được dùng cho đối tượng theo cách đồng thời hoặc liên tiếp với tế bào có khả năng miễn dịch của sáng chế, và tế bào có khả năng miễn dịch của sáng chế có khả năng nhận diện đặc hiệu gián tiếp kháng nguyên ung thư, bằng cách nhận diện phân tử (ví dụ, kháng thể) hoặc nhận diện thẻ dán nhãn phân tử (ví dụ, kháng thể).

Trong trường hợp nhận diện kháng thể, ví dụ về phân tử bề mặt tế bào bao gồm CD16. Ví dụ về thể dán nhãn phân tử (ví dụ, kháng thể) bao gồm FITC.

Loại tế bào có khả năng miễn dịch đối với tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế có thể là tế bào bất kỳ được bao gồm trong đáp ứng miễn dịch. Ví dụ về loại tế bào này có thể bao gồm: tế bào lympho như tế bào T, tế bào diệt tự nhiên (natural killer cell: NK cell), và tế bào B; tế bào trình diện kháng nguyên như bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, và tế bào tua; và bạch cầu hạt như bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa eosin, bạch cầu ưa bazơ, và dưỡng bào và tốt hơn là có thể bao gồm tế bào T có nguồn gốc từ động vật có vú (ví dụ, người, chó, mèo, lợn, hoặc chuột nhắt), tốt hơn nữa là tế bào T có nguồn gốc từ người. Theo cách khác, tế bào T có thể thu được bằng cách phân lập và tinh sạch từ dịch cơ thể như máu hoặc dịch tủy xương, mô của lách, tuyến ức, hạch bạch huyết, hoặc tương tự, hoặc tế bào miễn dịch thâm nhiễm mô ung thư của khối u nguyên phát, khối u di căn, cổ trướng dạng ung thư, hoặc tương tự. Tế bào T tạo ra từ tế bào ES hoặc tế bào iPS có thể được sử dụng. Ví dụ về tế bào T này có thể bao gồm tế bào T alpha-beta, tế bào T gamma-delta, tế bào T CD8⁺ T, tế bào T CD4⁺, tế bào T thâm nhiễm khối u, tế bào T nhớ, tế bào T chưa qua xử lý, và tế bào NKT.

Ví dụ về phương pháp để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế có thể bao gồm phương pháp tạo ra bao gồm bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế nêu dưới đây vào tế bào có khả năng miễn dịch. Các ví dụ khác về phương pháp này có thể bao gồm phương pháp tạo ra bao gồm bước đưa vector biểu hiện của phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và/hoặc CCL19 vào trứng đã thụ tinh, tế bào ES, hoặc tế bào iPS, và sau đó gây ra sự biểu hiện, và phương pháp tạo ra bao gồm bước đưa tiếp, nếu cần, vector biểu hiện của phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và/hoặc CCL19, vào tế bào có khả năng miễn dịch thu được bằng cách tách khỏi động vật có vú chuyển gen biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư bằng cách chuyển nhiễm gen.

Ví dụ về phương pháp tạo ra bao gồm bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế nêu dưới đây vào tế bào có khả năng miễn dịch có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, phương pháp đưa vào bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phương pháp lây nhiễm virus, phương pháp canxi phosphate, chuyển nhiễm liposom (lipofection), vi tiêm, và phương pháp xung điện (electroporation) và tốt hơn là có thể bao gồm phương pháp đưa vào bằng phương pháp lây nhiễm virus.

Ví dụ về phương pháp lây nhiễm virus có thể bao gồm phương pháp bao gồm bước chuyển nhiễm tế bào đóng gói như tế bào GP2-293 (do Takara Bio Inc. sản xuất), tế bào Plat-GP (do Cosmo Bio Co., Ltd. sản xuất), tế bào PG13 (ATCC CRL-10686), hoặc tế bào PA317 (ATCC CRL-9078) với vector biểu hiện theo sáng chế và plasmid đóng gói để tạo ra virus tái tổ hợp và lây nhiễm tế bào có khả năng miễn dịch với virus tái tổ hợp. Phương pháp lây nhiễm virus có thể được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit có bán ngoài thị trường như Kit Eco đóng gói Retrovirus (do Takara Bio Inc. sản xuất).

Tế bào có khả năng miễn dịch theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách tích hợp polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, IL-7, và CCL19 vào hệ gen của tế bào bằng cách sử dụng kỹ thuật chỉnh sửa gen đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sao cho trình tự khởi đầu có thể được biểu hiện trong sự kiểm soát của trình tự khởi đầu thích hợp. Ví dụ về kỹ thuật chỉnh sửa gen đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm kỹ thuật sử dụng endonucleaza như nucleaza ngón tay kềm, TALEN (nucleaza tác động giống chất hoạt hóa sự phiên mã: transcription activator-like effector nuclease), hệ thống Cas CRISPR (nhóm các đoạn ngắn đối xứng lặp lại thường xuyên: clustered regularly interspaced short palindromic repeat). Trong trường hợp cho phép tế bào có khả năng miễn dịch theo sáng chế biểu hiện protein ngoại lai bổ sung, polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa protein ngoại lai bổ sung có thể được tích hợp theo cách tương tự vào hệ gen của tế bào bằng cách sử dụng kỹ thuật chỉnh sửa gen sao cho trình tự khởi đầu có thể được biểu hiện trong sự kiểm soát của trình tự khởi đầu thích hợp. Ví dụ về phương pháp tích hợp polynucleotit vào hệ gen của tế bào sao cho trình tự khởi đầu có thể

được biểu hiện trong sự kiểm soát của trình tự khởi đầu thích hợp bao gồm: phương pháp mà bao gồm bước tích hợp polynucleotit trong đó trình tự nucleotit mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, IL-7, và CCL19 (hoặc protein bổ sung) được liên kết về mặt chức năng xuôi theo trình tự khởi đầu thích hợp (nghĩa là, polynucleotit trong đó trình tự mã hóa được liên kết sao cho các yếu tố (hoặc protein bổ sung) có thể được biểu hiện trong sự kiểm soát của trình tự khởi đầu) vào vùng không mã hóa hoặc tương tự của hệ gen tế bào; và phương pháp bao gồm bước tích hợp polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, IL-7, và CCL19 (hoặc protein bổ sung) xuôi theo trình tự khởi đầu nội sinh của hệ gen tế bào. Ví dụ về trình tự khởi đầu nội sinh bao gồm các trình tự khởi đầu $TCR\alpha$ và $TCR\beta$.

Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế còn có thể được cho phép để biểu hiện thymidin kinaza của virus herpes simplex (HSV-TK) hoặc caspaza cảm ứng 9 nêu dưới đây.

Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, IL-7, và CCL19. Do đó, tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế có khả năng tăng sinh, khả năng sống sót, và khả năng tích tụ tế bào T bên trong cao và có thể áp dụng cho liệu pháp miễn dịch thích ứng sử dụng các tế bào có khả năng miễn dịch khác nhau. Ví dụ về liệu pháp miễn dịch thích ứng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, liệu pháp tế bào tua, liệu pháp tế bào NK, liệu pháp tế bào T gamma-delta, liệu pháp tế bào T alpha-beta, liệu pháp CTL, và liệu pháp TIL. Phương pháp làm ví dụ có thể bao gồm bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế nêu dưới đây vào tế bào có khả năng miễn dịch thu được từ bệnh nhân, khuếch đại tế bào có khả năng miễn dịch, và dùng tế bào có khả năng miễn dịch cho bệnh nhân. Các ví dụ cụ thể nêu dưới đây không làm giới hạn sáng chế. Liệu pháp tế bào tua bao gồm bước cho mô ung thư đã lấy ra bằng cách phẫu thuật hoặc sản phẩm phân giải của nó vào tế bào tua được biệt hóa từ bạch cầu đơn nhân thu được từ bệnh nhân, và đưa tế bào tua vào cơ thể bệnh nhân và có thể bao gồm bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế vào tế bào tua. Trong ngữ cảnh này, epitop peptit

của phân tử kháng nguyên ung thư cũng có thể được tổng hợp nhân tạo và được sử dụng thay cho mô ung thư hoặc sản phẩm phân giải. Liệu pháp tế bào NK bao gồm bước điều trị tế bào lympho thu được từ bệnh nhân bằng nhiều chất kích thích như IL-2 để hoạt hóa và khuếch đại tế bào NK, mà sau đó được dùng cho bệnh nhân và có thể bao gồm bước đưa vector theo sáng chế vào tế bào NK. Việc sử dụng kết hợp thuốc kháng thể chống ung thư có tế bào NK hoạt hóa có thể được mong đợi để tạo ra tác dụng hiệu quả tấn công tế bào ung thư. Liệu pháp tế bào T gama-delta bao gồm bước nuôi cấy và kích thích tế bào lympho thu được từ bệnh nhân sử dụng IL-2 hoặc axit zoledronic để khuếch đại tế bào T gama-delta, sau đó được dùng cho bệnh nhân và có thể bao gồm bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế vào tế bào T gama-delta. Liệu pháp tế bào T alpha-beta bao gồm bước nuôi cấy tế bào lympho thu được từ bệnh nhân với kháng thể kháng-CD3 hoặc IL-2 và dùng tế bào T alpha-beta hoạt hóa cho bệnh nhân và có thể bao gồm bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế vào tế bào T alpha-beta. Liệu pháp CTL bao gồm bước kích thích tế bào lympho thu được từ bệnh nhân bằng tế bào ung thư thu được từ bệnh nhân, nuôi cấy tế bào lympho bằng cách bổ sung kháng thể kháng-CD3 hoặc IL-2 để khuếch đại CTL đặc hiệu đối với tế bào ung thư, sau đó được dùng cho bệnh nhân và có thể bao gồm bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế vào CTL. Tế bào trình diện kháng nguyên thể hiện epitop peptit kháng nguyên ung thư cũng có thể được sử dụng thay cho tế bào ung thư. Liệu pháp TIL bao gồm bước thu tế bào lympho từ mô ung thư thu được từ bệnh nhân, kích thích và nuôi cấy tế bào lympho bằng IL-2 hoặc tương tự, và dùng tế bào lympho cho bệnh nhân và có thể bao gồm bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế vào tế bào lympho.

Vector biểu hiện theo sáng chế là vector bất kỳ trong số các vector biểu hiện từ (a) đến (e) sau để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế:

(a) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7, và axit nucleic mã hóa CCL19;

(b) hai vector biểu hiện (b-1) và (b-2) sau:

(b-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư; và

(b-2) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19;

(c) hai vector biểu hiện (c-1) và (c-2) sau:

(c-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa IL-7; và

(c-2) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa CCL19;

(d) hai vector biểu hiện (d-1) và (d-2) sau:

(d-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7; và

(d-2) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa CCL19; và

(e) ba vector biểu hiện (e-1), (e-2) và (e-3) sau:

(e-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư;

(e-2) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7; và

(e-3) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa CCL19.

Vector biểu hiện theo sáng chế có thể còn chứa các axit nucleic mã hóa các yếu tố điều hòa khác của chức năng miễn dịch như IL-15, CCL21, IL-2, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IP-10, CCL4, Flt3L, interferon-gama, MIP-1 alpha, GM-CSF, M-CSF, TGF-beta, TNF-alpha.

Ví dụ về axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa interleukin 7 (IL-7), và axit nucleic mã hóa CCL19 có thể bao gồm các axit nucleic có nguồn gốc từ động vật có vú tương ứng và

tốt hơn là có thể bao gồm các axit nucleic có nguồn gốc từ người. Các axit nucleic tương ứng có thể được lựa chọn một cách thích hợp theo loại tế bào mà vectơ biểu hiện theo sáng chế được đưa vào. Thông tin trình tự về các axit nucleic tương ứng này có thể thu được một cách thích hợp bằng cách tra cứu các tài liệu đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc cơ sở dữ liệu như NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

Ví dụ về axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư tốt hơn là có thể bao gồm axit nucleic có nguồn gốc từ người. Ví dụ về axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư có thể bao gồm axit nucleic mã hóa thụ thể tế bào T (TCR) hoặc axit nucleic mã hóa thụ thể androstan cơ bản (CAR). Axit nucleic này có thể là axit nucleic có nguồn gốc tự nhiên hoặc có thể là axit nucleic được tổng hợp nhân tạo và có thể được lựa chọn một cách thích hợp theo loại tế bào mà vectơ biểu hiện theo sáng chế đưa vào. Thông tin trình tự về nó có thể thu được một cách thích hợp bằng cách tra cứu tài liệu đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc cơ sở dữ liệu như NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

Axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 có thể được tạo ra bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phương pháp tổng hợp hóa học hoặc phương pháp khuếch đại PCR, dựa vào thông tin về trình tự nucleotit của mỗi axit nucleic mã hóa. Các codon chọn lọc để mã hóa các axit amin có thể được biến đổi để tối ưu hóa sự biểu hiện của axit nucleic trên tế bào chủ đích.

TCR đối với axit nucleic mã hóa TCR có thể là heterodime bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta (TCR alpha-beta) hoặc có thể là heterodime bao gồm chuỗi gama và chuỗi delta (TCR gama-delta). Axit nucleic mã hóa TCR alpha-beta bao gồm cả axit nucleic mã hóa chuỗi alpha của TCR và axit nucleic mã hóa chuỗi beta của TCR. Axit nucleic mã hóa TCR gama-delta bao gồm cả axit nucleic mã hóa chuỗi gama của TCR và axit nucleic mã hóa chuỗi delta của TCR.

Thông tin trình tự về axit nucleic mã hóa TCR có thể được nhận biết từ axit nucleic của chuỗi alpha và chuỗi beta ở dạng dưới đơn vị TCR của CTL được kích thích sử dụng peptit kháng nguyên cụ thể bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (WO 2007/032255; và tài liệu Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Ví dụ, PCR được ưu tiên để phân tích TCR. Các đoạn mồi PCR để phân tích TCR có thể là, ví dụ, đoạn mồi 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3': SEQ ID NO: 3) làm đoạn mồi 5' và đoạn mồi 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3': SEQ ID NO: 4) đặc hiệu đối với vùng C chuỗi alpha của TCR, đoạn mồi 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3': SEQ ID NO: 5) đặc hiệu đối với vùng C1 chuỗi beta của TCR, đoạn mồi 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3': SEQ ID NO: 6) đặc hiệu đối với vùng C2 chuỗi beta của TCR làm đoạn mồi 3', tuy nhiên các đoạn mồi này không bị giới hạn ở đó. Dẫn xuất TCR có thể gắn kết, có hoạt tính gắn kết cao, với tế bào đích trình diện peptit kháng nguyên và có thể gián tiếp tùy ý gây diệt hiệu quả tế bào đích trình diện peptit kháng nguyên *in vivo* và *in vitro*.

Axit nucleic mã hóa TCR là, ví dụ, axit nucleic mã hóa TCR như TCR đặc hiệu MART1 (Cancer Res. 54, 5265-5268 (1994)), TCR đặc hiệu MAGE-A3 (Anticancer Res., 20, 1793-1799 (2000)), TCR đặc hiệu gp100 (J. Immunol. 170, 2186-2194 (2003)), TCR đặc hiệu NY-ESO-1 (J. Immunol., 174, 4415-4423 (2005)), TCR đặc hiệu WT1 (Blood, 106, 470-476 (2005)), TCR đặc hiệu MAGE-A1 (Int. Immunol., 8, 1463-1466 (1996)), hoặc TCR đặc hiệu P1A (Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X.-F. Bai, Y. Liu. 1999. Các tế bào lympho T gây độc tế bào đối với kháng nguyên kháng khối u không bị đột biến P1A: sự phát triển bình thường nhưng cản trở chức năng của chất tác động. J. Exp. Med. 189: 811) và có thể là trình tự nucleotit có độ đồng nhất bằng 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, tốt nhất là 98% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit mã hóa TCR bất kỳ trong số các TCR được mô tả trong các tài liệu này miễn là TCR có thể nhận diện phân tử kháng nguyên gắn kết với phân tử MHC và có thể hoạt hoá tế bào T. Trong trình tự nucleotit mã hóa TCR bất kỳ trong số các TCR được mô tả trong các tài liệu này, trình tự mã hóa CDR được nhận biết, và

trình tự nucleotit duy trì trình tự mã hóa CDR và có trình tự, không phải trình tự mã hóa CDR, có độ đồng nhất bằng 60% hoặc cao hơn, tốt hơn là 70% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 80% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, tốt nhất là 95% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit mã hóa TCR bất kỳ trong số các TCR được mô tả trong các tài liệu này có thể được sử dụng.

Ví dụ về axit nucleic mã hóa IL-7 có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1. Axit nucleic mã hóa IL-7 có thể là trình tự nucleotit có độ đồng nhất bằng 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, tốt nhất là 98% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 miễn là IL-7 có tác dụng nâng cao tỷ lệ tăng sinh tế bào hoặc tỷ lệ sống sót tế bào. Ví dụ về axit nucleic mã hóa CCL19 có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Trình tự nucleotit có độ đồng nhất bằng 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, còn tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, tốt nhất là 98% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 có thể được sử dụng miễn là CCL19 có tác dụng hấp dẫn hoá học trên tế bào.

Vector biểu hiện theo sáng chế cũng có thể chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát. Gen tự sát nghĩa là gen có chức năng trực tiếp hoặc thứ yếu sinh ra chất gây độc tế bào và diệt tế bào biểu hiện gen tự sát này. Vector biểu hiện theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát có thể điều hoà tế bào có khả năng miễn dịch *in vivo* bằng cách dùng thuốc hoạt hoá chức năng của gen tự sát theo tiến trình điều trị bệnh ung thư, ví dụ, khi khối u đã biến mất. IL-7 hoặc CCL19, không giống các xytokin khác, ít có khả năng gây ra hội chứng giải phóng xytokin hoặc sự biến đổi hình thành u của tế bào chuyển gen đóng vai trò phản ứng bất lợi. Tuy nhiên, nhờ tăng cường chức năng của tế bào có khả năng miễn dịch được đưa vào bằng vector biểu hiện theo sáng chế, xytokin hoặc dạng tương tự đã giải phóng khi tác động vào mô ung thư đích có thể bất ngờ ảnh hưởng đến các mô xung quanh nó. Trong trường hợp này, vector biểu hiện theo sáng

chế chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát có khả năng chắc chắn làm giảm nguy cơ gây ra hội chứng giải phóng xytokin.

Ví dụ về gen tự sát có thể bao gồm các gen mã hóa thymidin kinaza của virus herpes simplex (HSV-TK) và caspase 9 cảm ứng được mô tả trong các tài liệu nêu dưới đây. Ví dụ về các thuốc hoạt hoá chức năng của các gen này có thể bao gồm ganciclovir đối với trước đây và hợp chất CID (dimer hóa bằng hóa chất - chemical induction of dimerization) AP1903 đối với sau này (Cooper LJ., et al., *Cytotherapy*. 2006; 8 (2): 105-17; Jensen M. C. et al., *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep; 16 (9): 1245-56; Jones BS. *Front Pharmacol*. 2014 Nov 27; 5: 254; Minagawa K., *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015 May 8; 8 (2): 230-49; và Bole-Richard E., *Front Pharmacol*. 2015 Aug 25; 6: 174).

Trong vector biểu hiện (a) chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7, và axit nucleic mã hóa CCL19 làm vector của sáng chế, axit nucleic bất kỳ có thể được sắp xếp theo hướng ngược hoặc xuôi theo axit nucleic bất kỳ. Đặc biệt, trường hợp chứa axit nucleic mã hóa TCR làm axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư sẽ được lấy làm ví dụ. Vector biểu hiện có thể có axit nucleic mã hóa TCR, axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19, có thể có axit nucleic mã hóa TCR, axit nucleic mã hóa CCL19 và axit nucleic mã hóa IL-7, có thể có axit nucleic mã hóa IL-7, axit nucleic mã hóa CCL19 và axit nucleic mã hóa TCR, có thể có axit nucleic mã hóa IL-7, axit nucleic mã hóa TCR và axit nucleic mã hóa CCL19, có thể có axit nucleic mã hóa CCL19, axit nucleic mã hóa TCR và axit nucleic mã hóa IL-7, hoặc có thể có axit nucleic mã hóa CCL19, axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa TCR, theo thứ tự ngược.

Trong vector biểu hiện (b-2) chứa axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 làm vector theo sáng chế, sự sắp xếp axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 không bị giới hạn cụ thể, và axit nucleic mã hóa CCL19 có thể được sắp xếp theo hướng ngược hoặc xuôi theo axit nucleic mã hóa IL-7.

Trong vector biểu hiện (c-1) chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa IL-7 làm vector theo sáng chế, sự sắp xếp axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư và axit nucleic mã hóa IL-7 không bị giới hạn cụ thể, và axit nucleic mã hóa IL-7 có thể được sắp xếp theo hướng ngược hoặc xuôi theo axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư.

Trong vector biểu hiện (d-2) chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa CCL19 làm vector theo sáng chế, sự sắp xếp axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư và axit nucleic mã hóa CCL19 không bị giới hạn cụ thể, và axit nucleic mã hóa CCL19 có thể được sắp xếp theo hướng ngược hoặc xuôi theo axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư.

Axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 có thể lần lượt được phiên mã bằng các trình tự khởi đầu khác nhau hoặc có thể được phiên mã bằng một trình tự khởi đầu sử dụng vị trí nhập ribozym nội (internal ribozyme entry site - IRES) hoặc peptit 2A tự phân cắt.

Vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm axit nucleic tùy ý giữa axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 trong trường hợp phiên mã các axit nucleic này bằng một trình tự khởi đầu sử dụng vị trí nhập ribozym nội (IRES) hoặc peptit 2A tự phân cắt, giữa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư và axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 trong trường hợp chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, giữa axit nucleic mã hóa chuỗi alpha và axit nucleic mã hóa chuỗi beta trong trường hợp chứa axit nucleic mã hóa TCR alpha-beta, hoặc giữa axit nucleic mã hóa chuỗi gama và axit nucleic mã hóa chuỗi delta trong trường hợp chứa axit nucleic mã hóa TCR gama-delta, miễn là mỗi axit nucleic có thể được biểu hiện. Các axit nucleic này tốt hơn là được liên kết qua trình tự mã hóa peptit tự phân cắt

(peptit 2A) hoặc IRES, tốt hơn là trình tự mã hóa peptit 2A. Thành phần liên kết sử dụng trình tự này cho phép biểu hiện hiệu quả mỗi axit nucleic.

Trong trường hợp chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát, vị trí của gen tự sát không bị giới hạn cụ thể, và gen tự sát có thể được định vị, ví dụ, qua trình tự mã hóa peptit 2A hoặc IRES, xuôi theo trình tự khởi đầu đối với sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7, hoặc axit nucleic mã hóa CCL19 và ngược hoặc xuôi theo mỗi trong số các axit nucleic này, hoặc có thể được định vị xuôi theo trình tự khởi đầu khác.

Peptit 2A là peptit tự phân cắt có nguồn gốc từ virus và đặc trưng ở chỗ G-P (vị trí của gốc 1 từ đầu tận cùng C) trong trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7 được phân cắt trong lưới nội bào (Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Ther. 5 (5): 627-638 (2005)). Do đó, các axit nucleic đã kết hợp thẳng vào peptit 2A được biểu hiện độc lập với nhau về mặt nội bào.

Peptit 2A tốt hơn là peptit 2A có nguồn gốc từ *picornavirut*, *rotavirut*, virus côn trùng, *Aphthovirut*, hoặc *Trypanosoma* virus, tốt hơn nữa là peptit 2A có nguồn gốc từ *picornavirut* (F2A) được thể hiện trong SEQ ID NO: 8.

Vectơ đối với vectơ biểu hiện theo sáng chế có thể là tuyến tính hoặc vòng và có thể là vectơ không phải virus như plasmid, vectơ virus, hoặc vectơ dựa trên gen nhảy. Vectơ này có thể chứa các trình tự đối chứng như trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc, và trình tự đánh dấu chọn lọc như gen kháng thuốc hoặc gen thông báo. Axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 được định vị về mặt hoạt động xuôi theo trình tự khởi đầu sao cho mỗi axit nucleic có thể được phiên mã hiệu quả.

Ví dụ về trình tự khởi đầu có thể bao gồm: trình tự khởi đầu có nguồn gốc virus như trình tự khởi đầu LTR retrovirus, trình tự khởi đầu sớm SV40, trình tự khởi đầu cytomegalovirus, trình tự khởi đầu thymidin kinaza của virus herpes simplex; và trình tự khởi đầu có nguồn gốc động vật có vú như trình tự khởi đầu phosphoglycerat kinaza (PGK), trình tự khởi đầu Xist, trình tự khởi đầu β -actin, và trình tự khởi đầu ARN polymeraza II. Theo cách khác, trình tự khởi đầu đáp ứng tetracyclin do tetracyclin gây

ra, trình tự khởi đầu Mx1 do interferon gây ra, hoặc gen tương tự có thể được sử dụng. Việc sử dụng trình tự khởi đầu do chất cụ thể gây ra trong vector biểu hiện theo sáng chế cho phép điều hoà cảm ứng của sự biểu hiện IL-7 và CCL19 đáp ứng tiến trình điều trị bệnh ung thư.

Ví dụ về vector virus có thể bao gồm vector retrovirus, vector lentivirus, vector adenovirus, và vector virus kết hợp với adeno và tốt hơn là có thể bao gồm vector retrovirus, tốt hơn nữa là vector pMSGV (Tamada et al., Clin Cancer Res 18: 6436-6445 (2002)) và vector pMSCV (do Takara Bio Inc. sản xuất). Bằng cách sử dụng vector retrovirus, sự chuyển gen được tích hợp vào hệ gen của tế bào chủ và do đó có thể được biểu hiện ổn định trong thời gian dài.

Để xác nhận việc có vector biểu hiện theo sáng chế trong tế bào có khả năng miễn dịch, ví dụ, sự biểu hiện của TCR có thể được kiểm tra bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy, phương pháp thẩm tách Northern, phương pháp thẩm tách Southern, PCR như RT-PCR, ELISA, hoặc phương pháp thẩm tách Western khi vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa TCR, và sự biểu hiện của gen đánh dấu được chèn trong vector biểu hiện theo sáng chế có thể được kiểm tra khi vector biểu hiện chứa gen đánh dấu.

Khi vector biểu hiện được chứa trong tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa TCR, vùng biến đổi của TCR được biểu hiện được bố trí ngoài tế bào. Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện TCR có vùng biến đổi của TCR có khả năng nhận diện phân tử kháng nguyên gắn kết với phân tử MHC.

Chất chống ung thư theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là chất chống ung thư này chứa tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế và chất phụ gia được dùng. Ví dụ về chất phụ gia có thể bao gồm nước muối, nước muối đậm, môi trường nuôi cấy tế bào, dextroza, nước tiêm được, glyxerol, etanol, và sự kết hợp các chất phụ gia này, chất ổn định, chất hoà tan và chất hoạt động bề mặt, chất đệm và chất khử trùng, chất bổ, chất độn, và chất bôi trơn.

Chất chống ung thư theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng thử nghiệm cần điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về phương pháp dùng có thể bao gồm tiêm trong tĩnh mạch, trong u, trong da, dưới da, trong cơ, trong màng bụng, trong động mạch, trong tuỷ sống, trong tim, trong khớp, trong hoạt dịch, trong sọ, trong não tuỷ, và dưới màng nhện (dịch xương sống).

Lượng tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế có trong chất chống ung thư được dùng có thể được điều chỉnh thích hợp theo loại, vị trí, và mức độ nghiêm trọng của bệnh ung thư, tuổi, trọng lượng cơ thể, và tình trạng của đối tượng thử nghiệm nhận sự điều trị, v.v.. Các ví dụ về lượng tế bào tốt hơn là có thể bao gồm từ 1×10^4 đến 1×10^{10} tế bào, tốt hơn là từ 1×10^5 đến 1×10^9 tế bào, tốt hơn nữa là từ 5×10^6 đến 5×10^8 tế bào, trong một liều đơn.

Theo phương pháp làm ví dụ, chất chống ung thư được dùng có thể được dùng độc lập 4 lần, 3 lần, hai lần, hoặc một lần mỗi ngày, trong thời gian 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, hoặc 5 ngày, một lần mỗi tuần, trong thời gian 7 ngày, 8 ngày, hoặc 9 ngày, hai lần mỗi tuần, một lần một tháng, hoặc hai lần một tháng.

Bệnh ung thư đối với chất chống ung thư theo sáng chế hoặc phương pháp để điều trị bệnh ung thư nêu dưới đây có thể là bệnh ung thư rắn hoặc bệnh ung thư máu. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm: bệnh ung thư như ung thư biểu mô tuyến, bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư tuyến vảy, bệnh ung thư không biệt hoá, bệnh ung thư tế bào lớn, bệnh ung thư tế bào nhỏ, bệnh ung thư da, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư âm đạo, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư lách, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư khí quản, bệnh ung thư phế quản, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư tinh hoàn, và bệnh ung thư buồng trứng; bệnh ung thư mô xương, mô sụn, mô mỡ, mô cơ, mô mạch, và mô chất tạo máu; sarcom như sarcom sụn, sarcom Ewing, u nội mô mạch máu ác tính, u bao sợi thần kinh ác tính,

sarcom xương, và sarcom mô mềm; bệnh u phôi bào như u nguyên bào gan, u nguyên bào tuỷ, u nguyên bào thận, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào tủy, u nguyên bào màng phổi, và u nguyên bào võng mạc; khối u tế bào phôi; u lympho; và bệnh bạch cầu.

Chất chống ung thư theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất chống ung thư bổ sung. Ví dụ về chất chống ung thư bổ sung có thể bao gồm: chất alkyl hóa như xyclophosphamit, bendamustin, ifosfamid, và dacarbazin; chất chống chuyển hóa như pentostatin, fludarabin, cladribin, methotrexat, 5-flouraxil, 6-mercaptopurin, và enocitabin; thuốc hướng đích phân tử như rituximab, cetuximab, và trastuzumab; chất ức chế kinaza như imatinib, gefitinib, erlotinib, afatinib, dasatinib, sunitinib, và trametinib; chất ức chế proteasom như bortezomib; chất ức chế calcineurin như xyclosporin và tacrolimus; kháng sinh chống ung thư như idarubixin, doxorubixin, và mitomycin C; alkaloit thực vật như irinotecan và etoposide; thuốc chứa platin như cisplatin, oxaliplatin, và carboplatin; trị liệu hormon như tamoxifen và bicalutamit; và thuốc điều hoà miễn dịch như interferon, nivolumab, và pembrolizumab và tốt hơn là có thể bao gồm chất alkyl hóa và chất chống chuyển hóa.

Ví dụ về phương pháp để "sử dụng chất chống ung thư theo sáng chế kết hợp với chất chống ung thư bổ sung" có thể bao gồm phương pháp sử dụng chất chống ung thư bổ sung trong việc điều trị này, tiếp đó sử dụng chất chống ung thư theo sáng chế, phương pháp sử dụng đồng thời chất chống ung thư theo sáng chế và chất chống ung thư bổ sung, và phương pháp sử dụng chất chống ung thư theo sáng chế trong việc điều trị này, tiếp đó sử dụng chất chống ung thư bổ sung và tốt hơn là có thể bao gồm phương pháp sử dụng chất chống ung thư bổ sung trong việc điều trị này, tiếp đó sử dụng chất chống ung thư theo sáng chế. Việc sử dụng kết hợp chất chống ung thư theo sáng chế và chất chống ung thư bổ sung còn cải thiện hiệu quả điều trị đối với bệnh ung thư và có thể còn làm giảm phản ứng bất lợi của mỗi chất chống ung thư bằng cách giảm tần suất dùng hoặc liều lượng chất chống ung thư. Ngoài ra, chất chống ung thư bổ sung có thể được bao gồm trong chất chống ung thư theo sáng chế.

Ví dụ về khía cạnh thay thế 1 của sáng chế có thể bao gồm 1) phương pháp để điều trị bệnh ung thư, bao gồm bước dùng tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19 cho bệnh nhân cần điều trị bệnh ung thư, 2) tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19, để sử dụng làm chất chống ung thư, và 3) sử dụng tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19, để bào chế chất chống ung thư.

Ví dụ về khía cạnh thay thế 2 của sáng chế có thể bao gồm bộ kit để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19, chứa vector biểu hiện theo sáng chế. Bộ kit không bị giới hạn cụ thể miễn là bộ kit chứa vector biểu hiện theo sáng chế. Bộ kit có thể bao gồm sách hướng dẫn để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 theo sáng chế, và chất phản ứng để sử dụng trong việc đưa vector biểu hiện theo sáng chế vào tế bào có khả năng miễn dịch.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Lựa chọn các yếu tố điều hoà của chức năng miễn dịch

Ít nhất vài trăm loại phân tử khác nhau có thể điều hoà chức năng của tế bào T có mặt *in vivo*. Đầu tiên, các tác giả sáng chế đã lựa chọn IL-7 và CCL19 trong số lượng lớn sự kết hợp dựa vào kết quả hoặc thử nghiệm trước đó, làm phân tử điều hoà để nâng cao hơn hiệu quả điều hoà chức năng miễn dịch của tế bào có khả năng miễn dịch, và còn lựa chọn sự kết hợp của hai phân tử này, nghĩa là, sự kết hợp của IL-7 và CCL19, không tách riêng. Các tác giả sáng chế đã tạo ra vector để biểu hiện các yếu tố điều hoà này của chức năng miễn dịch tế bào có khả năng miễn dịch.

Tạo ra vector biểu hiện để biểu hiện IL-7 và CCL19 - 1

Mảnh ADN của CAR kháng FITC (SEQ ID NO: 9) mã hóa CAR kháng FITC bao gồm scFv kháng FITC, vùng xuyên màng CD8 của chuột nhắt, và môtip tín hiệu nội bào CD28-4-1BB-CD3 ζ của chuột nhắt, mảnh ADN F2A-MCS (SEQ ID NO: 10) mã hóa peptit 2A (F2A) được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 và vị trí tạo dòng (MCS) theo sau peptit, và mảnh ADN IL-7-F2A-CCL19 (SEQ ID NO: 11) mã hóa IL-7 của chuột nhắt (không có codon kết thúc) và F2A và CCL19 của chuột nhắt tiếp sau IL-7 của chuột nhắt được tổng hợp nhân tạo (Life Technologies Corp.).

Để tạo ra vector để biểu hiện IL-7 và CCL19, mảnh ADN của CAR kháng FITC và mảnh ADN F2A-MCS được liên kết để tạo ra cấu trúc CAR-F2A-MCS kháng FITC. Sau đó, cấu trúc tạo thành được tách dòng thành vector biểu hiện pMSGV retrovirus (Tamada et al., Clin Cancer Res 18: 6436-6445 (2002)) để tạo ra vector pMSGV chứa CAR-F2A-MCS kháng FITC. Mảnh ADN IL-7-F2A-CCL19 được chèn vào MCS của vector pMSGV bằng cách xử lý và gắn enzym giới hạn (NsiI và SalI) thu được vector pMSGV chứa CAR-F2A-IL-7-F2A-CCL19 kháng FITC (vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (1)). Bản đồ của vector thu được được thể hiện trên Fig. 1. Ngoài ra, mảnh ADN của CAR kháng FITC được tách dòng thành vector biểu hiện pMSGV retrovirus để tạo ra vector pMSGV IL-7 và CCL19 làm đối chứng (vector đối chứng (1)).

Tạo ra retrovirus được đưa vào vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19

Để tải nạp tế bào T của chuột nhắt, retrovirus được tạo ra. Dòng tế bào đóng gói GP2-293 (do Takara Bio Inc. sản xuất) được chuyển nhiễm vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (1) nêu trên hoặc vector đối chứng (1) và plasmit pCL-Eco (do Imgenex Corp. sản xuất) sử dụng Lipofectamin 2000 hoặc 3000 (do Life Technologies Corp. sản xuất) để tạo ra retrovirus được đưa vào vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (1) hoặc vector đối chứng (1).

DMEM được bổ sung 10% FCS, 100 U/ml penicillin, và 100 mg/ml streptomycin được sử dụng làm môi trường nuôi cấy đối với các tế bào GP2-293. RPMI-1640 được bổ sung 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50

mM 2-mercaptoethanol, và 2 mM L-glutamin được sử dụng làm môi trường nuôi cấy đối với các tế bào T được sử dụng trong các ví dụ nêu dưới đây.

Tải nạp tế bào T của chuột nhắt

Để tải nạp tế bào T của chuột nhắt, 3×10^6 tế bào T tinh sạch của chuột nhắt có nguồn gốc từ lách và hạch bạch huyết được hoạt hoá trong 48 giờ bằng mAb kháng CD3 (3 μ g/ml) và IL-2 (100 IU/ml) cố định. Sau đó, dịch nổi chứa retrovirus đã tạo ra được đưa vào vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (1) hoặc vector đối chứng (1) được trộn với tế bào T đã hoạt hoá của chuột nhắt nêu trên (1×10^6 tế bào/ml) trong đĩa phủ 25 μ g/ml RetroNectin (R) (do Takara Bio Inc. sản xuất). Sau khi ly tâm ở 1500 vòng/phút trong 2 giờ, các tế bào được nuôi cấy trong 6 giờ với sự có mặt của IL-2 (100 IU/ml). Để loại bỏ retrovirus ra khỏi môi trường nuôi cấy, tế bào T của chuột nhắt được thu hồi, chuyển đến môi trường nuôi cấy phát triển sạch (fresh growth culture medium - RPMI) chứa IL-2 (100 IU/ml), và được nuôi cấy tiếp trong 42 giờ thu được tế bào T của chuột nhắt được đưa vào vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (1) (tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 (1)) hoặc tế bào T của chuột nhắt được đưa vào vector đối chứng (1) (tế bào T đối chứng (1)).

Tạo ra vector biểu hiện để biểu hiện của IL-7 và CCL19 - 2

Vector pMSGV chứa CAR-F2A-IL-7-F2A-CCL19 kháng CD20 của người (vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (2)) được tạo ra theo cùng cách như trong phần "Tạo ra vector biểu hiện để biểu hiện IL-7 và CCL19 - 1" nêu trên ngoại trừ tạo ra vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (1) đã mô tả ở trên, trình tự của vùng scFv kháng FITC có trong trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9 được thay thế bằng trình tự của scFv kháng CD20 của người (SEQ ID NO: 12) được tổng hợp bởi Life Technologies Corp. dựa vào trình tự rituximab. Cũng vậy, vector pMSGV không có IL-7 và CCL19 (vector đối chứng (2)) được tạo ra theo cùng cách như trong phần "Tạo ra vector biểu hiện để biểu hiện IL-7 và CCL19 - 1" nêu trên ngoại trừ tạo ra vector đối chứng (1) đã mô tả ở trên, trình tự của vùng scFv kháng FITC có trong trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9 được thay thế bằng trình tự của scFv kháng CD20 của người (SEQ ID NO: 12). Vector

biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (2) hoặc vector đối chứng (2) được chuyển đến tế bào T của chuột nhắt sử dụng retrovirus theo cùng cách như nêu trên để tạo ra tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 (2) hoặc tế bào T đối chứng (2).

Ví dụ 2

Số lượng tế bào và khả năng sống được của tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19

Nghiên cứu được tiến hành để xem IL-7 hoặc CCL19 được tạo ra bởi tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 có thể hiện chức năng sinh học và bộc lộ tác dụng gây miễn dịch hay không. Mẫu chứa tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 đã tạo ra (2) (4×10^5 tế bào) hoặc tế bào T đối chứng (2) được nuôi cấy trong 5 ngày. Tiến hành nuôi cấy mà không kích thích kháng nguyên bằng CD20 để loại trừ ảnh hưởng của CAR CD20 của người đến sự biểu hiện của IL-7 và CCL19. Sau đó, xem xét số lượng tế bào và khả năng sống được bằng cách sử dụng chất chỉ thị màu xanh dương trypan. Các kết quả được thể hiện trên các Fig. 2A và Fig. 2B. Fig. 2A thể hiện số lượng tế bào, và Fig. 2B thể hiện khả năng sống được. Cột đặc thể hiện các kết quả về tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19, và cột trống thể hiện các kết quả về tế bào T đối chứng.

Kết quả

Như được thể hiện trên các Fig. 2A và Fig. 2B, số lượng tế bào và khả năng sống được của tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 (2) lần lượt là xấp xỉ 5 lần và xấp xỉ 2 lần, cao hơn so với số lượng tế bào và khả năng sống được của tế bào T đối chứng (2). Các kết quả này đã chứng minh rằng bằng cách sử dụng tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 được tạo ra bằng cách đưa vector biểu hiện theo sáng chế vào tế bào T, IL-7 hoặc CCL19 tác động đến chức năng sinh học và bộc lộ tác dụng gây miễn dịch.

Ví dụ 3

Thử nghiệm di trú tế bào T

Thử nghiệm di trú tế bào T sử dụng tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19

Tác dụng hấp dẫn hoá học của CCL19 được nghiên cứu bằng thử nghiệm di trú tế bào sử dụng Transwell. Các đặc điểm di trú của tế bào T đáp ứng được xác định bằng cách di trú thông qua bộ lọc polycarbonat có kích thước lỗ rỗng là 5 μm sử dụng khoang Transwell (R) 96 lỗ (Costar, do Corning, Inc. sản xuất). Đặc biệt, tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 (1) hoặc tế bào T đối chứng (1) được nuôi cấy ở khoang dưới. Tiến hành nuôi cấy mà không kích thích kháng nguyên bằng FITC để loại trừ ảnh hưởng của FITC CAR đến sự biểu hiện của IL-7 và CCL19. Tế bào T đáp ứng được lấy từ lách hoặc hạch bạch huyết bằng cách lựa chọn âm tính sử dụng MACS (do Miltenyi Biotec GmbH sản xuất). Tế bào T đáp ứng được đánh dấu bằng CytoTell màu xanh dương (do AAT Bioquest, Inc. sản xuất) và được nuôi cấy trong 3 giờ ở khoang trên. Sự di trú từ khoang trên xuống khoang dưới được xem xét bằng phân tích tế bào theo dòng chảy (EC800; do Sony Corp. sản xuất), và phần mềm FlowJo (do Tree Star, Inc. sản xuất) được sử dụng trong việc phân tích dữ liệu. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 3. Trên Fig. 3, cột đặc thể hiện các kết quả về tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 (1), cột trống thể hiện các kết quả về tế bào T đối chứng (1), và trục tung thể hiện số lượng tế bào T đáp ứng tuyệt đối được di trú đến khoang dưới. Sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê được nghiên cứu bằng thử nghiệm t của Student.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig. 3, tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19 (1) cho phép các tế bào T di trú đến khoang dưới bằng xấp xỉ 1,8 lần so với tế bào T đối chứng (1). Trong liệu pháp chuyển tế bào lympho (ví dụ, tế bào T), điều bất lợi đối với các tế bào ung thư bằng cách dùng tế bào T cũng quan trọng như vấn đề tiến trình, và ngoài ra, quan trọng là hoạt hoá các tế bào T nội sinh (= tế bào miễn dịch của chủ thể) ban đầu có mặt ở bệnh nhân ung thư và do đó tuyển chọn các tế bào này làm các tế bào tấn công tế bào ung thư. Nhằm mục đích này, không chỉ ưu tiên chuyển các tế bào lympho có hoạt tính kháng khối u từ bên ngoài mà còn gây ra sự tương tác hoạt tính giữa các tế bào T di chuyển và các tế bào T nội sinh bằng một số phương pháp sao cho các tế bào T nội sinh được tích tụ cục bộ đối với bệnh ung thư, xét từ việc nâng cao hiệu quả điều trị miễn dịch. Như đã thấy từ các kết quả trên Fig. 3, tế bào T biểu hiện IL-7/CCL19

(1) có khả năng tích tụ các tế bào T bên trong, chứng tỏ rằng có thể gây ra sự tương tác hoạt tính giữa các tế bào T di chuyển và các tế bào T nội sinh.

Các kết quả trên các Fig. 2A, Fig. 2B, và Fig. 3 đã chứng tỏ rằng tế bào T biểu hiện IL-7 và CCL19 có các tác dụng quan trọng, không thể thiếu đối với việc tạo ra tính miễn dịch, tăng sinh hiệu quả bằng IL-7, có khả năng sống được cao, và tích tụ các tế bào T qua CCL19, và có tác dụng gây miễn dịch rất tốt. Nói tóm lại, sự biểu hiện của hai phân tử điều hoà, nghĩa là, "IL-7" và "CCL19", trong các tế bào có khả năng miễn dịch thể hiện sự cải thiện về khả năng tăng sinh, khả năng sống được, và tác dụng gây miễn dịch của tế bào có khả năng miễn dịch. Hơn nữa, như đã nêu ở trên, tế bào T biểu hiện IL-7 và CCL19 có tất cả khả năng tăng sinh, khả năng sống sót, và khả năng tích tụ tế bào T, gợi ý khả năng các tế bào T có tác dụng xâm nhập vào các mô ung thư trên tế bào T hoặc tế bào tua và tác dụng ức chế phát triển khối u.

Ví dụ 4

Tạo ra vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 $\times$ HSV-TK

Trình tự nucleotit trong đó trình tự nucleotit mã hóa gen IL-7, gen CCL19 và gen tự sát HSV-TK được sắp xếp nối đuôi nhau để nằm bên sườn trình tự nucleotit mã hóa peptit tự phân cắt peptit 2A có thể được tách dòng thành vị trí tạo dòng của vector pMSGV1 để tạo ra vector để biểu hiện IL-7, CCL19, và HSV-TK. Bản đồ của vector này được thể hiện trên Fig. 4.

Tế bào có khả năng miễn dịch được đưa vào vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 $\times$ HSV-TK được tạo ra có khả năng điều hoà tế bào có khả năng miễn dịch trong đối tượng thử nghiệm bằng cách dùng ganciclovir cho đối tượng thử nghiệm tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch.

Ví dụ 5

Tạo ra vector biểu hiện TCR $\times$ IL-7 $\times$ CCL19

Trình tự nucleotit trong đó trình tự nucleotit mã hóa gen TCR, gen IL-7 và gen CCL19 được sắp xếp nối đuôi nhau để nằm bên sườn trình tự nucleotit mã hóa peptit tự phân cắt peptit 2A có thể được tách dòng thành vị trí tạo dòng của vector pMSGV1 để tạo ra vector để biểu hiện TCR, IL-7 và CCL19. Bản đồ của vector này được thể hiện trên Fig. 5.

Tế bào có khả năng miễn dịch được đưa vào vector biểu hiện TCR $\times$ IL-7 $\times$ CCL19 được tạo ra có khả năng gắn kết đặc hiệu không chỉ với kháng nguyên ung thư có mặt trên bề mặt tế bào ung thư mà còn cả phức hợp của peptit có nguồn gốc kháng nguyên ung thư được thể hiện bởi MHC trong các tế bào ung thư và có khả năng kích thích các tế bào T đặc hiệu đối với khoảng rộng các phân tử đích liên quan khối u.

Ví dụ 6

Tạo ra vector biểu hiện để biểu hiện IL-7, CCL19 và eGFP

Mảnh ADN IL-7-F2A-CCL19 mã hóa IL-7 của chuột nhắt (không có codon kết thúc) và F2A và CCL19 của chuột nhắt tiếp sau IL-7 của chuột nhắt được tổng hợp nhân tạo (Life Technologies Corp.).

Để tạo ra vector để biểu hiện IL-7, CCL19 và eGFP, mảnh ADN IL-7-F2A-CCL19 đã tổng hợp được chèn vào MCS của vector biểu hiện pMSGV retrovirus có trình tự F2A-eGFP (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18: 6436-6445 (2002)) bằng cách xử lý và gắn enzym giới hạn (NcoI và EcoRI) thu được vector pMSGV chứa mảnh ADN IL-7-F2A-CCL19-F2A-eGFP (SEQ ID NO: 13) (vector biểu hiện IL-7 $\times$ CCL19 (3)). Bản đồ của vector thu được được thể hiện trên Fig. 6. Ngoài ra, vector pMSGV chứa eGFP và không chứa IL-7 mà cũng không chứa CCL19 (vector đối chứng (3)) được tạo ra làm đối chứng. Trong SEQ ID NO: 13, các vị trí nucleotit từ 1 đến 462 là axit nucleic mã hóa IL-7 (các vị trí nucleotit từ 1 đến 75 là trình tự tín hiệu của IL-7), các vị trí nucleotit từ 463 đến 537 là axit nucleic mã hóa F2A, các vị trí nucleotit từ 538 đến 861 là axit nucleic mã hóa CCL19 (các vị trí nucleotit từ 538 đến 612 là trình tự tín hiệu của CCL19), các vị trí nucleotit từ 868 đến 942 là axit nucleic mã hóa F2A, các vị trí nucleotit từ 946 đến 1662 là axit nucleic mã hóa eGFP, và các vị trí nucleotit

từ 1663 đến 1665 là codon kết thúc. Trình tự axit amin tương ứng với trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 13 được thể hiện trong SEQ ID NO: 14. Để sử dụng enzym giới hạn NcoI, thymin (t) ở vị trí nucleotit 4 trong SEQ ID NO: 13 được thay thế bằng guanin (g) (phenylalanin (F) ở vị trí axit amin 2 trong SEQ ID NO: 14 được thay thế bằng valin (V)).

Tạo ra các tế bào T biểu hiện TCR, IL-7, CCL19, và eGFP đặc hiệu đối với kháng nguyên khối u P815 P1A

Các tế bào lách thu được từ chuột nhắt chuyển gen biểu hiện TCR giới hạn H-2L^d đặc hiệu đối với kháng nguyên khối u P815 P1A (Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X.-F. Bai, Y. Liu. 1999. J. Exp. Med. 189: 811) thu được từ Y. Liu. Thu được tế bào T của chuột nhắt biểu hiện TCR đặc hiệu đối với kháng nguyên khối u P815 P1A có nguồn gốc từ các tế bào lách (tế bào TCR-T đặc hiệu P1A). Sau đó, retrovirus được đưa vào vector biểu hiện IL-7 × CCL19 (3) hoặc vector đối chứng (3) được tạo ra theo cùng cách như trong Ví dụ 1. Tế bào được hoạt hóa bằng peptit P1A trong 48 giờ được tải nạp với các tế bào lách (3×10^6 tế bào/lỗ) bao gồm tế bào TCR-T đặc hiệu P1A thu được tế bào T biểu hiện TCR/IL-7/CCL19/eGFP đặc hiệu P1A hoặc tế bào T biểu hiện TCR/eGFP đặc hiệu P1A. Sự tải nạp với mỗi vector biểu hiện được xác nhận bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy để dò eGFP làm chất đánh dấu thay thế. Các mức biểu hiện eGFP tương ứng của các tế bào T thu được là từ 70% đến 80% trong tất cả các thử nghiệm.

Vào ngày 0, lượng 5×10^5 tế bào của u tế bào bón P815 được tạo huyền phù trong 0,1 ml HBSS được cấy dưới da vào hông của mỗi con chuột nhắt đực DBA/2 khoảng 6 đến 10 tuần tuổi ($n = 30$). Vào ngày 6, chuột nhắt được chiếu xạ ở liều dưới mức gây chết (3 đến 5 Gy) đối với điều kiện quy định trước. Vào ngày 7, chuột nhắt được chia thành 3 nhóm ($n = 10$). Tế bào T biểu hiện TCR/IL-7/CCL19/eGFP đặc hiệu P1A hoặc tế bào T biểu hiện TCR/eGFP đặc hiệu P1A (cả hai tế bào là 70% đến 80% dương tính eGFP) được dùng trong tĩnh mạch ở 1×10^6 tế bào đối với mỗi con chuột nhắt. Sau đó, tỷ lệ sống sót của mỗi con chuột nhắt được phân tích trong khi đo thể tích

khối u của chuột nhất đã chết. Các kết quả phân tích tỷ lệ sống sót của mỗi con chuột nhất được thể hiện trên Fig. 7, và các kết quả đo thể tích khối u của chuột nhất đã chết được thể hiện trên Fig. 8.

Trên Fig. 7, ▲ là các kết quả về chuột nhất không được điều trị, ■ là các kết quả về chuột nhất sinh ra tế bào T biểu hiện TCR/eGFP đặc hiệu P1A, ● là các kết quả về chuột nhất sinh ra tế bào T biểu hiện TCR/IL-7/CCL19/eGFP đặc hiệu P1A, trục hoành là số ngày (ngày) sau khi cấy u tế bào bón P815 dưới da, và trục tung là tỷ lệ sống sót (%). 80% chuột nhất sinh ra tế bào T biểu hiện TCR/IL-7/CCL19/eGFP đặc hiệu P1A còn sống sót vào ngày 60, và 50% trong số đó còn sống sót sau 100 ngày. Do đó, việc sử dụng tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện TCR, IL-7 và CCL19 đặc hiệu P1A đã cho thấy tác dụng kháng khối u và ngăn ngừa việc giảm về tỷ lệ sống sót do khối u gây ra.

Trên Fig. 8, trục hoành là số ngày (ngày) sau khi cấy u tế bào bón P815 dưới da, và trục tung là thể tích khối u (mm³). Như đã thấy rõ từ Fig. 8, việc tăng thể tích khối u bị ngăn chặn rõ rệt ở chuột nhất sinh ra tế bào T biểu hiện TCR/IL-7/CCL19/eGFP đặc hiệu P1A, chứng tỏ rằng tế bào T biểu hiện TCR/IL-7/CCL19/eGFP đặc hiệu P1A có hoạt tính kháng khối u rất tốt và có tác dụng điều trị cho bệnh ung thư dạng rắn.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện IL-7 × CCL19 theo sáng chế có tất cả khả năng tăng sinh, khả năng sống sót và khả năng tích tụ tế bào lympho và do đó áp dụng được trong lĩnh vực liệu pháp miễn dịch.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào có khả năng miễn dịch biểu hiện phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, interleukin 7 (IL-7), và CCL19.
2. Tế bào có khả năng miễn dịch theo điểm 1, trong đó tế bào có khả năng miễn dịch bao gồm axit nucleic mã hóa IL-7 được đưa từ bên ngoài tế bào vào và axit nucleic mã hóa CCL19 được đưa từ bên ngoài tế bào vào.
3. Tế bào có khả năng miễn dịch theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư là thụ thể tế bào T nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư.
4. Tế bào có khả năng miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó tế bào có khả năng miễn dịch này là tế bào T.
5. Tế bào có khả năng miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng nguyên ung thư là WT1, MART-1, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, Glypican-3, KIF20A, Survivin, AFP-1, gp100, MUC1, PAP-10, PAP-5, TRP2-1, SART-1, VEGFR1, VEGFR2, NEIL3, MPHOSPH1, DEPDC1, FOXM1, CDH3, TTK, TOMM34, URLC10, KOC1, UBE2T, TOPK, ECT2, MESOTHELIN, NKG2D, P1A, GD2, hoặc GM2.
6. Vector biểu hiện để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, là vector bất kỳ trong số các vector từ (a) đến (e) sau:
 - (a) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7, và axit nucleic mã hóa CCL19;
 - (b) hai vector biểu hiện (b-1) và (b-2) sau:
 - (b-1) vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư; và

(b-2) vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19;

(c) hai vectơ biểu hiện (c-1) và (c-2) sau:

(c-1) vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa IL-7; và

(c-2) vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa CCL19;

(d) hai vectơ biểu hiện (d-1) và (d-2) sau:

(d-1) vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7; và

(d-2) vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa CCL19; và

(e) ba vectơ biểu hiện (e-1), (e-2) và (e-3) sau:

(e-1) vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư;

(e-2) vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa IL-7; và

(e-3) vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa CCL19.

7. Vectơ biểu hiện theo điểm 6, trong đó phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư là thụ thể tế bào T nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư.

8. Vectơ biểu hiện theo điểm 6 hoặc điểm 7, trong đó:

axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, axit nucleic mã hóa IL-7, và axit nucleic mã hóa CCL19 trong vectơ biểu hiện (a); hoặc axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 trong vectơ biểu hiện (b-2); hoặc

axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa IL-7 trong vector biểu hiện (c-1); hoặc

axit nucleic mã hóa phân tử bề mặt tế bào nhận diện đặc hiệu kháng nguyên ung thư, và axit nucleic mã hóa CCL19 trong vector biểu hiện (d-2)

được liên kết qua trình tự mã hóa peptit tự phân cắt.

9. Vector biểu hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát.

10. Chất chống ung thư chứa tế bào có khả năng miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và chất phụ gia được dùng.

Fig. 1

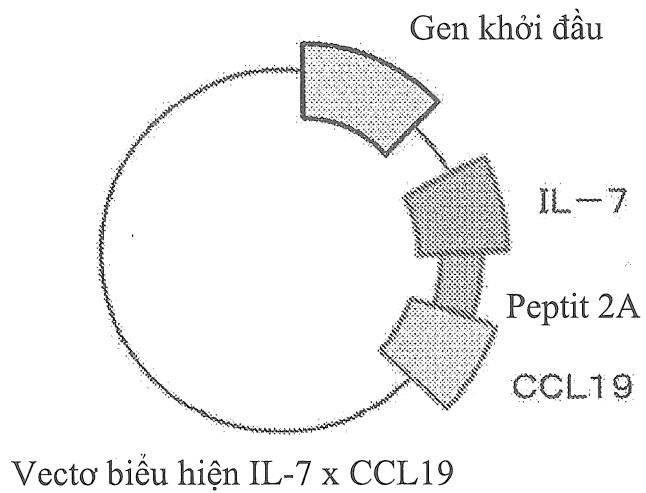


Fig. 2A

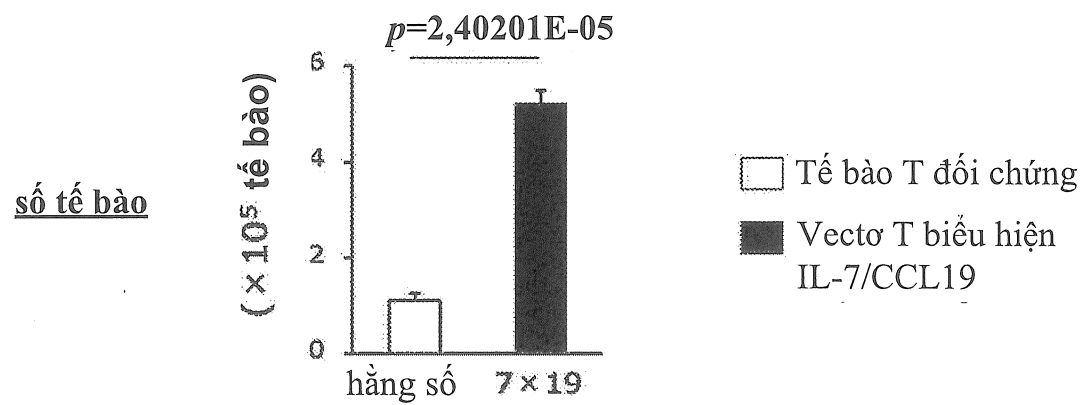


Fig. 2B

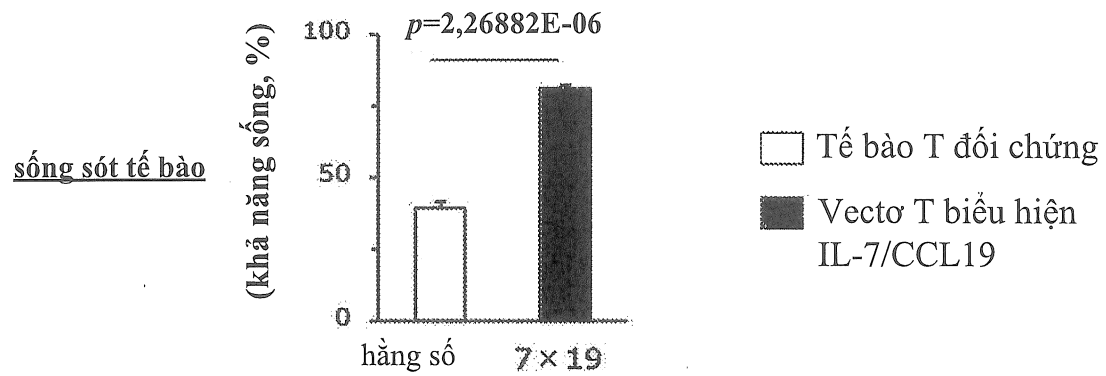


Fig. 3

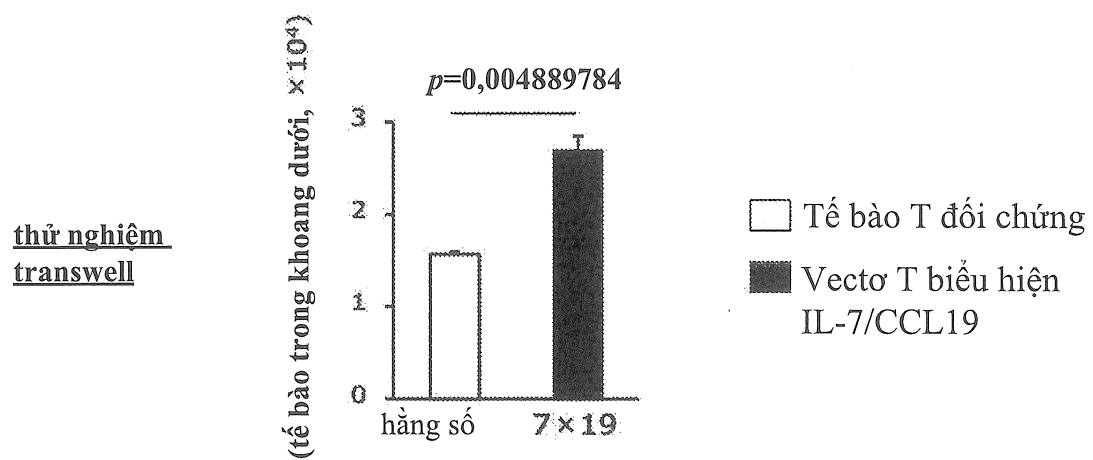
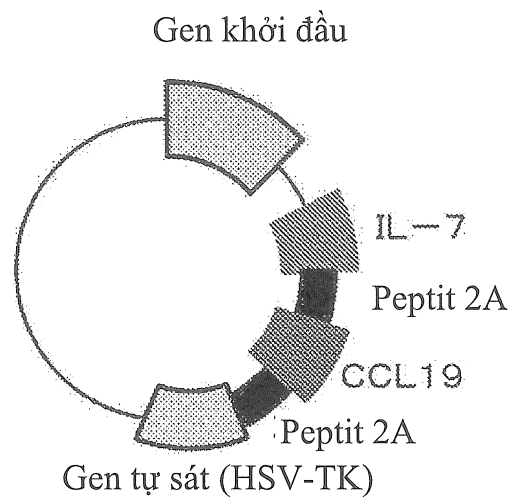
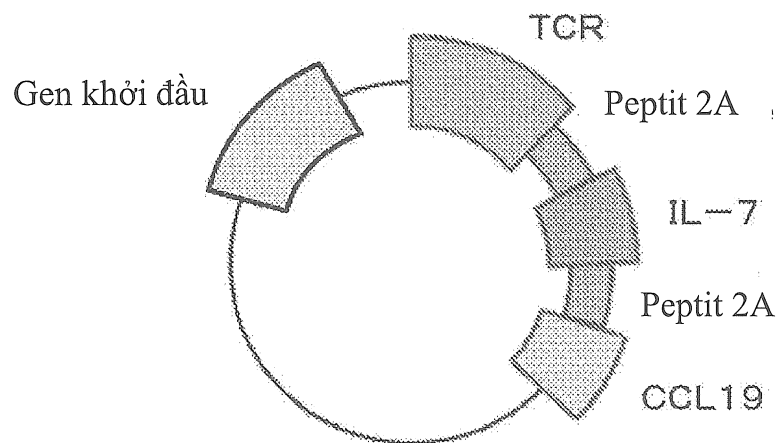


Fig. 4



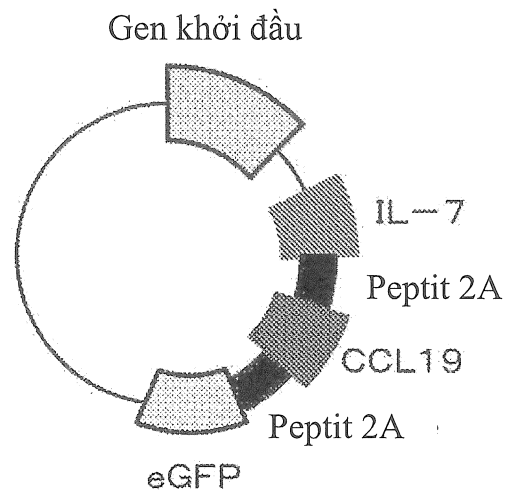
Vectơ biểu hiện IL-7 x CCL19 x HSV-TK

Fig. 5



Vectơ biểu hiện TCR IL-7 x CCL19

Fig. 6



Vecto biểu hiện IL-7 x CCL19 x eGFP

Fig. 7

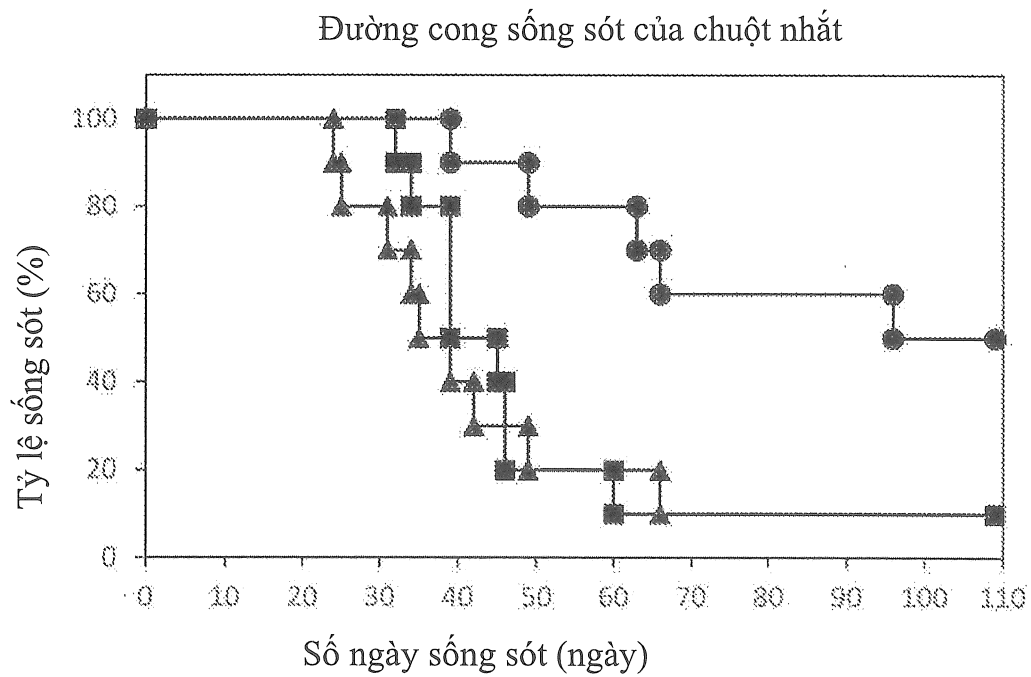
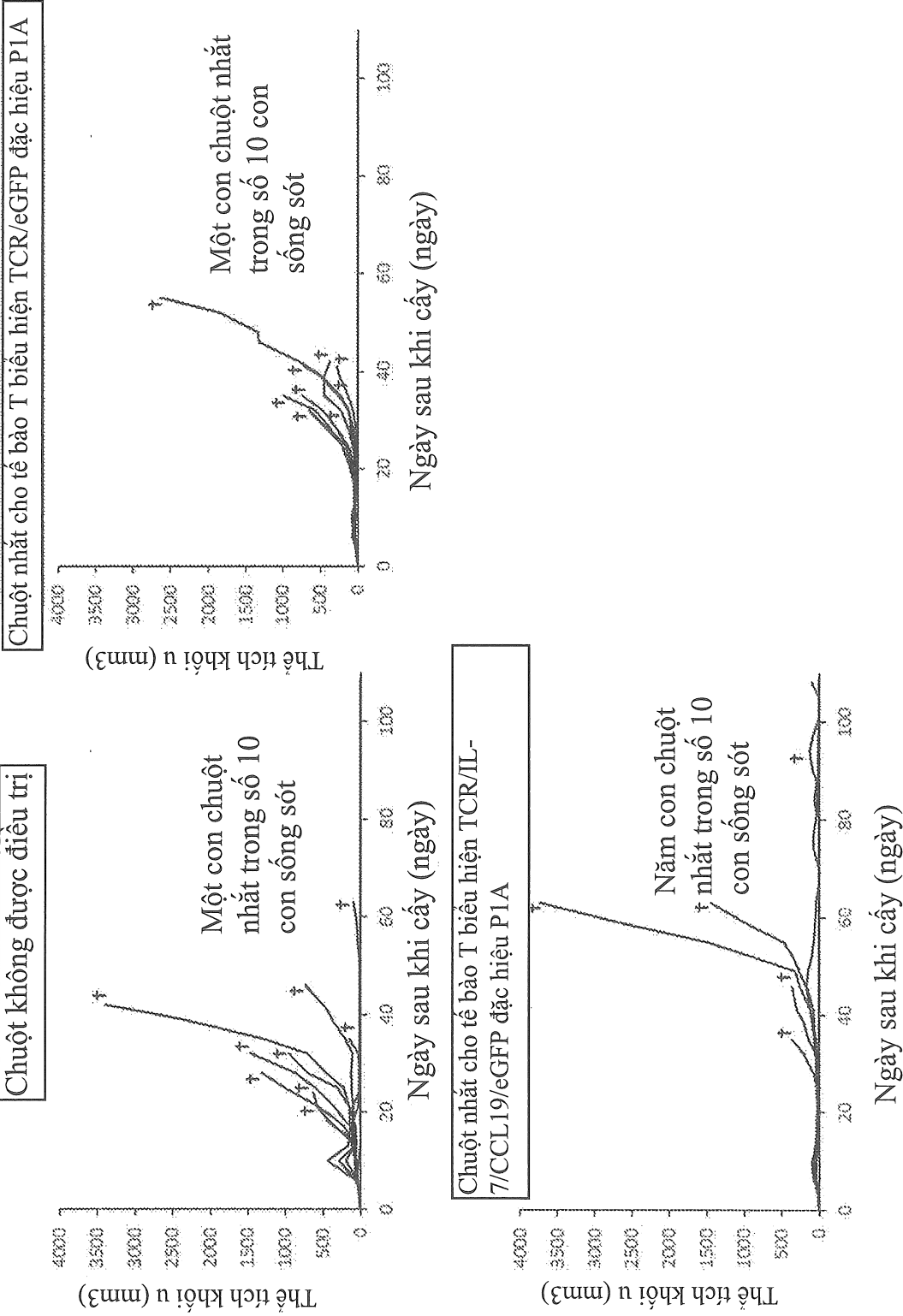


Fig. 8



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> YAMAGUCHI UNIVERSITY
 <120> Tế bào có khả năng miễn dịch và vector biểu hiện để tạo ra tế bào có khả năng miễn dịch này
 <130> FH28-007w0
 <150> JP 2016-053913
 <151> 2016-03-17
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> IL-7 ở người
 <220>
 <223> Tác giả: Tamada, Koji
 Tác giả: Sakoda, Yukimi
 Tác giả: Adachi, Keishi
 <400> 1
 Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
 20 25 30
 Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
 35 40 45
 Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
 50 55 60
 Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
 65 70 75 80
 Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
 85 90 95
 Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
 100 105 110
 Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
 115 120 125
 Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
 130 135 140
 Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
 145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175

His

<210> 2
<211> 98
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> CCL19 ở người

<400> 2

Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Trp Thr Ser Pro
1 5 10 15

Ala Pro Thr Leu Ser Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser
20 25 30

Val Thr Gln Lys Pro Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr
35 40 45

Leu Leu Ile Lys Asp Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr
50 55 60

Leu Arg Gly Arg Gln Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu
65 70 75 80

Arg Ile Ile Gln Arg Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg
85 90 95

Ser Ser

<210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi 5'-R

<400> 3
gtctaccagg cattcgcttc at

22

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi 3-TRa-C

<400> 4
 tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi 3-TRb-C1

<400> 5
 tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi 3-TRbeta-C2

<400> 6
 ctacgctctg gaatcctttc tctt 24

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng phân cắt peptit 2A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Val hoặc Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> axit amin bất kỳ

<400> 7
 Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
 1 5

<210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> 2Apeptit(F2A)

<400> 8
 Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 9
<211> 1674
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> kháng-FITC CAR

<400> 9
atggagttgc ctgttaggtt gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat 60
gtcgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttgcatat ctatgcagag ccttgtagac agtaatggaa acacctatct acgttggtac 180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaaggct ctgatctaca aagtttccaa cggattttct 240
ggggtcccag acaggttcag tggcagtggg tcaggagacg atttcacact caagatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtgg 360
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaaagtagtg ctgatgatgc taagaaggat 420
gctgctaaga aggatgatgc taagaaggat gatgctaaga aggatggtga ggtgaagctg 480
gatgagactg gaggaggctt ggtgcaacct gggaggccca tgaaactctc ctgtgttgcc 540
tctggattca ctttttagtg ctactggatg aactgggtcc gccagtctcc agagaaagga 600
ctggagtggg tagcacaat tagaaacaaa cttataatt atgaaacata ttattcagat 660
tctgtgaaag gcagattcac catctcaaga gatgattcca aaagtagtgt ctacctgcaa 720
atgaacaact taagagttga agacatgggt atctattact gtacgggttc ttactatggt 780
atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctccg cggccgcagt cgtgccagtc 840
cttcagaaag tgaactctac tactaccaag ccagtgtgct gaactccctc acctgtgcac 900
cctaccggga catctcagcc ccagagacca gaagattgtc ggccccgtgg ctcagtgaag 960
gggaccggat tggacttcgc ctgtgatatt tacatctggg cacccttggc cggaatctgc 1020
gtggcccctc tgctgtcctt gatcatcact ctcatctgct accacaggag ccgaaatagt 1080
agaaggaaca gactccttca aagtactac atgaacatga ctccccggag gcctgggctc 1140
actcgaaagc cttaccagcc ctacgcccct gccagagact ttgcagcgta ccgccccaaa 1200
tggatcagga aaaaattccc ccacatattc aagcaaccat ttaagaagac cactggagca 1260
gctcaagagg aagatgcttg tagctgccga tgtccacagg aagaagaagg aggaggagga 1320
ggctatgagc tgagagcaaa attcagcagg agtgagagga ctgctgcaa cctgcaggac 1380
cccaaccagc tctacaatga gctcaatcta gggcgaagag aggaatatga cgtcttggag 1440
aagaagcggg ctcggtatcc agagatggga ggcaaacagc agaggaggag gaacccccag 1500
gaaggcgtat acaatgcact gcagaaagac aagatggcag aagcctacag tgagatcggc 1560
acaaaaggcg agaggcggag aggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagcact 1620
gccaccaagg acacctatga tgccctgcat atgcagaccc tggcccctcg ctaa 1674

<210> 10
 <211> 146
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> F2A-MCS

<400> 10
 ggaagcggag tgaaacagac tttgaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60
 tccaaccctg gaccatgcat aaaaagctta aaccagttta ctggaaaacg cgtaaagtcg 120
 acaaaggcca aaaaggcca cgtacg 146

<210> 11
 <211> 864
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> IL-7 của chuột nhắt-F2A-CCL19 của chuột nhắt

<400> 11
 atgttccatg tttcttttag atatatcttt ggaattcctc cactgacctt tgttctgctg 60
 cctgtcacat catctgagtg ccacattaaa gacaaagaag gtaaagcata tgagagtgtg 120
 ctgatgatca gcatcgatga attggacaaa atgacaggaa ctgatagtaa ttgcccgaat 180
 aatgaaccaa acttttttag aaaacatgta tgtgatgata caaaggaagc tgcttttcta 240
 aatcgtgctg ctgcgaagtt gaagcaattt cttaaaatga atatcagtga agaattcaat 300
 gtccacttac taacagtatc acaaggcaca caaactctgg tgaactgcac aagtaaggaa 360
 gaaaaaacg taaaggaaca gaaaaagaat gacgcatgtt tcctaaagag actactgaga 420
 gaaataaaaa cttgttggaa taaaattttg aagggcagta taggaagcgg agtgaaacag 480
 actttgaatt ttgaccttct caagttggcg ggagacgtgg agtccaaccc tggacctatg 540
 gcccccgctg tgacccact cctggccttc agcctgctgg ttctctggac cttcccagcc 600
 ccaactctgg ggggtgctaa tgatgcggaa gactgctgcc tgtctgtgac ccagcgcccc 660
 atccctggga acatcgtgaa agccttccgc taccttctta atgaagatgg ctgcagggtg 720
 cctgctgttg tgttcaccac actaaggggc tatcagctct gtgcacctcc agaccagccc 780
 tgggtggatc gcatcatccg aagactgaag aagtcttctg ccaagaacaa aggcaacagc 840
 accagaagga gccctgtgtc ttga 864

<210> 12
 <211> 783
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> scFV CD20 kháng người

<400> 12
 atggactgga cctggcggat cctgttcctg gtggctgctg ctacaggcgc ccacagccag 60

atcgtgctgt ctcagtctcc cgccatcctg tctgctagcc ctggcgagaa agtgaccatg 120
 acctgcagag ccagcagcag cgtgtcctac atccactggt tccagcagaa gcccggcagc 180
 agccccaagc cttggatcta cgccacaagc aacctggcct ctggcgtgcc agtgcggttt 240
 agcggctctg gctctggcac cagctacagc ctgaccatca gcagagtgga agccgaggac 300
 gccgccacct actactgtca gcagtggacc agcaaccccc ccacattcgg cggaggcacc 360
 aagctggaaa tcaagggcgg agggcgatct ggcgggcgag gatctggggg agggcgctct 420
 caggtgcagc tgcagcagcc tggcgctgag ctcgtgaaac ctggcgccctc cgtgaagatg 480
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcaca agctacaaca tgcactgggt caagcagacc 540
 cctggcagag gcctggaatg gatcggcgct atctaccccg gcaacggcga cacctcctac 600
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accgccgaca agagcagcag cacagcctac 660
 atgcagctgt cctccctgac cagcaggagc agcgccgtgt actactgcmc cagatctacc 720
 tactacggcg gcgactggta cttcaacgtg tggggcgctg gcaccaccgt gaccgtgtct 780
 gct 783

<210> 13
 <211> 1665
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> IL-7 của chuột nhắt-F2A-CCL19 của chuột nhắt-F2A-eGFP

<400> 13
 atggtccacg tctccttcag atacatcttc ggcatcccc ccctgatcct ggtcctcctg 60
 cctgtcacct ccagcgaatg tcatatcaag gacaaagagg gcaaggctta tgagagcgtc 120
 ctgatgatct ccattgatga gctggataag atgaccggca ccgacagcaa ctgtcccaac 180
 aatgagccca acttcttttag aaagcacgtg tgtgacgata ccaaggaggc tgccttcctg 240
 aacagggccg ccagaaagct gaagcagttc ctgaagatga acatttccga ggagttcaac 300
 gtgcacctcc tcaccgtgag ccagggcacc cagacactgg tcaattgcac ctccaaggag 360
 gagaagaacg tgaaagagca gaaaaagaat gatgcttgtt tcctcaagag gctgctgagg 420
 gagatcaaga cctgttggaa taagatcctg aaaggcagca tcggcagcgg agtcaagcaa 480
 accctgaact tcgacctgct gaaactggcc ggagatgtgg agagcaatcc cggccctatg 540
 gccccagag tcacctctct gctggccttc agcctgctcg tgctgtggac cttccccgct 600
 cccaccctgg gcggcgccaa tgatgctgag gactgttgcc tctccgtgac ccagaggccc 660
 atccctggaa acatcgtcaa agccttcagg tacctgtca acgaagacgg atgtagggtg 720
 cctgccgtgg tgttcacaac actgagaggc taccagctct gcgcccctcc tgatcagccc 780
 tgggtcgaca gaatcatcag aaggctgaag aagtccagcg ccaagaacaa aggcaatagc 840
 acaaggagaa gccctgtgag cgaattcgga agcggagtga aacagacttt gaattttgac 900
 cttctcaagt tggcgggaga cgtggagtcc aaccctggac catgcatggt gagcaagggc 960

gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc ctggtcgagc tggacggcga cgtaaaccgc 1020
 cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg 1080
 aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccctg 1140
 acctacggcg tgcagtgttt cagccgtac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc 1200
 aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgacca tcttcttcaa ggacgacggc 1260
 aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag 1320
 ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac 1380
 tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caaggtaac 1440
 ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag 1500
 aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca accactacct gagcaccgag 1560
 tccgcctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggtcctgct ggagttcgtg 1620
 accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa 1665

<210> 14
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Axit amin IL-7 của chuột nhắt-F2A-CCL19 của chuột nhắt-2A-eGFP

<400> 14

Met Val His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Thr Ser Ser Glu Cys His Ile Lys Asp Lys
20 25 30

Glu Gly Lys Ala Tyr Glu Ser Val Leu Met Ile Ser Ile Asp Glu Leu
35 40 45

Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asn Cys Pro Asn Asn Glu Pro Asn
50 55 60

Phe Phe Arg Lys His Val Cys Asp Asp Thr Lys Glu Ala Ala Phe Leu
65 70 75 80

Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe Leu Lys Met Asn Ile Ser
85 90 95

Glu Glu Phe Asn Val His Leu Leu Thr Val Ser Gln Gly Thr Gln Thr
100 105 110

Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu Glu Lys Asn Val Lys Glu Gln Lys
115 120 125

Lys Asn Asp Ala Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr
 130 135 140
 Cys Trp Asn Lys Ile Leu Lys Gly Ser Ile Gly Ser Gly Val Lys Gln
 145 150 155 160
 Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
 165 170 175
 Pro Gly Pro Met Ala Pro Arg Val Thr Pro Leu Leu Ala Phe Ser Leu
 180 185 190
 Leu Val Leu Trp Thr Phe Pro Ala Pro Thr Leu Gly Gly Ala Asn Asp
 195 200 205
 Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser Val Thr Gln Arg Pro Ile Pro Gly Asn
 210 215 220
 Ile Val Lys Ala Phe Arg Tyr Leu Leu Asn Glu Asp Gly Cys Arg Val
 225 230 235 240
 Pro Ala Val Val Phe Thr Thr Leu Arg Gly Tyr Gln Leu Cys Ala Pro
 245 250 255
 Pro Asp Gln Pro Trp Val Asp Arg Ile Ile Arg Arg Leu Lys Lys Ser
 260 265 270
 Ser Ala Lys Asn Lys Gly Asn Ser Thr Arg Arg Ser Pro Val Ser Glu
 275 280 285
 Phe Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu
 290 295 300
 Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Cys Met Val Ser Lys Gly
 305 310 315 320
 Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
 325 330 335
 Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp
 340 345 350
 Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys
 355 360 365
 Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val
 370 375 380
 Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe
 385 390 395 400

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
 405 410 415

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
 420 425 430

Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 435 440 445

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His
 450 455 460

Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn
 465 470 475 480

Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
 485 490 495

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
 500 505 510

Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
 515 520 525

Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
 530 535 540

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 545 550