



(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)



1-0026353

(51)⁷ C12N 9/22; C07K 16/28; C12N 15/63; (13) B
C07K 14/725; C07K 19/00

(21) 1-2015-04633

(22) 12/05/2014

(86) PCT/EP2014/059662 12/05/2014

(87) WO 2014/184143 A1 20/11/2014

(30) 13/892,805 13/05/2013 US; PCT/US2013/040766 13/05/2013 US;
PCT/US2013/040755 13/05/2013 US; 61/888,259 08/10/2013 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 27/06/2016 339A

(73) CELLECTIS (FR)

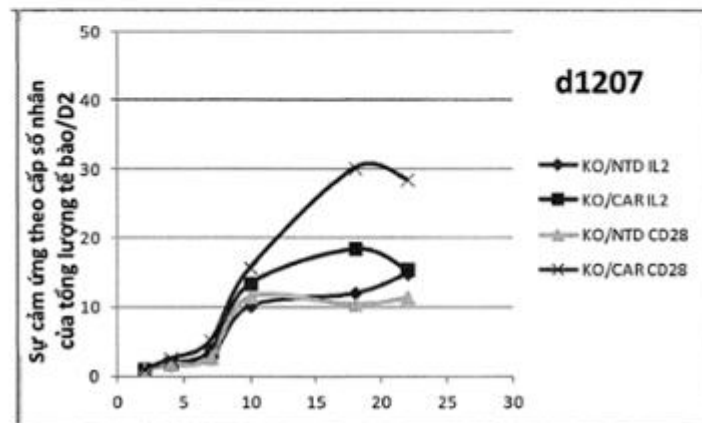
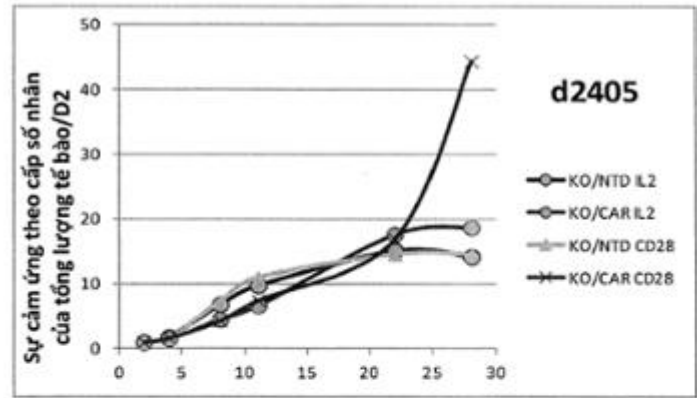
8 Rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France

(72) Roman GALETTO (IT); Julianne SMITH (FR); Cécile SCHIFFER-MANNIOUI
(FR); Andrew SCHARENBERG (US).

(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) THỤ THỂ KHÁNG NGUYÊN DẠNG KHẢM ĐẶC HIỆU CD19,
POLYNUCLEOTIT, VECTƠ BIỂU HIỆN MÃ HÓA CHO THỤ THỂ NÀY, TẾ
BÀO MIỄN DỊCH BIỂU HIỆN THỤ THỂ NÀY TRÊN BỀ MẶT VÀ PHƯƠNG
PHÁP THIẾT KẾ TẾ BÀO MIỄN DỊCH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR) đặc hiệu CD19. Các CAR có thể làm chuyển hướng tính đặc hiệu và khả năng phản ứng của tế bào miễn dịch theo hướng đến một mục tiêu chọn lọc lợi dụng đặc tính của vùng liên kết với phối tử. Cụ thể, sáng chế đề cập đến một thụ thể kháng nguyên dạng khảm trong đó phối tử ngoại bào gắn được là một scFV có nguồn gốc từ một kháng thể đơn dòng CD19, tốt hơn là 4G7. Sáng chế cũng đề cập đến các polynucleotit, các vectơ mã hóa CAR nói trên và các tế bào được phân lập biểu hiện CAR trên bề mặt của chúng. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp thiết kế các tế bào miễn dịch biểu hiện 4G7-CAR trên bề mặt mà tạo ra trạng thái “hoạt hóa” kéo dài ở tế bào tải nạp. Sáng chế đặc biệt hữu dụng để điều trị bệnh ung thư hạch bạch huyết và bệnh bạch cầu tế bào B.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR) đặc hiệu CD19. Các CAR có thể làm chuyển hướng đặc hiệu và khả năng phản ứng của tế bào miễn dịch theo hướng đến một mục tiêu chọn lọc lợi dụng đặc tính vùng liên kết với phối tử. Cụ thể, sáng chế đề cập đến thụ thể kháng nguyên dạng khảm trong đó phối tử ngoại bào gắn được là kháng thể mạch đơn (scFv) có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng CD19, tốt nhất là 4G7. Sáng chế cũng đề cập đến các polynucleotit, các vector mã hóa CAR nói trên và các tế bào đã được phân lập biểu hiện CAR trên bề mặt của chúng. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp thiết kế các tế bào miễn dịch in vitro hoặc ex vivo biểu hiện 4G7-CAR trên bề mặt mà tạo ra trạng thái “hoạt hóa” kéo dài ở tế bào tải nạp. Sáng chế đặc biệt hữu ích cho việc điều trị bệnh ung thư hạch bạch huyết và bệnh bạch cầu tế bào B.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Liệu pháp miễn dịch đáp ứng, trong đó bao gồm việc vận chuyển của các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên tự thân được tạo ra ngoài cơ thể, là một chiến lược đầy hứa hẹn để điều trị các bệnh truyền nhiễm do virus và bệnh ung thư. Các tế bào T được sử dụng cho liệu pháp miễn dịch đáp ứng có thể được tạo ra bằng cách phát triển các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên hoặc chuyển hướng của các tế bào T thông qua kỹ thuật gen (Park, Rosenberg và cộng sự 2011). Việc chuyển nạp các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên virus là một phương thức đã tồn tại từ lâu được sử dụng cho việc điều trị nhiễm virus sau cấy ghép và các khối u ác tính liên quan đến virus hiểm. Tương tự như vậy, việc phân lập và chuyển nạp các tế bào T đặc hiệu với khối u đã được chứng minh là thành công trong việc điều trị u ác tính.

Các đặc tính mới của các tế bào T đã được tạo ra một cách thành công thông qua việc chuyển gen của các thụ thể tế bào T chuyển gen hoặc các thụ thể kháng

nguyên dạng khảm (CAR) (Jena, Dotti và cộng sự 2010). Các CAR là các thụ thể tổng hợp bao gồm một nhóm chức nhắm đích liên kết với một hoặc nhiều vùng tín hiệu trong một phân tử dung hợp đơn. Nói chung, nhóm chức liên kết của một CAR bao gồm một vùng liên kết kháng nguyên của một kháng thể mạch đơn (scFv), bao gồm các chuỗi nhẹ và các đoạn biến đổi của một kháng thể đơn dòng được nối lại bởi một mối liên kết linh hoạt. Việc kết nối các nhóm chức dựa trên các vùng thụ thể hoặc phối tử cũng đã được sử dụng thành công. Các vùng tín hiệu của các CAR thế hệ thứ nhất có nguồn gốc từ vùng tế bào chất của CD3zeta hoặc chuỗi gamma của thụ thể Fc. Các CAR thế hệ thứ nhất đã được chỉ ra là chuyển hướng thành công khả năng gây độc của tế bào T, tuy nhiên chúng đã không tạo ra sự phát triển kéo dài và hoạt động chống lại khối u trong cơ thể. Các vùng tín hiệu từ các phân tử đồng kích thích bao gồm CD28, OX-40 (CD134), và 4-1BB (CD137) được thêm vào một cách đơn lẻ (thế hệ thứ hai) hoặc kết hợp (thế hệ thứ ba) để nâng cao tỷ lệ sống và gia tăng sự tăng sinh của các tế bào T được biến đổi CAR. Các CAR đã cho phép các tế bào T chuyển hướng chống lại các kháng nguyên biểu hiện trên bề mặt các tế bào ung thư từ các khối u ác tính khác nhau bao gồm ung thư hạch bạch huyết và các khối u rắn (Jena, Dotti và cộng sự 2010).

CD19 là một mục tiêu hấp dẫn cho liệu pháp miễn dịch vì phần lớn bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính B (B-ALL) đều biểu hiện CD19, trong khi đó sự biểu hiện này không có ở các tế bào không tạo máu, cũng như các tế bào tủy, tế bào hồng cầu, tế bào T và các tế bào gốc tủy xương. Các thử nghiệm lâm sàng nhắm đến CD19 trên các khối u ác tính tế bào B được tiến hành với việc kích thích các phản ứng chống lại khối u. Phần lớn được truyền các tế bào T được biến đổi gen để biểu hiện một thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR) với tính đặc hiệu có nguồn gốc từ vùng scFv của một kháng thể đơn dòng từ chuột FMC63 đặc hiệu CD19 (Nicholson, Lenton và cộng sự 1997; Cooper, Topp và cộng sự 2003; Cooper, Jena và cộng sự 2012) (Đơn đăng ký quốc tế: WO2013/126712). Tuy nhiên, vẫn tồn tại một nhu cầu cải thiện cấu trúc của các CAR mà cho thấy khả năng tương thích tốt hơn với sự tăng sinh tế bào T, để cho phép các tế bào biểu hiện các CAR như vậy đạt được lợi ích lâm sàng đáng kể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tạo ra thụ thể dạng khảm đặc hiệu CD19 (4G7-CAR) bao gồm một scFv có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng đặc hiệu CD19, 4G7, và bất ngờ phát hiện ra rằng việc đem 4G7-CAR tạo ra vào các tế bào T nguyên thủy có thể tạo ra trạng thái “hoạt hóa” kéo dài ở tế bào tải nạp độc lập với việc liên kết với kháng nguyên. Sau khi hoạt hóa không đặc hiệu trong ống nghiệm (ví dụ như với các hạt phủ anti-CD3/CD28 và IL2 tái tổ hợp), các tế bào này đã bộc lộ kích thước tế bào tăng (dạng blast) cũng như biểu hiện các chỉ thị hoạt hóa (CD25) trong một khoảng thời gian kéo dài so với các tế bào được tải nạp với một CAR tương tự bao gồm scFv FMC63. Việc kích hoạt dài hạn cho phép sự tăng sinh kéo dài và tạo ra một cơ chế không phụ thuộc kháng nguyên cho sự tăng sinh của các tế bào 4G7-CAR trong ống nghiệm.

Để đạt được mục đích trên đây, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thụ thể kháng nguyên dạng khảm bao gồm ít nhất một vùng liên kết phối tử ngoại bào, một vùng xuyên màng và ít nhất một vùng chuyển đổi tín hiệu, trong đó vùng liên kết phối tử ngoại bào bao gồm một scFv có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng đặc hiệu, 4G7. Đặc biệt, CAR theo sáng chế ngay khi được tải nạp vào một tế bào miễn dịch sẽ tạo ra hoạt tính không phụ thuộc vào kháng thể và sự tăng sinh của tế bào. Sáng chế cũng đề xuất đến axit nucleic, các vector mã hóa cho CAR bao gồm một scFv có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng đặc hiệu CD19, 4G7 và phương pháp tạo ra các tế bào miễn dịch bao gồm đưa 4G7 CAR vào các tế bào này. Sáng chế cũng đề xuất đến các tế bào miễn dịch được biến đổi gen biểu hiện 4G7 trên bề mặt, đặc biệt là các tế bào miễn dịch mà tăng sinh độc lập với cơ chế kháng nguyên. Các tế bào miễn dịch được biến đổi gen theo sáng chế đặc biệt hữu dụng trong ứng dụng điều trị bệnh ung thư hạch bạch huyết và bệnh bạch cầu tế bào B.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Sự tăng sinh của các tế bào T bất hoạt TCR alpha (KO) được tải nạp vector từ lentivirus mang 4G7-CAR so với các tế bào T KO không được tải nạp (NTD).

Sự tăng sinh được theo dõi trong vòng 30 ngày sau khi tế bào mang (IL2+CD28) hoặc (IL2) tái hoạt hóa với anti-CD28 hòa tan.

Fig.2: Phân tích sự biểu hiện của marker của sự hoạt hóa CD25 ở bề mặt của các tế bào T bất hoạt TCR alpha được tải nạp vector lentivirus mang 4G7-CAR, dựa trên cơ sở sự biểu hiện của 4G7-CAR (CAR+, CAR-) và so sánh với sự biểu hiện của CD25 ở các tế bào không xung điện TCR alpha dương (NEP) hoặc các tế bào TCR alpha bị đứt đoạn nhưng không được tải nạp (NTD). Sự biểu hiện của CD25 được phân tích sau khi tế bào mang (IL2+CD28) hoặc (IL2) tái hoạt hóa với anti-CD28 hòa tan.

Fig.3: Phân tích sự biểu hiện của CAR trên bề mặt các tế bào T được tải nạp vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR hoặc FMC63-CAR. Việc phân tích được thực hiện 3, 8 và 15 ngày sau khi tải nạp thông qua phân tích tế bào theo dòng chảy. NT dùng để chỉ các tế bào T không tải nạp.

Fig.4: Phân tích sự biểu hiện của CD25 trên bề mặt các tế bào T được tải nạp vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR hoặc FMC63-CAR. Việc phân tích được thực hiện 3, 8 và 15 ngày sau khi tải nạp thông qua phân tích tế bào theo dòng chảy. NT dùng để chỉ các tế bào T không tải nạp.

Fig.5: Phân tích kích thước của các tế bào T được tải nạp với vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR hoặc FMC63-CAR. Việc phân tích được thực hiện 3, 8 và 15 ngày sau khi tải nạp thông qua phân tích tế bào theo dòng chảy. NT dùng để chỉ các tế bào T không tải nạp.

Fig.6: Sự tăng sinh của các tế bào T được tải nạp vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR so với tế bào T tải nạp vector lentivirus mã hóa FMC63. Sự tăng sinh được theo dõi trong vòng 20 ngày sau khi tế bào mang (CD28) hoặc không mang (-) tái hoạt hóa với anti-CD28 hòa tan. NTD dùng để chỉ các tế bào T không tải nạp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được định nghĩa đặc biệt trong tài liệu này, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng có ý nghĩa tương tự như hiểu biết thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liệu pháp gen, hóa sinh và sinh học phân tử.

Tất cả các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả trong tài liệu này có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế này, với các phương pháp và vật liệu thích hợp được mô tả trong tài liệu này. Tất cả các công bố, đơn đăng ký sáng chế, bằng độc quyền sáng chế, và các tài liệu tham khảo khác được đề cập đến trong tài liệu này được kết hợp bằng cách tham khảo ở trạng thái nguyên bản của chúng. Trong trường hợp có mâu thuẫn, bản mô tả này, bao gồm các định nghĩa, sẽ ưu tiên áp dụng. Ngoài ra, các vật liệu, phương pháp, và các ví dụ chỉ mang tính minh họa và không có ý định hạn chế, trừ khi được chỉ định rõ.

Việc thực hiện sáng chế sẽ sử dụng, trừ khi có chỉ định khác, các kỹ thuật thông thường của sinh học tế bào, nuôi cấy tế bào, sinh học phân tử, sinh học biến đổi gen, vi sinh vật học, ADN tái tổ hợp, và miễn dịch học, trong phạm vi kỹ năng nghiên cứu. Các kỹ thuật này được phản ánh đầy đủ trong các tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, xem *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, (Sambrook và cộng sự, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); *Oligonucleotide Synthesis* (Chủ biên M. J. Gait, 1984); Mullis et al. *Sáng chế Mỹ số 4,683,195*; *Nucleic Acid Hybridization* (Chủ biên B. D. Harries và S. J. Higgins 1984); *Transcription And Translation* (Chủ biên B. D. Hames và S. J. Higgins, 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the series, *Methods In ENZYMOLOGY* (Chủ biên J. Abelson và M. Simon, Academic Press, Inc., New York), đặc biệt là các tập 154 và 155 (Chủ biên Wu và cộng sự) và Vol. 185, "*Gene Expression Technology*" (Chủ biên D. Goeddel); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (Chủ biên J. H. Miller và M. P. Calos, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Chủ biên Mayer và Walker, Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (Chủ biên D. M. Weir và C. C. Blackwell, 1986); và *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19

Sáng chế đề cập đến một thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR) bao gồm một vùng liên kết phối tử ngoại bào, một vùng xuyên màng và một vùng chuyển đổi tín hiệu.

Thuật ngữ “vùng liên kết phối tử ngoại bào” được dùng trong bản mô tả được định nghĩa là một oligo- hoặc polypeptit mà có khả năng liên kết với một phối tử. Tốt hơn, vùng này có khả năng tương tác với một phân tử ở bề mặt tế bào. Ví dụ, vùng liên kết phối tử ngoại bào có thể được chọn để nhận ra một phối tử hoạt động như một chỉ thị ở bề mặt tế bào ở tế bào đích mà liên quan đến một bệnh lý cụ thể.

Trong một phương án ưu tiên, vùng liên kết phối tử ngoại bào nói trên bao gồm một đoạn kháng thể mạch đơn (scFv) chứa chuỗi nhẹ (V_L) và chuỗi nặng (V_H) của kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên mục tiêu được nối lại bởi một mối liên kết linh hoạt. Trong một phương án ưu tiên, scFv nói trên có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 (Peipp, Saul và cộng sự 2004), tốt hơn scFv nói trên theo sáng chế bao gồm một phần của chuỗi nặng gamma 1 của phân tử globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 (Ngân hàng Gen: CAD88275.1; Trình tự nhận dạng số: 1) và một phần của chuỗi nhẹ kappa của phân tử globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 (Ngân hàng Gen: CAD88204.1; Trình tự nhận dạng số: 2), tốt hơn là liên kết với nhau bởi một liên kết linh hoạt. Trong một phương án ưu tiên, scFv nói trên theo sáng chế bao gồm các đoạn biến đổi của chuỗi nặng gamma 1 của phân tử globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 (Trình tự nhận dạng số: 3) và các đoạn biến đổi của chuỗi nhẹ kappa của phân tử globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 (Trình tự nhận dạng số: 4 hoặc 5) được liên kết bởi một mối nối linh hoạt. Trong phương án đặc biệt mối liên kết linh hoạt nói trên có một trình tự axit amin (Trình tự nhận dạng số: 6).

Nói cách khác, CAR nói trên bao gồm một vùng liên kết phối tử ngoại bào mà chứa một đoạn Fv mạch đơn có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19. Trong một phương án đặc biệt, scFv nói trên bao gồm một phần của trình tự axit amin được chọn trong nhóm bao gồm: Trình tự nhận dạng từ 1 đến 5. Trong một phương án ưu tiên, scFv nói trên bao gồm ít nhất 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn nữa là ít

nhất 90%, 95%, 97% hoặc 99% trình tự tương đồng với trình tự axit amin được chọn trong nhóm gồm trình tự nhận dạng 7 và 8.

Vùng chuyển đổi tín hiệu hay vùng tín hiệu nội bào của CAR theo sáng chế có nhiệm vụ truyền các tín hiệu nội bào sau khi liên kết với vùng liên kết phối tử ngoại bào với mục tiêu dẫn đến sự hoạt hóa của các tế bào miễn dịch và đáp ứng miễn dịch. Nói cách khác, vùng chuyển đổi tín hiệu có nhiệm vụ hoạt hóa ít nhất một trong số các chức năng đáp ứng thông thường của tế bào miễn dịch mà CAR được biểu hiện. Ví dụ, chức năng đáp ứng của một tế bào T có thể là hoạt động gây độc hoặc hoạt động hỗ trợ bao gồm sự tiết cytokin. Do đó, thuật ngữ “vùng chuyển đổi tín hiệu” dùng để chỉ một phần của một protein mà chuyển đổi tín hiệu đáp ứng thành tín hiệu chức năng và chỉ đạo các tế bào thực hiện một chức năng chuyên biệt.

Các ví dụ ưu tiên của vùng chuyển đổi tín hiệu để sử dụng trong một CAR có thể là các trình tự gây độc của thụ thể hoặc đồng thụ thể tế bào T mà hoạt động phối hợp để bắt đầu chuyển đổi tín hiệu theo sau sự khớp nối thụ thể kháng nguyên, cũng như bất kỳ sự dẫn xuất hoặc biến đổi của các trình tự này và bất kỳ trình tự tổng hợp nào có khả năng tương tự. Vùng chuyển đổi chức năng bao gồm hai loại trình chuỗi tín hiệu của tế bào chất, chúng khởi phát sự hoạt hóa ban đầu độc lập kháng nguyên, và chúng hoạt động theo cách độc lập kháng nguyên để tạo ra tín hiệu thứ cấp hoặc tín hiệu đồng kích thích. Chuỗi tín hiệu tế bào chất sơ cấp có thể bao gồm các mô-tip tín hiệu được biết đến như các mô-tip hoạt hóa dựa trên tyrosin của thụ thể miễn dịch - ITAM. Các ITAM cũng được xác định rõ là các mô-tip tín hiệu được tìm thấy trong phần đuôi bên trong tế bào chất của một loạt các thụ thể được sử dụng như vị trí liên kết cho tyrosin kinase loại syk/zap70. Các ví dụ về ITAM được sử dụng trong sáng chế có thể bao gồm, ví dụ không hạn chế, các ITAM có nguồn gốc từ TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRepsilon, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b và CD66d. Trong một phương án ưu tiên, vùng chuyển đổi tín hiệu của CAR có thể bao gồm vùng tín hiệu CD3zeta có trình tự axit amin với độ tương đồng ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, 95%, 97% hoặc 99 % so với trình tự axit amin được lựa chọn trong nhóm bao gồm trình tự nhận dạng số 10.

Trong một phương án đặc biệt, vùng chuyển đổi tín hiệu của CAR theo sáng chế bao gồm một phân tử tín hiệu đồng kích thích. Một phân tử đồng kích thích là một phân tử ở bề mặt tế bào khác với một thụ thể kháng nguyên hoặc phối tử của chúng cần cho một đáp ứng miễn dịch hiệu quả. “Phối tử đồng kích thích” dùng để chỉ một phân tử trên một tế bào trình diện kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với một phân tử đồng kích thích có cùng nguồn gốc trên một tế bào T, do đó tạo ra một tín hiệu, ngoài những tín hiệu sơ cấp được tạo ra bởi, ví dụ, sự liên kết của phức TCR/CD3 với một phân tử MHC được kết hợp với peptit, mang lại một đáp ứng tế bào T, bao gồm nhưng không giới hạn, kích hoạt sự tăng sinh, biệt hóa và các phản ứng tương tự. Một phối tử đồng kích thích có thể bao gồm nhưng không giới hạn CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, phối tử đồng kích thích cảm ứng (ICOS-L), phân tử kết dính gian bào (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, thụ thể lymphotoxin beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, một chất đồng vận hoặc một kháng thể liên kết với thụ thể phối tử Toll và một phối tử liên kết đặc hiệu với B7-H3. Một phối tử đồng kích thích cũng bao gồm, nhưng không giới hạn ở đó, một kháng nguyên liên kết đặc hiệu với một phân tử đồng kích thích có mặt trên tế bào T, ví dụ nhưng không giới hạn, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, kháng nguyên-1 liên quan đến chức năng lympho bào (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, một phối tử liên kết đặc hiệu với CD83.

Một “phân tử đồng kích thích” dùng để chỉ đối tác liên kết cùng nguồn gốc trên tế bào T mà liên kết đặc hiệu với một phối tử đồng kích thích, do đó dẫn đến một phản ứng đồng kích thích bởi tế bào, ví dụ, nhưng không giới hạn, sự tăng sinh. Các phân tử đồng kích thích bao gồm, nhưng không giới hạn, một phân tử MHC loại I, BTLA và thụ thể của phối tử Toll. Các ví dụ về phân tử đồng kích thích bao gồm CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, kháng nguyên-1 liên quan đến chức năng lympho bào (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 và một phối tử liên kết đặc hiệu với CD83 và các phân tử tương tự.

Trong một phương án ưu tiên, vùng chuyển đổi tín hiệu của CAR theo sáng chế bao gồm một phần của phân tử đồng kích thích được chọn từ nhóm bao gồm các đoạn của 4-1BB (GenBank: AAA53133.) và CD28 (NP_006130.1). Đặc biệt vùng chuyển đổi tín hiệu của CAR theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít

nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, 95%, 97% hoặc 99% so với trình tự axit amin được lựa chọn trong nhóm bao gồm trình tự nhận dạng số 11 và 12.

CAR theo sáng chế được biểu hiện trên màng bề mặt của tế bào. Do đó, CAR có thể bao gồm vùng xuyên màng. Các tính năng phân biệt của vùng xuyên màng thích hợp bao gồm khả năng được biểu hiện trên bề mặt tế bào, theo sáng chế này là một tế bào miễn dịch, đặc biệt là các tế bào lympho hoặc các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), và tương tác với nhau để điều khiển phản ứng của tế bào miễn dịch chống lại tế bào mục tiêu đã xác định trước. Vùng xuyên màng có thể có nguồn gốc từ tự nhiên hoặc tổng hợp. Vùng xuyên màng có thể có nguồn gốc từ bất kỳ protein liên kết màng hoặc protein xuyên màng nào. Như các ví dụ không giới hạn, polypeptit xuyên màng có thể là một tiểu phần của thụ thể tế bào T như α , β , γ hoặc δ , polypeptit cấu thành phức CD3, thụ thể IL2 p55 (chuỗi α), p75 (chuỗi β) hoặc chuỗi γ , chuỗi tiểu phần của các thụ thể Fc, đặc biệt là thụ thể Fc γ III hoặc các protein CD. Ngoài ra vùng xuyên màng có thể là tổng hợp và có thể chứa chủ yếu là các gốc kỵ nước như leucin và valin. Trong một phương án ưu tiên, các vùng xuyên màng nói trên có nguồn gốc từ chuỗi alpha CD8 của người (ví dụ như NP_001139345.1). Vùng xuyên màng có thể bao gồm thêm một phần cuống ở giữa vùng liên kết phối tử ngoại bào và vùng xuyên màng nói trên. Thuật ngữ “phần cuống” được sử dụng trong tài liệu này nói chung có nghĩa là bất cứ oligo- hay polypeptit được sử dụng nào có chức năng nối vùng xuyên màng với vùng liên kết phối tử ngoại bào. Đặc biệt, phần cuống được sử dụng để tạo ra tính linh hoạt và khả năng tiếp cận cho vùng liên kết phối tử ngoại bào. Một phần cuống có thể chứa tới 300 axit amin, tốt hơn từ 10 đến 100 axit amin và tốt nhất từ 25 đến 50 axit amin. Phần cuống có thể có nguồn gốc từ toàn bộ hoặc một phần các phân tử xuất hiện tự nhiên, chẳng hạn như toàn bộ hoặc một phần vùng ngoại bào của CD8, CD4 hoặc CD28, hoặc từ toàn bộ hoặc một phần vùng hằng định của kháng thể. Ngoài ra phần cuống có thể là một trình tự tổng hợp tỹ ứng với một trình tự cuống xuất hiện trong tự nhiên, hoặc có thể là một trình tự cuống hoàn toàn tổng hợp. Trong một phương án ưu tiên, phần cuống là một phần của chuỗi alpha CD8 ở người (ví dụ như NP_001139345.1). Trong phương án cụ thể khác, các vùng xuyên màng và vùng nối bao gồm một phần chuỗi alpha CD8 ở người, tốt hơn có ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất

80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, 95% 97% hoặc 99% trình tự tương đồng với trình tự axit amin được lựa chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận dạng số 13.

Trong một phương án cụ thể, thụ thể kháng nguyên dạng khảm theo sáng chế bao gồm một scFv có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19, một vùng nổi và xuyên màng alpha CD8, vùng tín hiệu zeta CD3 và vùng tín hiệu 4-1BB. Tốt hơn, 4G7-CAR theo sáng chế có ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là 90%, 95%, 97 % hoặc 99% trình tự tương đồng với trình tự axit amin được lựa chọn trong nhóm bao gồm trình tự nhận dạng số 14 và 15.

Điều hòa giảm hoặc đột biến các kháng nguyên mục tiêu thường tồn tại ở các tế bào ung thư, tạo ra các biến thể mất thiếu kháng thể. Do đó, để bù lại sự mất này ở các khối u và làm cho các tế bào miễn dịch đặc hiệu hơn với mục tiêu, CAR đặc hiệu CD19 có thể chứa các vùng liên kết phối tử ngoại bào khác, để liên kết đồng thời với các yếu tố khác trên mục tiêu, do đó làm tăng hoạt tính và chức năng của tế bào miễn dịch. Trong một phương án, vùng liên kết phối tử ngoại bào có thể đặt song song trên cùng một polypeptit xuyên màng, và được phân chia ngẫu nhiên bởi một mối liên kết. Trong phương án khác, vùng liên kết phối tử ngoại bào có thể đặt trên polypeptit xuyên màng chứa CAR. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến một tập hợp các CAR mà mỗi CAR có vùng liên kết phối tử ngoại bào khác nhau. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến phương pháp thiết kế các tế bào miễn dịch bao gồm tạo ra một tế bào miễn dịch và biểu hiện trên bề mặt của tế bào này một tập hợp các CAR mà mỗi CAR có vùng liên kết phối tử ngoại bào khác nhau. Trong một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phương pháp thiết kế một tế bào miễn dịch bao gồm tạo ra một tế bào miễn dịch và đưa vào polypeptit của tế bào nói trên các polypeptit mã hóa bao gồm một tập hợp CAR mà mỗi CAR có vùng liên kết phối tử ngoại bào khác nhau. Với tập hợp các CAR, có nghĩa là ít nhất hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc nhiều CAR mỗi CAR có các vùng liên kết phối tử ngoại bào khác nhau. Các vùng liên kết phối tử ngoại bào theo sáng chế có thể đồng thời gắn với các yếu tố khác trên mục tiêu do đó làm tăng hoạt tính và chức năng của tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến một tế bào miễn dịch đã được phân lập mà chứa tập hợp các CAR mỗi CAR có các vùng liên kết phối tử ngoại bào khác nhau.

Polynucleotit, vector

Sáng chế cũng đề cập đến các polynucleotit, các vector mã hóa cho các CAR được mô tả ở trên theo sáng chế. Trong một phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến một polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic số 17. Trong một phương án ưu tiên, polynucleotit có ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là 90%, 95%, 97% hoặc 99% trình tự tương đồng với trình tự axit nucleic được lựa chọn trong nhóm bao gồm trình tự nhận dạng số 17.

Polynucleotit có thể bao gồm một cassette biểu hiện hoặc một vector biểu hiện (ví dụ như một plasmit để đưa vào một tế bào chủ vi khuẩn, hoặc một vector virus chẳng hạn như vector baculovirus để chuyển nạp vào một tế bào chủ côn trùng, hoặc một plasmit hoặc một vector virus như lentivirus để chuyển nạp vào một tế bào chủ động vật).

Trong một phương án cụ thể, các trình tự axit nucleic khác nhau có thể được bao gồm trong một polypeptit hoặc vector mà chứa trình tự axit nucleic mã hóa trình tự bỏ qua của ribosom chẳng hạn như trình tự mã hóa peptit 2A. Peptit 2A, được xác định trong phân nhóm Aphthovirus của picornavirus, gây ra một "sự bỏ qua" của ribosom từ một codon đến một codon tiếp theo mà không có sự hình thành một liên kết peptit giữa hai axit amin được mã hóa bởi các codon đó (Xem (Donnelly và Elliott 2001; Atkins, Wills và cộng sự 2007; Doronina, Wu và cộng sự 2008)). "Codon" có nghĩa là ba nucleotit trên một mARN (hoặc trên mạch mang mã của một phân tử ADN) được dịch mã bởi một ribosom tạo thành một đơn phân axit amin. Do đó, hai polypeptit có thể được tổng hợp trên một khung đọc mở đơn, liền kề trong một mARN khi polypeptit được chia bởi trình tự oligopeptit 2A trong khung đọc mở. Cơ chế bỏ qua của ribosom như vậy đã được biết đến trong nghiên cứu và được biết đến là đã được sử dụng trong một vài vector để biểu hiện một số protein được mã hóa bởi một ARN thông tin đơn.

Để đưa polypeptit xuyên màng vào quá trình tiết của một tế bào vật chủ, một trình tự tín hiệu tiết (cũng được biết đến như trình tự dẫn, trình tự đầu tiên hoặc trình tự trước) được tạo ra trong một trình tự polynucleotit hoặc trình tự vector. Trình tự tín hiệu tiết được liên kết với trình tự axit nucleic xuyên màng, cụ thể là hai trình tự được ghép vào khung đọc đúng và được đặt vào vị trí để đưa polypeptit được tổng hợp mới

vào quá trình tiết của tế bào vật chủ. Các trình tự tín hiệu tiết thường ở vị trí 5' của trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit quan tâm, mặc dù các trình tự tín hiệu tiết nhất định có thể được đặt ở bất kỳ vị trí nào trên trình tự axit nucleic quan tâm (xem, ví dụ như, Welch và cộng sự, Sáng chế Mỹ số 5,037,743; Holland và cộng sự, Sáng chế Mỹ số 5,143,830). Trong một phương án ưu tiên, peptit tín hiệu bao gồm trình tự axit amin có trình tự nhận dạng số 18 và 19.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận ra rằng, theo quan điểm của sự thoái hóa của mã di truyền, biến đổi trình tự đáng kể là có thể có trong các phân tử polynucleotit. Tốt hơn, các trình tự axit nucleic theo sáng chế được tối ưu hóa codon để biểu hiện ở tế bào động vật, tốt hơn là để biểu hiện ở tế bào người. Tối ưu hóa codon dùng để chỉ sự thay đổi trong một trình tự quan tâm của các codon mà nói chung là có nhiều trong các gen có mức độ biểu hiện cao của các loài đó, các codon như vậy mã hóa các axit amin giống như các codon đang bị thay đổi.

Trong một phương án ưu tiên, polynucleotit theo sáng chế bao gồm trình tự axit nucleic được chọn trong nhóm bao gồm trình tự nhận dạng số 17. Sáng chế cũng đề cập đến các polynucleotit chứa trình tự axit nucleic có ít nhất 70%, tốt hơn là ít nhất 80%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, 95%, 97% hoặc 99% trình tự tương đồng với trình tự axit nucleic được lựa chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận dạng số 17.

Các phương pháp thiết kế một tế bào miễn dịch

Trong phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra các tế bào miễn dịch cho liệu pháp miễn dịch bao gồm đưa vào các tế bào miễn dịch trên các CAR theo sáng chế và phát triển các tế bào này. Trong phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp thiết kế một tế bào miễn dịch bao gồm việc tạo ra một tế bào và biểu hiện trên bề mặt của tế bào này ít nhất một CAR như đã mô tả ở trên. Trong phương án cụ thể, phương pháp bao gồm việc biến nạp vào tế bào ít nhất một polynucleotit mã hóa CAR như được mô tả ở trên, và biểu hiện các polypeptit này ở các tế bào nói trên.

Trong một phương án ưu tiên, các polypeptit đã nói đến có trong các vector lentivirus được biểu hiện bền vững trong các tế bào.

Trong phương án khác, phương pháp nói trên bao gồm thêm một bước biến đổi di truyền các tế bào nói trên bằng cách bất hoạt ít nhất một gen biểu hiện một thành

phần của TCR, một mục tiêu cho tác nhân ức chế miễn dịch, gen HLA và/hoặc một gen kiểm soát miễn dịch chẳng hạn như PDCD1 hoặc CTLA-4. Trong một phương án ưu tiên, gen nói trên được lựa chọn trong nhóm bao gồm TCRalpha, TCRbeta, CD52, GR, PD1 và CTLA-4. Trong một phương án ưu tiên, phương pháp nói trên bao gồm thêm việc đưa vào các tế bào T một endonucleaza cắt hiếm có thể bất hoạt chọn lọc bởi sự phân cắt ADN của các gen nói trên. Trong một phương án ưu tiên hơn endonucleaza nói trên là TALE-nucleaza hoặc endonucleaza Cas9.

Các phương pháp đưa vào tế bào

Các phương pháp khác nhau được mô tả ở trên liên quan đến việc đưa CAR vào một tế bào. Như một ví dụ không hạn chế, CAR nói trên có thể được đưa vào như các gen chuyển được mã hóa bởi một vectơ plasmid. Plasmid này cũng có thể chứa một chỉ thị chọn lọc để nhận dạng và/hoặc chọn lọc các tế bào mà đã nhận vectơ nói trên.

Các polypeptit có thể được tổng hợp tại chỗ trong tế bào như là kết quả của việc đưa các polypeptit nói trên vào tế bào. Ngoài ra, các polypeptit nói trên có thể được sản xuất bên ngoài tế bào và sau đó đưa vào bên trong. Các phương pháp đưa một cấu trúc polynucleotit vào trong tế bào đã được biết đến rộng rãi trong nghiên cứu có, ví dụ không hạn chế, các phương pháp biến nạp ổn định trong đó cấu trúc polynucleotit được tích hợp vào hệ gen của tế bào, các phương pháp biến nạp tạm thời trong đó cấu trúc polypeptit không được tích hợp vào hệ gen của tế bào và các phương pháp qua trung gian virus. Các polypeptit nói trên có thể được đưa vào trong một tế bào qua, ví dụ các vectơ virus tái tổ hợp (ví dụ như các retrovirus, adenovirus), liposom và các vectơ tương tự. Ví dụ, các phương pháp biến nạp tạm thời bao gồm ví dụ như vi tiêm, xung điện hoặc bắn phá hạt. Các polypeptit nói trên có thể được bao gồm trong các vectơ, cụ thể hơn là các plasmid hoặc virus, được biểu hiện trong các tế bào.

Các tế bào miễn dịch được thiết kế

Sáng chế cũng đề cập đến các tế bào hoặc dòng tế bào được phân lập có thể có được bằng các phương pháp thiết kế tế bào nói trên. Cụ thể các tế bào được phân lập nói trên chứa ít nhất một CAR như đã mô tả ở trên. Trong phương án khác, tế bào được phân lập nói trên chứa một tập hợp các CAR mỗi CAR chứa các vùng liên kết phối tử ngoại bào khác nhau. Cụ thể, tế bào phân lập được nói trên chứa trình tự

polypeptit ngoại sinh mã hóa CAR. Các tế bào miễn dịch theo sáng chế được hoạt hóa và tăng sinh một cách độc lập với cơ chế liên kết kháng nguyên.

Trong phạm vi của sáng chế cũng bao gồm một tế bào miễn dịch được phân lập, tốt hơn là một tế bào T thu được theo bất kỳ một phương pháp nào đã được mô tả trước đây. Tế bào miễn dịch đã nói trên dùng để chỉ một tế bào gốc tạo máu có liên quan về mặt chức năng đến việc bắt đầu và/hoặc thực hiện đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và/hoặc đáp ứng miễn dịch thích ứng. Tế bào miễn dịch nói trên theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ một tế bào gốc. Các tế bào gốc có thể là các tế bào gốc trưởng thành, tế bào gốc phôi không phải từ người, cụ thể hơn là các tế bào gốc không phải từ người, các tế bào gốc máu cuống rốn, tế bào tiền sinh, tế bào gốc tủy xương, tế bào gốc đa năng cảm ứng, tế bào gốc toàn năng hoặc tế bào gốc máu. Các tế bào người tiêu biểu là các tế bào CD34+. Tế bào được phân lập nói trên cũng có thể là một tế bào tua, tế bào tua giết, tế bào mast, tế bào NK, tế bào B hoặc tế bào T được lựa chọn trong nhóm bao gồm lympho T viêm, lympho T gây độc, lympho T điều hòa hoặc lympho T hỗ trợ. Trong phương án khác, tế bào nói trên có thể có nguồn gốc từ nhóm bao gồm lympho T CD4+ và lympho T CD8+. Trước khi phát triển và biến đổi di truyền các tế bào theo sáng chế, một nguồn tế bào có thể được thu lại từ một đối tượng thông qua một loạt các phương pháp không giới hạn. Các tế bào có thể được thu về từ một số nguồn không giới hạn, bao gồm các tế bào máu đơn nhân thuộc vùng ngoại vi, tủy xương, mô hạch bạch huyết, cuống rốn, mô tuyến ức, mô từ vị trí nhiễm trùng, tràn dịch màng bụng, tràn dịch màng phổi, mô lá lách và các khối u. Trong các phương án nhất định của sáng chế, bất kỳ dòng tế bào T nào có sẵn và đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, đều có thể được sử dụng. Trong phương án khác, tế bào nói trên có thể có nguồn gốc từ một người hiến tặng khỏe mạnh, từ một bệnh nhân đã được chẩn đoán ung thư hoặc từ một bệnh nhân đã được chẩn đoán bị nhiễm trùng. Trong phương án khác, tế bào nói trên là một phần của một tập hợp hỗn hợp các tế bào có đặc điểm kiểu hình khác nhau. Trong phạm vi của sáng chế cũng gồm có một dòng tế bào thu được từ một tế bào T được biến nạp theo phương pháp đã mô tả trước đó. Các tế bào đã biến đổi kháng lại sự điều trị ức chế miễn dịch và có thể thu được nhờ các phương pháp trước đó đã bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Trong phương án khác, tế bào được phân lập nói trên theo sáng chế bao gồm một polynucleotit mã hóa CAR.

Hoạt hóa và phát triển các tế bào T

Cho dù trước hay sau khi biến đổi di truyền các tế bào T, thậm chí nếu các tế bào miễn dịch đã biến đổi di truyền theo sáng chế được hoạt hóa và tăng sinh độc lập với cơ chế liên kết kháng nguyên, thì các tế bào miễn dịch, đặc biệt là tế bào T theo sáng chế có thể được hoạt hóa thêm và phát triển thường sử dụng các phương pháp như được mô tả trong, ví dụ như các sáng chế Mỹ số 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; và Công bố đơn đăng ký sáng chế ở Mỹ số 20060121005. Các tế bào T có thể được phát triển trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể.

Nói chung, các tế bào T theo sáng chế được phát triển bằng cách tiếp xúc với một tác nhân kích thích phức hợp CD3 TCR và một phân tử đồng kích thích trên bề mặt các tế bào T để tạo ra tín hiệu hoạt hóa cho tế bào T.

Ví dụ, các chất hóa học như canxi ionophore A23187, phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA), hoặc các lectin gây phân bào như phytohemagglutinin (PHA) có thể được sử dụng để tạo ra tín hiệu hoạt hóa tế bào T.

Như trong các ví dụ không hạn chế, các tập hợp tế bào T có thể được kích thích trong ống nghiệm chẳng hạn như qua tiếp xúc với một kháng thể kháng CD3, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, hoặc kháng thể kháng CD2 được cố định trên bề mặt, hoặc qua tiếp xúc với chất hoạt hóa protein kinaza C (ví dụ như bryostatin) kết hợp với một canxi ionophore. Đối với việc đồng kích thích các phân tử phụ trên bề mặt các tế bào T, một phối tử gắn với phân tử phụ này được sử dụng. Ví dụ, một tập hợp các tế bào T có thể được tiếp xúc với một kháng thể kháng CD3 và một kháng thể kháng CD28, trong điều kiện thích hợp cho việc kích thích sự tăng sinh của các tế bào T. Các điều kiện thích hợp cho việc nuôi cấy tế bào T bao gồm một môi trường thích hợp (ví dụ như môi trường tối thiểu MEM hoặc môi trường RPMI 1640 hoặc X-vivo 5, (Lonza)) mà có thể chứa các yếu tố cần thiết cho việc tăng sinh và tồn tại, bao gồm huyết thanh (ví dụ như huyết thanh bò mang thai hoặc huyết thanh người), interleukin-2 (IL-2), insulin, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, -2, IL-15, TGF β , và TNF- hoặc

bất kỳ chất phụ gia khác cho sự tăng trưởng của các tế bào đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các chất phụ gia khác cho sự tăng trưởng của các tế bào bao gồm nhưng không giới hạn bởi chất hoạt động bề mặt, protein phân đoạn plasma, và các tác nhân khử như N-acetyl-cystein và 2-mercaptoethanoi. Môi trường có thể có RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1, và X-Vivo 20, Optimizer, với thêm vào các axit amin, natri pyruvat, và các vitamin, hoặc không chứa huyết thanh hoặc được bổ sung một lượng thích hợp huyết thanh (hoặc huyết tương) hoặc một bộ hormon xác định, và/hoặc một lượng cytokin đủ cho sự tăng trưởng và phát triển của các tế bào T. Các chất kháng sinh, ví dụ như, penicillin và streptomycin, chỉ có trong các môi trường nuôi cấy thử nghiệm, mà không có trong môi trường nuôi cấy các tế bào mà được đưa vào một đối tượng. Các tế bào mục tiêu được duy trì ở điều kiện cần thiết để hỗ trợ cho sự tăng trưởng, ví dụ như một nhiệt độ thích hợp (chẳng hạn 37°C) và áp suất thích hợp (chẳng hạn không khí cộng 5% CO_2). Các tế bào T mà có số lần kích thích khác nhau có thể bộc lộ các đặc tính khác nhau.

Trong phương án cụ thể khác, các tế bào nói trên có thể được phát triển bằng cách cùng nuôi cấy với mô hoặc các tế bào. Các tế bào nói trên cũng có thể được phát triển trong cơ thể, ví dụ trong máu của đối tượng sau khi đưa tế bào trên vào đối tượng này.

Ứng dụng trị liệu

Trong phương án khác, tế bào được phân lập được thu lại bằng các phương pháp khác nhau hoặc dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào được phân lập nói trên như đã mô tả trước đó có thể được sử dụng như một dược phẩm. Trong phương án khác, dược phẩm nói trên có thể được sử dụng để điều trị ung thư, cụ thể là điều trị bệnh ung thư hạch bạch huyết và bệnh bạch cầu tế bào B ở một bệnh nhân có nhu cầu. Trong phương án khác, tế bào được phân lập nói trên có thể được sử dụng trong nhà máy sản xuất dược phẩm điều trị bệnh ung thư ở bệnh nhân có nhu cầu.

Ở một khía cạnh khác, sáng chế dựa trên các phương pháp điều trị cho các bệnh nhân có nhu cầu, các phương pháp nói trên bao gồm ít nhất một trong các bước sau đây:

(a) tạo ra một tế bào miễn dịch có thể thu lại được bằng bất kỳ một phương pháp nào trong số các phương pháp mô tả trước đây;

(b) đưa các tế bào miễn dịch đã biến nạp nói trên vào cơ thể người bệnh.

Trong một phương án, các tế bào T theo sáng chế có thể phát triển mạnh mẽ trong cơ thể và có thể tồn tại trong một thời gian dài.

Sự điều trị nói trên có thể là cải thiện, chữa khỏi hẳn hoặc phòng bệnh. Có thể là một phần của một liệu pháp miễn dịch tự thân hoặc một phần của liệu pháp miễn dịch dị ghép. Với tự thân, có nghĩa là các tế bào, dòng tế bào hoặc tập hợp các tế bào được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân có nguồn gốc từ bệnh nhân đó hoặc từ người hiến tặng có kháng nguyên bạch cầu người (HLA) tương thích. Với dị ghép có nghĩa là các tế bào hoặc dòng tế bào được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân không có nguồn gốc từ người bệnh đó mà từ người hiến tặng.

Các tế bào có thể được sử dụng với các phương pháp đã được bộc lộ được mô tả trong phần trước. Sự điều trị nói trên có thể được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân được chẩn đoán ung thư. Các bệnh ung thư có thể được điều trị bao gồm các khối u không ở dạng rắn (chẳng hạn các khối u huyết học, bao gồm nhưng không giới hạn tiền bạch cầu lympho bào cấp tính B (chỉ định ở trẻ em), bạch cầu lympho bào ở người lớn (adult-ALL), lympho tế bào vò, u lympho tế bào B lớn lan tỏa và các bệnh tương tự. Các loại ung thư có thể điều trị với CAR theo sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn như các bệnh bạch cầu ác tính hoặc u lympho ác tính nhất định. Các khối u/ung thư ở người lớn và các khối u/ung thư ở trẻ em cùng được bao gồm.

Có thể điều trị kết hợp với một hoặc nhiều liệu pháp chống ung thư được lựa chọn trong nhóm liệu pháp kháng thể, hóa trị liệu, liệu pháp cytokin, liệu pháp tế bào tua, liệu pháp gen, liệu pháp hormone, liệu pháp tia laser và xạ trị.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, sự điều trị nói trên có thể áp dụng cho các bệnh nhân đang điều trị ức chế miễn dịch. Thật vậy, sáng chế ưu tiên dựa trên các tế bào hoặc tập hợp các tế bào, mà kháng lại ít nhất một tác nhân ức chế miễn dịch do sự bất hoạt gen mã hóa cho thụ thể của tác nhân ức chế miễn dịch đó. Ở khía cạnh này, điều trị ức chế miễn dịch đã hỗ trợ việc chọn lọc và phát triển các tế bào T theo sáng chế bên trong bệnh nhân.

Việc đưa vào các tế bào hoặc tập hợp tế bào theo sáng chế có thể được thực hiện theo bất kỳ cách nào thuận tiện, bao gồm hít bình xịt, tiêm, uống, truyền, cấy hoặc ghép. Các chế phẩm được mô tả trong tài liệu này có thể được đưa vào người bệnh bằng cách tiêm dưới da, trong da, qua da, trong mắt, tiêm tủy sống, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm vào mạch bạch huyết, hoặc tiêm màng bụng. Trong một phương án, các chế phẩm tế bào theo sáng chế được đưa vào bằng cách tiêm tĩnh mạch.

Việc đưa vào các tế bào hoặc tập hợp các tế bào có thể bao gồm đưa vào 10^4 - 10^9 tế bào trên mỗi kg trọng lượng cơ thể, tốt hơn là 10^5 đến 10^6 tế bào trên mỗi kg trọng lượng cơ thể bao gồm toàn bộ các giá trị là số nguyên của số lượng tế bào trong giới hạn đó. Các tế bào hoặc tập hợp các tế bào có thể được đưa vào ở một hay nhiều liều. Trong một phương án, lượng hiệu quả các tế bào nói trên được đưa vào như một liều duy nhất. Trong phương án khác, lượng hiệu quả các tế bào nói trên được đưa vào nhiều hơn một liều trong một khoảng thời gian. Thời điểm đưa vào là thuộc quyết định của bác sĩ quản lý và phụ thuộc vào tình trạng lâm sàng của bệnh nhân. Các tế bào hoặc tập hợp các tế bào có thể thu được từ bất kỳ nguồn nào, chẳng hạn như ngân hàng máu hoặc từ người hiến tặng. Trong khi các nhu cầu cá nhân khác nhau, việc xác định phạm vi tối ưu của lượng hiệu quả của một loại tế bào nhất định cho một bệnh cụ thể hoặc các điều kiện trong phạm vi kỹ năng nghiên cứu. Một lượng hiệu quả có nghĩa là một lượng tạo ra một lợi ích điều trị hoặc dự phòng. Liều lượng được đưa vào sẽ phụ thuộc vào tuổi tác, sức khỏe và cân nặng của người nhận, loại điều trị đồng thời, nếu có, tần suất điều trị và tính chất của hiệu quả mong muốn.

Trong phương án khác, lượng hiệu quả các tế bào hoặc chế phẩm bao gồm các tế bào này được đưa vào ngoài đường tiêu hóa. Việc đưa vào có thể qua tiêm tĩnh mạch. Việc đưa vào cũng có thể trực tiếp qua tiêm vào trong mô.

Trong các phương án nhất định của sáng chế, các tế bào được đưa vào người bệnh cùng với (ví dụ, trước, đồng thời hoặc sau) bất kỳ một số lượng nào các phương thức điều trị liên quan, bao gồm nhưng không giới hạn việc điều trị với các tác nhân như liệu pháp kháng virus, cidofovir và interleukin-2, Cytarabine (còn được gọi là ARA-C) hoặc điều trị natalizumab cho các bệnh nhân MS hoặc điều trị efalizumab cho các bệnh nhân vẩy nến hoặc các phương pháp điều trị khác cho các bệnh nhân PML. Trong các phương án khác nữa, các tế bào T theo sáng chế có thể được sử dụng

kết hợp với hóa trị, xạ trị, các tác nhân ức chế miễn dịch, chẳng hạn như cyclosporin, azathioprine, methotrexate, mycophenolate, và FK506, các kháng thể, hoặc các tác nhân loại bỏ miễn dịch khác như các kháng thể CAM PATH, anti-CD3 hoặc các liệu pháp kháng thể khác, cytoxin, fludaribine, cyclosporin, FK506, rapamycin, axit mycoplienolic, các steroid, FR901228, các cytokin, và chiếu xạ. Các loại thuốc ức chế hoặc phosphatase calcineurin phụ thuộc canxi (cyclosporine và FK506) hoặc ức chế p70S6 kinase mà quan trọng đối với yếu tố tăng trưởng gây ra tín hiệu (rapamycin) (Henderson, Naya và cộng sự 1991; Liu, Albers và cộng sự 1992; Bierer, Hollander và cộng sự 1993). Trong một phương án khác, các chế phẩm tế bào theo sáng chế được đưa vào cùng với (ví dụ, trước, đồng thời hoặc sau) cấy ghép tủy xương, liệu pháp loại bỏ tế bào T sử dụng hoặc các tác nhân hóa trị chẳng hạn như fludarabin, liệu pháp xạ trị với nguồn tia từ bên ngoài vào (XRT), cyclophosphamit, hoặc các kháng thể như OKT3 hay CAMPATH. Trong phương án khác, các chế phẩm tế bào theo sáng chế được đưa vào sau liệu pháp loại bỏ tế bào B chẳng hạn như các tác nhân phản ứng với CD20, ví dụ, Rituxan. Ví dụ, trong một phương án, các đối tượng có thể phải trải qua điều trị tiêu chuẩn với hóa trị liều cao theo sau ghép tế bào gốc máu ngoại vi. Trong các phương án cụ thể, tiếp theo cấy ghép, các đối tượng nhận theo đường truyền các tế bào miễn dịch đã phát triển theo sáng chế. Trong một phương án bổ sung, các tế bào đã phát triển được đưa vào trước hoặc sau phẫu thuật.

Các định nghĩa khác

- Trừ khi được định nghĩa khác, "một" và "ít nhất một" được dùng thay thế cho nhau và có nghĩa là một hoặc nhiều hơn một. Các đơn phân axit amin trong một trình tự polypeptit được gọi tên trong tài liệu này theo mã một chữ cái, trong đó, ví dụ Q có nghĩa là Gln hoặc đơn phân Glutamin, R có nghĩa là Arg hoặc đơn phân Arginine và D có nghĩa là Asp hoặc đơn phân axit Aspartic.

- Phép thế axit amin có nghĩa là sự thay thế một đơn phân axit amin bằng một đơn phân axit amin khác, ví dụ như sự thay thế đơn phân Arginin với đơn phân Glutamin trong một trình tự peptit là một sự thay thế axit amin.

- Các nucleotit được gọi tên như sau: mã một chữ cái được sử dụng để gọi tên bazơ của một nucleosit: a là adenin, t là thymin, c là cytosin, và g là guanin. Đối với các nucleotit bị thoái hóa, , r đại diện cho g hoặc một nucleotit nhóm purin, k đại diện

cho g hoặc t, s đại diện cho g hoặc c, w đại diện cho a hoặc t, m đại diện cho a hoặc c, y đại diện cho t hoặc một nucleotit thuộc nhóm pyrimidin, d đại diện cho g, a hoặc t, v đại diện cho g, a hoặc c, b đại diện cho g, t hoặc c, h đại diện cho a, t hoặc c, và n đại diện cho g, a, t hoặc c.

- Như được sử dụng trong tài liệu này, “axit nucleic” hoặc “polynucleotit” dùng để chỉ các nucleotit và/hoặc polynucleotit, chẳng hạn như axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc axit ribonucleic (ARN), oligonucleotit, các đoạn tạo ra từ phản ứng khuếch đại gen (PCR), và các đoạn tạo ra bởi sự nối, sự cắt, hoạt động của endonucleaza, và hoạt động của exonucleaza. Các phân tử axit nucleic có thể bao gồm các đơn phân mà là các nucleotit trong tự nhiên (chẳng hạn như ADN và ARN), hoặc các phân tử tương tự các nucleotit trong tự nhiên (ví dụ, dạng đồng phân của các nucleotit trong tự nhiên), hoặc kết hợp cả hai. Các nucleotit bị biến đổi có thể có sự thay đổi trong các gốc đường và/hoặc trong các gốc bazơ pyrimidin hoặc purin. Biến đổi đường bao gồm, ví dụ, thay thế một hoặc nhiều nhóm hydroxyl bởi các halogen, nhóm alkyl, các amin, và các nhóm azido, hoặc các đường có thể được thực hiện chức năng như các ete hoặc este. Hơn nữa, gốc đường nguyên vẹn có thể bị thay thế bằng các cấu trúc tương tự về sự bố trí các nguyên tử trong không gian và điện tử, chẳng hạn như các đường aza và các chất tương tự đường carbocyclic. Các ví dụ về sự biến đổi ở một gốc bazơ bao gồm các purin và pyrimidin alkyl hóa, các purin và pyrimidin acyl hóa, hoặc các thay thế dị vòng đã được biết đến rộng rãi khác. Các đơn phân axit amin có thể nối với nhau bởi liên kết photphodiester hoặc các liên kết tương tự. Các axit nucleic có thể là mạch đơn hoặc mạch kép.

- Thụ thể kháng nguyên dạng khảm (CAR) là các phân tử được chỉ định để nối một vùng liên kết với một thành phần có mặt trên tế bào mục tiêu, ví dụ một kháng thể - dựa trên tính đặc hiệu với một kháng nguyên mong muốn (ví dụ, kháng nguyên ung thư) với một thụ thể tế bào T - hoạt hóa vùng nội bào để tạo ra các protein khảm mà bộc lộ các hoạt động miễn dịch tế bào chống lại các mục tiêu đặc hiệu. Nói chung, CAR bao gồm một thụ thể mạch đơn ngoại bào (scFvFc) lai với vùng tín hiệu nội bào của chuỗi zeta của thụ thể kháng nguyên tế bào T (scFvFc:ζ) và có khả năng, khi được biểu hiện ở tế bào T, điều khiển việc nhận biết kháng nguyên dựa trên sự đặc hiệu của kháng thể đơn dòng. Một ví dụ về CAR được sử dụng trong sáng chế là một CAR

nhắm đến kháng nguyên CD19 và bao gồm nhưng không giới hạn trình tự axit amin có trình tự nhận dạng số 14.

- Thuật ngữ “endonucleaza” dùng để chỉ bất kỳ enzym tự nhiên hoặc biến đổi nào có khả năng xúc tác việc phân hủy (cắt) các liên kết giữa các axit nucleic trong một phân tử ADN hoặc ARN, tốt hơn là một phân tử ADN. Các endonucleaza không cắt phân tử ADN hoặc ARN mà không phân biệt trình tự của nó, mà nhận biết và cắt phân tử ADN hoặc ARN tại các trình tự đặc hiệu, gọi là “trình tự mục tiêu” hoặc “vị trí mục tiêu”. Các endonucleaza có thể được xếp loại vào các endonucleaza cắt hiếm khi có vị trí nhận dạng polynucleotit điển hình dài hơn 12 cặp bazơ, tốt hơn là 14/55 cặp bazơ. Các endonucleaza cắt hiếm tăng đáng kể tốc độ phân hủy HR bằng cách làm đứt gãy mạch kép ADN (DSB) tại một locut xác định (Perrin, Buckle và cộng sự 1993; Rouet, Smih và cộng sự 1994; Choulika, Perrin và cộng sự 1995; Pingoud và Silva 2007). Các endonucleaza cắt hiếm có thể là, ví dụ, một homing endonuclease (Paques và Duchateau 2007), một nucleaza Zinc-Finger dạng khảm (ZFN) dẫn đến sự liên hợp của các vùng zinc-finger được thiết kế với vùng xúc tác của một enzym giới hạn như FokI (Porteus và Carroll 2005), một endonucleaza Cas9 từ hệ thống CRISPR (Gasiunas, Barrangou và cộng sự 2012; Jinek, Chylinski và cộng sự 2012; Cong, Ran và cộng sự 2013; Mali, Yang và cộng sự 2013) hoặc một endonucleaza hóa học (Eisenschmidt, Lanio và cộng sự 2005; Arimondo, Thomas và cộng sự 2006). Trong các endonucleaza hóa học, một phân tử phân cắt hóa học hay peptit được kết hợp với hoặc là một polyme của các axit nucleic hoặc là một ADN khác nhận biết trình tự đích đặc hiệu, do đó nhắm mục tiêu của hoạt động cắt đến trình tự đặc hiệu. Các endonucleaza hóa học cũng bao gồm các nucleaza tổng hợp giống như liên hợp của orthophenanthroline, một phân tử cắt ADN, và các oligonucleotit dạng bậc ba (TFO), được biết đến để liên kết các trình tự ADN đặc hiệu (Kalish và Glazer 2005). Các endonucleaza hóa học như vậy được bao gồm trong thuật ngữ “endonucleaza” theo sáng chế.

- Một “TALE-nucleaza” (TALEN) dùng để chỉ một protein lai bao gồm một vùng liên kết với axit nucleic thường có nguồn gốc từ một Bộ phận tác động giống chất kích hoạt phiên mã (TALE) và một vùng xúc tác nucleaza để cắt một trình tự axit nucleic mục tiêu. Vùng xúc tác tốt hơn là một vùng nucleaza và tốt hơn nữa là một

vùng có hoạt tính endonucleaza, như I-TevI, ColE7, NucA và Fok-I. Trong một phương án cụ thể, vùng TALE có thể được liên hợp với một meganucleaza như I-CreI và I-OnuI hoặc biến đổi chức năng của chúng. Trong một phương án ưu tiên hơn, nucleaza nói trên là một TALE-Nucleaza đơn thể. Một TALE-Nucleaza đơn thể là một TALE-Nucleaza mà không đòi hỏi dime hóa cho việc nhận biết đặc hiệu và cắt, như các liên hợp của đoạn lặp TAL được thiết kế với vùng xúc tác của I-TevI được mô tả trong tài liệu WO2012138927. Bộ phận tác động giống chất kích hoạt phiên mã (TALE) là các protein từ các loài vi khuẩn *Xanthomonas* bao gồm một số các trình tự lặp, mỗi trình tự lặp bao gồm hai đơn phân ở vị trí 12 và 13 (RVD) mà đặc hiệu với mỗi bazơ nucleotit của trình tự axit nucleic được nhắm mục tiêu. Vùng liên kết với các đặc tính liên kết axit nucleic bazơ-với-bazơ với mô-đun tương tự (MBBBD) có thể có nguồn gốc từ các protein mô-đun mới được phát hiện gần đây bởi tác giả ở các loài vi khuẩn khác nhau. Các protein mô-đun mới có ưu điểm là bộc lộ sự biến đổi nhiều hơn các đoạn lặp TAL. Tốt hơn, các RVD kết hợp với sự nhận biết của các nucleotit khác nhau là HD để nhận biết C, NG để nhận biết T, NI để nhận biết A, NN để nhận biết G hoặc A, NS để nhận biết A, C, G hoặc T, HG để nhận biết T, IG để nhận biết T, NK để nhận biết G, HA để nhận biết C, ND để nhận biết C, HI để nhận biết C, HN để nhận biết G, NA để nhận biết G, SN để nhận biết G hoặc A và YG để nhận biết T, TL để nhận biết A, VT để nhận biết A hoặc G và SW để nhận biết A. Trong phương án khác, các axit amin quan trọng 12 và 13 có thể bị đột biến theo hướng các nhóm axit amin để điều chỉnh tính đặc hiệu của chúng đối với các nucleotit A, T, C và G và cụ thể là tăng cường tính đặc hiệu này. TALE-nucleaza đã được mô tả và sử dụng để kích thích việc nhắm mục tiêu và biến đổi gen (Boch, Scholze và cộng sự 2009; Moscou và Bogdanove 2009; Christian, Cermak và cộng sự 2010; Li, Huang và cộng sự 2011). Các TAL-nucleaza được thiết kế được thương mại hóa dưới tên thương mại TALENTM (Cellestis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France).

Endonucleaza cắt hiếm theo sáng chế có thể là một endonucleaza Cas9. Gần đây, một công cụ thiết kế hệ gen mới được phát triển dựa trên enzym ARN-guided Cas9 nucleaza (Gasiunas, Barrangou và cộng sự 2012; Jinek, Chylinski và cộng sự 2012; Cong, Ran và cộng sự 2013; Mali, Yang và cộng sự 2013) từ CRISPR loại II (nhóm các đoạn ngắn đối xứng lặp lại thường xuyên) của hệ thống miễn dịch đáp ứng

ở prokaryote (xem tổng quan (Sorek, Lawrence và cộng sự 2013)). Hệ thống liên kết với CRISPR (Cas) đầu tiên được phát hiện ở vi khuẩn và có chức năng bảo vệ khỏi các ADN ngoại lai, hoặc do virus hoặc plasmid. Thiết kế hệ gen qua trung gian CRISPR được thực hiện đầu tiên là chọn lọc trình tự mục tiêu thường nằm cạnh một mô-tip trình tự ngắn, gọi là các mô-tip liên kề với đoạn đệm đầu tiên (PAM). Sau bước chọn lọc trình tự mục tiêu, một crARN đặc hiệu, bổ sung với trình tự mục tiêu được thiết kế. crARN hoạt tính trans (tracrARN) được yêu cầu trong hệ thống CRISPR loại II bắt cặp với crARN và liên kết với protein Cas9 được tạo ra. Cas9 hoạt động như một cái neo phân tử tạo thuận lợi cho việc bắt cặp bazơ giữa tracrARN với crARN (Deltcheva, Chylinski và cộng sự 2011). Trong phức bậc ba này, cấu trúc tracrARN:crARN kép hoạt động như ARN dẫn đường để định hướng endonucleaza Cas9 đến trình tự mục tiêu cùng nguồn gốc. Nhận biết mục tiêu bởi phức Cas9-tracrARN:crARN được bắt đầu bằng việc quét trình tự mục tiêu để tìm sự tương đồng giữa trình tự mục tiêu và crARN. Ngoài sự bổ sung giữa trình tự mục tiêu và crARN, việc nhắm mục tiêu vào ADN còn đòi hỏi sự có mặt một mô-tip ngắn liền kề với đoạn đệm đầu tiên (mô-tip liền kề với đoạn đệm đầu tiên - PAM). Tiếp sau sự bắt cặp giữa ARN kép và trình tự mục tiêu, Cas9 tạo ra sự bẻ gãy mạch kép ở 3 bazơ ở đầu của mô-tip PAM (Garneau, Dupuis và cộng sự 2010).

Endonucleaza cắt hiếm có thể là một homing endonucleaza, còn được biết đến dưới tên meganucleaza. Các homing endonucleaza được biết đến rộng rãi trong nghiên cứu (Stoddard 2005). Các homing endonucleaza nhận biết một trình tự ADN mục tiêu và tạo ra một sự bẻ gãy mạch đơn hoặc kép. Các homing endonucleaza có tính đặc hiệu cao, nhận biết vị trí mục tiêu trên ADN trong phạm vi chiều dài từ 12 đến 45 cặp bazơ, thường chiều dài từ 14 đến 40 cặp bazơ. Các homing endonucleaza theo sáng chế có thể tương ứng với, ví dụ, một LAGLIDADG endonucleaza, một HNH endonucleaza, hoặc một GIY-YIG endonucleaza. Homing endonucleaza được ưu tiên theo sáng chế có thể là một biến thể I-*CreI*.

- “Vectơ vận chuyển” hoặc “các vectơ vận chuyển” dùng để chỉ bất kỳ vectơ vận chuyển mà được sử dụng trong sáng chế để đưa vào tế bào qua tiếp xúc (tức là “tiếp xúc”) hoặc vận chuyển trong các tế bào hoặc các bộ phận dưới tế bào (tức là “đưa vào”) các tác nhân/các hóa chất và các phân tử (các protein hoặc các axit nucleic)

cần thiết trong sáng chế. Bao gồm, nhưng không hạn chế, các vector vận chuyển liposom, vector vận chuyển virus, vector vận chuyển thuốc, chất mang hóa chất, chất mang polyme, các lipoplex, các polyplex, các dendrimer, các vi bọt khí (các chất tương phản siêu âm), các hạt nano, nhũ tương hoặc các vector vận chuyển khác. Các vector vận chuyển này cho phép vận chuyển các phân tử, các chất hóa học, các đại phân tử (các gen, các protein), hoặc các vector như các plasmid, các peptit được phát triển bởi Diatos. Trong các trường hợp này, các vector vận chuyển là chất mang phân tử. “Vector vận chuyển” hoặc “các vector vận chuyển” cũng để chỉ các phương pháp vận chuyển để thực hiện chuyển nạp.

- Các thuật ngữ "vector" hoặc “các vector” dùng để chỉ một phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết. Một “vector” theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn, một vector virus, một plasmid, một vector ARN hoặc một phân tử ADN hoặc ARN mạch thẳng hoặc mạch vòng mà có thể chứa các axit nucleic nhiễm sắc thể, không nhiễm sắc thể, bán tổng hợp hoặc tổng hợp. Các vector được ưu tiên là các vector có khả năng tự nhân lên (vector episome) và/hoặc biểu hiện các axit nucleic mà được liên kết (các vector biểu hiện). Một số lượng lớn các vector thích hợp đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và sẵn có trên thị trường.

Các vector virus bao gồm retrovirus, adenovirus, parvovirus (ví dụ như adeno-associated viruses), coronavirus, virus ARN sợi âm như orthomyxovirus (ví dụ như virus cúm), rhabdovirus (ví dụ như virus dại và virus viêm miệng mụn nước), paramyxovirus (ví dụ như virus bệnh sởi và virus Sendai), các virus ARN sợi dương chẳng hạn như picornavirus và alphavirus, và các virus ADN mạch kép bao gồm adenovirus, herpesvirus (ví dụ như virus Herpes Simplex tuýp 1 và 2, virus Epstein-Barr, cytomegalovirus), và poxvirus (ví dụ như virus đậu mùa, đậu gà). Các virus khác bao gồm, ví dụ, Norwalk virus (virus gây tiêu chảy), togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus, và virus viêm gan. Các ví dụ cho retrovirus bao gồm: ung thư mô liên kết - máu trắng ở gia cầm, avian leukosis-sarcoma, các virus tuýp C, tuýp B, tuýp D ở động vật có vú, nhóm HTLV-BLV, lentivirus, spumavirus (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Xuất bản lần

thứ ba, B. N. Fields, và cộng sự, Eds., Nhà xuất bản Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996).

- “Vector lentivirus” có nghĩa là các vector lentivirus dựa trên HIV mà rất có triển vọng trong việc vận chuyển gen vì khả năng đóng gói tương đối lớn của nó, tính sinh miễn dịch giảm và khả năng tải nạp ổn định với hiệu suất cao và phạm vi rộng các loại tế bào khác nhau. Các vector lentivirus thường được tạo ra sau chuyển nạp tạm thời của ba (đóng gói, tạo vỏ và chuyển đi) hoặc nhiều plamid vào các tế bào sản xuất. Giống như HIV, các vector lentivirus xâm nhập vào tế bào mục tiêu thông qua tương tác của các glycoprotein bề mặt virus với các thụ thể trên bề mặt tế bào. Khi tiếp nhận, ARN của virus trải qua phiên mã ngược, được thực hiện qua trung gian là phức phiên mã ngược của virus. Sản phẩm của quá trình phiên mã ngược là ADN kép mạch thẳng của virus, mà là cơ chất cho sự tích hợp của virus vào ADN của các tế bào bị truyền nhiễm. “Các vector lentivirus tích hợp (hoặc LV)”, có nghĩa là các vector như ví dụ không hạn chế, mà có khả năng tích hợp vào hệ gen của một tế bào mục tiêu. Ngược lại là “các vector lentivirus không tích hợp (hoặc NILV)” là các vector vận chuyển gen hiệu quả mà không tích hợp với hệ gen của tế bào mục tiêu thông qua hoạt động tích hợp của virus.

- Các vector vận chuyển và các vector có thể liên kết hoặc kết hợp với bất kỳ kỹ thuật thẩm thấu tế bào nào như sự tạo lỗ tạm thời trên màng bởi sóng âm hoặc xung điện hoặc các dẫn xuất của các kỹ thuật này.

- Tế bào hoặc các tế bào để chỉ bất kỳ tế bào sống nhân chuẩn nào, tế bào sơ cấp và dòng tế bào có nguồn gốc từ các sinh vật này cho việc nuôi cấy *in vitro*.

- “Tế bào sơ cấp” hoặc “các tế bào sơ cấp” để chỉ các tế bào được lấy trực tiếp từ mô sống (ví dụ như mẫu sinh thiết) và được đưa vào để sinh trưởng trong ống nghiệm, mà đã trải qua một vài thế hệ nhân đôi và do đó biểu hiện nhiều hơn các thành phần chức năng chính và các đặc tính của các mô mà chúng có nguồn gốc từ đó, so với các dòng tế bào tạo ra khối u liên tục hoặc các dòng tế bào bất tử nhân tạo.

Như các ví dụ không hạn chế, các dòng tế bào có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm các tế bào CHO-K1; các tế bào HEK293; các tế bào Caco2; các tế bào U2-OS; các tế bào NIH 3T3; các tế bào NSO; các tế bào SP2; các tế bào CHO-S; các tế bào DG44; các tế bào K-562; các tế bào U-937; các tế bào MRC5; các tế bào IMR90;

các tế bào Jurkat; các tế bào HepG2; các tế bào HeLa; các tế bào HT-1080; các tế bào HCT-116; các tế bào Hu-h7; các tế bào Huvec; các tế bào Molt 4.

Tất cả các dòng tế bào này có thể bị biến đổi bằng các phương pháp theo sáng chế để tạo ra các mô hình dòng tế bào để tạo ra, biểu hiện, định lượng, phát hiện, nghiên cứu một gen hoặc một protein quan tâm; các mô hình này có thể được sử dụng để sàng lọc các phân tử có hoạt tính sinh học quan tâm trong nghiên cứu và sản xuất và các lĩnh vực khác nhau như hóa học, nhiên liệu sinh học, trị liệu và nông học như các ví dụ không hạn chế.

- “đột biến” để chỉ sự thay thế, xóa bỏ, chèn thêm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm, hai mươi, hai mươi lăm, ba mươi, bốn mươi, năm mươi hoặc nhiều hơn các nucleotit/axit amin trong một polynucleotit (cADN, gen) hoặc một trình tự polypeptit. Đột biến có thể ảnh hưởng đến trình tự mã hóa của một gen hoặc trình tự điều hòa của nó. Cũng có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của trình tự hệ gen hoặc cấu trúc/độ bền của mARN được mã hóa.

- “biến thể” dùng để chỉ một biến thể lặp, một biến thể, một biến thể liên kết ADN, một biến thể TALE-nucleaza, một biến thể polypeptit thu được nhờ sự đột biến hoặc thay thế ít nhất một đơn phân trong trình tự axit amin của phân tử ban đầu.

- “biến thể chức năng” để chỉ một đột biến hoạt hóa xúc tác của một protein hoặc một vùng của protein; các đột biến này có thể có cùng hoạt tính so với protein ban đầu hoặc vùng protein ban đầu hoặc thêm các đặc tính, hoặc hoạt tính cao hơn hoặc thấp hơn.

- “tương đồng” dùng để chỉ sự giống nhau trong trình tự giữa hai phân tử axit nucleic hoặc polypeptit. Sự tương đồng có thể được xác định bằng cách so sánh một vị trí ở mỗi trình tự mà bắt cặp cho mục đích so sánh. Khi một vị trí trong trình tự so sánh được giữ bởi cùng bazơ, thì các phân tử là tương đồng ở vị trí đó. Mức độ tương tự hoặc tương đồng giữa các trình tự axit nucleic hoặc axit amin là một hàm số của số lượng các nucleotit tương đồng hoặc bắt cặp ở các vị trí giống nhau trong các trình tự axit nucleic. Các thuật toán và/hoặc chương trình bắt cặp trình tự có thể được sử dụng để tính toán độ tương đồng giữa hai trình tự, bao gồm FASTA, hoặc BLAST mà có sẵn như một phần trong gói phân tích trình tự GCG (Trường Đại học Wisconsin, Madison, Wis.), và có thể được sử dụng với, ví dụ như, thiết lập mặc định. Ví dụ, các

polypeptit có độ tương đồng ít nhất 70%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 99% với các trình tự đặc hiệu được mô tả trong tài liệu này và tốt hơn là bộc lộ các chức năng tương tự, cũng như polynucleotit mã hóa các polypeptit như vậy, được dự tính.

- “tương tự” mô tả mối quan hệ giữa các trình tự axit amin của hai hay nhiều polypeptit. BLASTP cũng có thể được sử dụng để nhận dạng một trình tự axit amin có ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 87.5%, 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 98%, 99% trình tự tương tự với một trình tự tham khảo sử dụng một ma tương đồng như BLOSUM45, BLOSUM62 hoặc BLOSUM80. Trừ khi có chỉ thị khác, một điểm tương tự sẽ dựa trên việc sử dụng. Khi sử dụng BLASTP, phần trăm tương tự dựa trên số điểm dương BLASTP và độ tương đồng của trình tự theo phần trăm dựa trên số điểm tương đồng BLASTP. “Tương đồng” BLASTP chỉ số lượng và một phần trong tổng số đơn phân trong các cặp trình tự tương đồng điểm số cao; và BLASTP “dương” chỉ số lượng và một phần trong tổng số đơn phân mà số điểm bắt cặp là giá trị dương và tương tự với nhau. Các trình tự axit amin có mức độ tương đồng hoặc tương tự này hoặc bất kỳ mức độ tương đồng hoặc bất kỳ mức độ tương đồng hoặc tương tự trung gian nào với các trình tự axit amin được bộc lộ trong tài liệu này được dự tính và bao gồm bởi sự bộc lộ này. Các trình tự polynucleotit của các trình tự polypeptit tương đồng được suy ra bằng cách sử dụng mã di truyền và có thể thu được bằng các cách thông thường. Một polynucleotit mã hóa cho một biến thể chức năng như vậy có thể được tạo ra bằng cách dịch mã ngược trình tự axit amin của nó sử dụng mã di truyền.

- “vùng chuyển đổi tín hiệu” hoặc “phối tử đồng kích thích” dùng để chỉ một phân tử trên một tế bào trình diện kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với một phân tử đồng kích thích cùng nguồn gốc trên một tế bào T, do vậy tạo ra một tín hiệu, ngoài tín hiệu sơ cấp được tạo ra bởi, ví dụ, sự liên kết của một phức TCR/CD3 với một phân tử MHC được kết hợp với peptit, mang lại một đáp ứng tế bào T, bao gồm nhưng không giới hạn, kích hoạt sự tăng sinh, biệt hóa và các phản ứng tương tự. Một phối tử đồng kích thích có thể bao gồm nhưng không giới hạn CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, phối tử đồng kích thích cảm ứng (ICOS-L), phân tử kết dính gian bào (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, thụ thể lymphotoxin beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, một chất đồng vận hoặc một kháng thể liên kết với thụ thể phối tử Toll và một phối tử liên kết đặc hiệu với B7-H3.

Một phối tử đồng kích thích cũng bao gồm, nhưng không giới hạn ở đó, một kháng nguyên liên kết đặc hiệu với một phân tử đồng kích thích có mặt trên tế bào T, ví dụ nhưng không giới hạn, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, kháng nguyên-1 liên quan đến chức năng lympho bào (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, một phối tử liên kết đặc hiệu với CD83.

Một “phân tử đồng kích thích” dùng để chỉ đối tác liên kết cùng nguồn gốc trên tế bào T mà liên kết đặc hiệu với một phối tử đồng kích thích, do đó dẫn đến một phản ứng đồng kích thích bởi tế bào, ví dụ, nhưng không giới hạn, sự tăng sinh. Các phân tử đồng kích thích bao gồm, nhưng không giới hạn, một phân tử MHC loại I, BTLA và thụ thể của phối tử Toll.

Một “tín hiệu đồng kích thích” được dùng trong tài liệu này để chỉ một tín hiệu, mà được kết hợp với tín hiệu sơ cấp, chẳng hạn như ghép nối TCR/CD3, dẫn đến sự tăng sinh tế bào T và/hoặc điều hòa tăng hoặc điều hòa giảm các phân tử quan trọng.

-Thuật ngữ “vùng liên kết phối tử ngoại bào” được sử dụng trong tài liệu này được định nghĩa như một oligo- hoặc polypeptit mà có khả năng liên kết với một phối tử. Tốt hơn, vùng này có khả năng tương tác với một phân tử trên bề mặt tế bào. Ví dụ, vùng liên kết phối tử ngoại bào có thể được lựa chọn để nhận biết một phối tử hoạt động như một chỉ thị ở bề mặt tế bào ở tế bào đích mà liên quan đến một bệnh lý cụ thể. Do đó ví dụ về các chỉ thị bề mặt tế bào hoạt động như các phối tử bao gồm các chỉ thị liên quan đến nhiễm trùng do virus, vi khuẩn và ký sinh trùng, bệnh tự miễn và các tế bào ung thư.

Thuật ngữ “đối tượng” hoặc “người bệnh” được dùng trong tài liệu này bao gồm tất cả các loài động vật bao gồm cả động vật linh trưởng và con người.

Bản mô tả sáng chế đề xuất cách thức và quy trình tạo ra và sử dụng sáng chế mà bất cứ người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật đều có khả năng tạo ra và sử dụng sáng chế, khả năng này có thể thực hiện được đặc biệt với các đối tượng của các điểm yêu cầu bảo hộ, mà là một phần của bản mô tả ban đầu.

Trường hợp một giới hạn hoặc phạm vi về trị số được nêu trong tài liệu này, các điểm giới hạn được tính đến. Tất cả các trị số và phạm vi con trong một giới hạn hoặc phạm vi về trị số được tính đến nếu được mô tả rõ ràng.

Phần mô tả nêu trên được trình bày để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể tạo ra và sử dụng sáng chế, và được tạo ra trong một bối cảnh cụ thể của một ứng dụng cụ thể và các yêu cầu của nó. Sự biến đổi khác nhau đến các phương án ưu tiên sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và các nguyên tắc chung được quy định trong tài liệu này có thể được áp dụng cho các phương án và các ứng dụng khác mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Do vậy, sáng chế không dự tính giới hạn các phương án đã đề xuất, mà có phạm vi rộng nhất phù hợp với các nguyên tắc và dấu hiệu đã được bộc lộ trong tài liệu này.

Sáng chế đã được mô tả tổng quát, một sự hiểu biết sâu hơn có thể có được bằng cách tham khảo các ví dụ cụ thể nhất định, là các ví dụ được đưa ra trong tài liệu này chỉ với mục đích minh họa, mà không dự tính giới hạn sáng chế trừ khi có mô tả cụ thể khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sự tăng sinh của các tế bào bất hoạt TCRalpha biểu hiện 4G7-CAR.

TALE-nucleaza dị dime nhắm mục tiêu đến 2 trình tự dài 17 bp (được gọi là các mục tiêu phân đôi) được ngăn cách bởi một đoạn đệm 15 bp trong vùng hằng định của gen của chuỗi alpha của thụ thể tế bào (TRAC) được thiết kế và sản xuất. Mỗi mục tiêu phân đôi được nhận biết bởi các đoạn lặp của TALE-nucleaza phân đôi được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1

Mục tiêu	Trình tự mục tiêu	Trình tự lặp	TALE-nucleaza phân đôi
TRAC_T0 1	TTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (trình tự nhận dạng số: 20)	Lặp TRAC_T01-L (Trình tự nhận dạng số: 21)	TRAC_T01-L TALEN (Trình tự nhận dạng số: 23)
		Lặp TRAC_T01-R (Trình tự nhận dạng số: 22)	TRAC_T01-R TALEN (Trình tự nhận dạng số: 24)

Mỗi cấu trúc TALE-nucleaza được tạo dòng thuần sử dụng việc cắt của enzym giới hạn trong một vectơ biểu hiện ở động vật có vú dưới sự kiểm soát của promoter

T7. mARN mã hóa TALE-nucleaza cắt trình tự TRAC trên hệ gen được tổng hợp từ plasmid mang trình tự mã hóa ở cuối promoter T7.

Các tế bào T được tinh sạch được tái hoạt hóa trong 72 giờ với các hạt phủ antiCD3/CD28 được chuyển nạp với mỗi phân tử trong hai mARN mã hóa cho cả hai nucleaza TRAC_T01 TALE phân đôi. 48 giờ sau chuyển nạp, các tế bào T được tái nạp với vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR (Trình tự nhận dạng số: 14). 2 ngày sau tái nạp, các tế bào CD3_{NEG} được tinh sạch sử dụng các hạt từ tính anti-CD3 và 5 ngày sau tái nạp các tế bào được tái hoạt hóa với anti-CD28 hòa tan (5 µg/ml).

Sự tăng sinh tế bào được theo dõi trong 30 ngày sau khi tái hoạt hóa bằng cách đếm tế bào 2 lần mỗi tuần. Hình 1 chỉ ra sự cảm ứng theo cấp số nhân trong số lượng tế bào liên quan đến lượng tế bào có mặt ở ngày 2 sau khi tái hoạt hóa cho hai người hiến tặng khác nhau. Sự tăng sinh tăng lên ở các tế bào bất hoạt TCR alpha biểu hiện 4G7-CAR, đặc biệt khi tái hoạt hóa với anti-CD28, được quan sát so với các tế bào không tái nạp.

Để nghiên cứu xem các tế bào T ở người biểu hiện 4G7-CAR có bộc lộ trạng thái hoạt hóa hay không, sự biểu hiện của chỉ thị hoạt hóa CD25 được phân tích bởi FACS 7 ngày sau khi tái nạp. Như biểu thị trong Hình 2, các tế bào đã tinh sạch được tái nạp với vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR đã biểu hiện CD25 trên bề mặt nhiều hơn đáng kể so với các tế bào không tái nạp. Biểu hiện CD25 tăng được quan sát ở cả điều kiện tái hoạt hóa CD28 và không tái hoạt hóa.

Ví dụ 2: So sánh sự hoạt hóa cơ bản của các tế bào T sơ cấp ở người biểu hiện 4G7-CAR và FMC63-CAR cổ điển.

Để xác định xem 4G7 scFv có tạo ra trạng thái “hoạt hóa” kéo dài ở tế bào tái nạp hay không, sự hoạt hóa cơ bản của tế bào T được tái nạp CAR chứa 4G7 scFv (Trình tự nhận dạng số: 17 mã hóa Trình tự nhận dạng số: 15) hoặc FMC63 scFv cổ điển (Trình tự nhận dạng số: 16) được so sánh.

Các tế bào T ở người được tinh sạch được tái nạp theo quy trình sau: tóm tắt, 1×10^6 CD3⁺ các tế bào đã được hoạt hóa trước trong 3 ngày với các hạt phủ anti CD3/CD28 và IL2 tái tổ hợp được tái nạp cùng vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR (Trình tự nhận dạng số: 15) và FMC63-CAR (Trình tự nhận dạng số: 16) ở một giá trị MOI của 5 trong đĩa nuôi cấy mô 12 giếng phủ 30µg/ml retronectin. 24 giờ sau khi tái nạp môi trường

được loại bỏ và thay thế bằng môi trường mới. Các tế bào được duy trì ở nồng độ 1×10^6 tế bào/ml trong suốt thời gian nuôi cấy bằng cách đếm tế bào mỗi 2-3 ngày.

3, 8 và 15 ngày sau khi tải nạp với vector lentivirus mã hóa hoặc 4G7-CAR hoặc FMC63-CAR, phần trăm các tế bào biểu hiện CAR được đánh giá bằng phân tích tế bào theo dòng chảy. Quan sát thấy rằng hiệu quả tải nạp là tương đối bằng nhau với hai vector lentivirus Hình 3.

Sau đó có điều tra xem các tế bào T ở người biểu hiện 4G7-CAR có bộc lộ trạng thái hoạt hóa dài hơn so với các tế bào T ở người biểu hiện FMC63-CAR. Vì mục đích này sự biểu hiện của chỉ thị hoạt hóa CD25 được so sánh ở bề mặt của tế bào T được tải nạp 2 vector lentivirus ở các thời điểm khác nhau. Như được biểu thị trong Hình 4, 3 và 8 ngày sau khi tải nạp, các tế bào được tải nạp với vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR biểu hiện CD25 nhiều hơn đáng kể so với các tế bào được tải nạp với vector lentivirus mã hóa FMC63-CAR.

Kích thước của các tế bào được tải nạp 4G7-CAR hoặc FMC63-CAR cũng được đánh giá bằng phân tích tế bào theo dòng chảy ở các thời điểm khác nhau. Quan sát thấy rằng các tế bào biểu hiện 4G7-CAR lớn hơn các tế bào biểu hiện FMC63-CAR 3, 8 và 15 ngày sau khi tải nạp Hình 5.

Sau khi hoạt hóa không đặc hiệu trong ống nghiệm, các tế bào tải nạp 4G7-CAR bộc lộ kích thước tế bào tăng (tạo dạng blast) cũng như biểu hiện các chỉ thị (CD25) trong một khoảng thời gian kéo dài. Sự hoạt hóa trong thời gian dài cho phép tăng sinh kéo dài so với các tế bào được tải nạp một CAR tương tự chứa FMC63 ScFv. Ví dụ 3: So sánh sự tăng sinh của các tế bào T sơ cấp ở người biểu hiện 4G7-CAR và FMC63-CAR cổ điển.

Để xác định xem 4G7 scFv có tạo ra hoạt động tăng sinh cao hơn hay không, sự tăng sinh của tế bào T được tải nạp CAR chứa 4G7 scFv (Trình tự nhận dạng số: 17 mã hóa trình tự nhận dạng số: 15) hoặc chứa FMC63 scFv cổ điển (Trình tự nhận dạng số: 16) được theo dõi 20 ngày bằng cách đếm tế bào hai lần mỗi tuần. Các tế bào T ở người đã được tinh sạch được tải nạp theo các quy trình sau: tóm tắt, 1×10^6 CD3+ các tế bào đã hoạt hóa trước trong 3 ngày với các hạt phủ anti CD3/CD28 và IL2 tái tổ hợp được tải nạp với các vector lentivirus mã hóa 4G7-CAR (Trình tự nhận dạng số: 15) và FMC63-CAR (Trình tự nhận dạng số: 16). Các tế bào được duy trì ở các điều kiện cổ

điễn và được tái hoạt hóa ở ngày thứ 12. Các tế bào được cấy ở mật độ tương tự nhau và được đếm 2 lần mỗi tuần trong 20 ngày. Như được thể hiện trong Hình 6, hoạt động tăng sinh của các tế bào T biểu hiện 4G7-CAR cao gấp hai lần so với các tế bào biểu hiện FMC63-CAR cổ điển.

Tài liệu tham khảo

1. Arimondo, P. B., C. J. Thomas, và cộng sự (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." Mol Cell Biol **26**(1): 324-33.
2. Atkins, J. F., N. M. Wills, và cộng sự (2007). "A case for "StopGo": reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go)." Rna **13**(6): 803-10.
3. Bierer, B. E., G. Hollander, và cộng sự (1993). "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology." Curr Opin Immunol **5**(5): 763-73.
4. Boch, J., H. Scholze, và cộng sự (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." Science **326**(5959): 1509-12.
5. Choulika, A., A. Perrin, và cộng sự (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **15**(4): 1968-73.
6. Christian, M., T. Cermak, và cộng sự (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." Genetics **186**(2): 757-61.
7. Cong, L., F. A. Ran, và cộng sự (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science **339**(6121): 819-23.
8. Deltcheva, E., K. Chylinski, và cộng sự (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature **471**(7340): 602-7.
9. Donnelly, M. và G. Elliott (2001). "Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14." J Virol **75**(6): 2566-74.

10. Doronina, V. A., C. Wu, và cộng sự (2008). "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon." Mol Cell Biol **28**(13): 4227-39.
11. Eisenschmidt, K., T. Lanio, và cộng sự (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." Nucleic Acids Res **33**(22): 7039-47.
12. Garneau, J. E., M. E. Dupuis, và cộng sự (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." Nature **468**(7320): 67-71.
13. Gasiunas, G., R. Barrangou, và cộng sự (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(39): E2579-86.
14. Henderson, D. J., I. Naya, và cộng sự (1991). "Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production." Immunology **73**(3): 316-21.
15. Jena, B., G. Dotti, và cộng sự (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." Blood **116**(7): 1035-44.
16. Jinek, M., K. Chylinski, và cộng sự (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-21.
17. Kalish, J. M. và P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." Ann N Y Acad Sci **1058**: 151-61.
18. Li, T., S. Huang, và cộng sự (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." Nucleic Acids Res **39**(1): 359-72.

19. Liu, J., M. W. Albers, và cộng sự (1992). "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity." Biochemistry **31**(16): 3896-901.
20. Mali, P., L. Yang, và cộng sự (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science **339**(6121): 823-6.
21. Moscou, M. J. và A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." Science **326**(5959): 1501.
22. Paques, F. và P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy." Curr Gene Ther **7**(1): 49-66.
23. Park, T. S., S. A. Rosenberg, và cộng sự (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." Trends Biotechnol **29**(11): 550-7.
24. Peipp, M., D. Saul, và cộng sự (2004). "Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications." J Immunol Methods **285**(2): 265-80.
25. Perrin, A., M. Buckle, và cộng sự (1993). "Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions." Embo J **12**(7): 2939-47.
26. Pingoud, A. và G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery." Nat Biotechnol **25**(7): 743-4.
27. Porteus, M. H. và D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." Nat Biotechnol **23**(8): 967-73.
28. Rouet, P., F. Smih, và cộng sự (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." Mol Cell Biol **14**(12): 8096-106.

29. Sorek, R., C. M. Lawrence, và cộng sự (2013). "CRISPR-mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea." Annu Rev Biochem.
30. Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function." Q Rev Biophys **38**(1): 49-95.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 bao gồm ít nhất một vùng liên kết phối tử ngoại bào, một vùng xuyên màng và ít nhất một vùng tín hiệu nội bào trong đó vùng ngoại bào nói trên bao gồm đoạn FV mạch đơn bắt nguồn từ kháng thể đơn dòng 4G7, đặc hiệu cho CD19, đoạn FV mạch đơn này bao gồm các đoạn biến đổi của chuỗi nặng gamma 1 globulin miễn dịch 4G7 kháng thể đơn dòng CD19 có SEQ ID NO: 3 và các đoạn biến đổi của chuỗi nhẹ kappa globulin miễn dịch 4G7 kháng thể đơn dòng CD19 có SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5.
2. Thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 theo điểm 1, trong đó đoạn FV mạch đơn nói trên bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 7 hoặc 8 .
3. Thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vùng tín hiệu nội bào nói trên bao gồm vùng tín hiệu zeta CD3.
4. Thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vùng tín hiệu nội bào nói trên bao gồm vùng 4-1BB.
5. Thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó thụ thể này bao gồm vùng xuyên màng chuỗi alpha CD8 của người và phần cuống.
6. Thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó thụ thể này bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 hoặc 15.
7. Thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó thụ thể này bao gồm vùng liên kết phối tử ngoại bào khác không đặc hiệu với CD19.
8. Polynucleotit mã hóa thụ thể kháng nguyên dạng khảm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.
9. Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit theo điểm 8.
10. Tế bào miễn dịch được thiết kế di truyền biểu hiện trên bề mặt màng tế bào thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 bao gồm ít nhất một vùng liên kết phối tử

ngoại bào và ít nhất một vùng tín hiệu nội bào trong đó vùng ngoại bào nói trên bao gồm đoạn FV mạch đơn có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng 4G7, đặc hiệu cho CD19, đoạn FV mạch đơn này bao gồm các đoạn biến đổi của chuỗi nặng gamma 1 globulin miễn dịch 4G7 kháng thể đơn dòng CD19 có SEQ ID NO: 3 và các đoạn biến đổi của chuỗi nhẹ kappa globulin miễn dịch 4G7 kháng thể đơn dòng CD19 có SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5.

11. Tế bào miễn dịch được thiết kế di truyền theo điểm 10, trong đó đoạn FV mạch đơn nêu trên bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 7 hoặc 8.

12. Tế bào miễn dịch được thiết kế di truyền biểu hiện trên bề mặt màng tế bào thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

13. Tế bào miễn dịch được thiết kế di truyền theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12, trong đó tế bào này còn bao gồm thụ thể kháng nguyên dạng khảm khác không đặc hiệu với CD19.

14. Tế bào miễn dịch được thiết kế di truyền theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 13, trong đó tế bào này có nguồn gốc từ các tế bào lympho T viêm, lympho T gây độc, lympho T điều hòa hoặc lympho T hỗ trợ.

15. Phương pháp thiết kế tế bào miễn dịch in vitro hoặc ex vivo bao gồm các bước:

- (a) tạo ra tế bào miễn dịch,
- (b) biểu hiện trên bề mặt tế bào nêu trên ít nhất một thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

16. Phương pháp thiết kế tế bào miễn dịch in vitro hoặc ex vivo theo điểm 15, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) tạo ra tế bào miễn dịch,
- (b) đưa vào tế bào nêu trên ít nhất một polynucleotit mã hóa cho thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19,
- (c) biểu hiện polypeptit nêu trên trong tế bào.

17. Phương pháp thiết kế tế bào miễn dịch in vitro hoặc ex vivo theo điểm 15, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) tạo ra tế bào miễn dịch,
- (b) đưa vào tế bào nêu trên ít nhất một polynucleotit mã hóa cho thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD19,
- (c) đưa vào ít nhất một thụ thể kháng nguyên dạng khảm không đặc hiệu CD19.

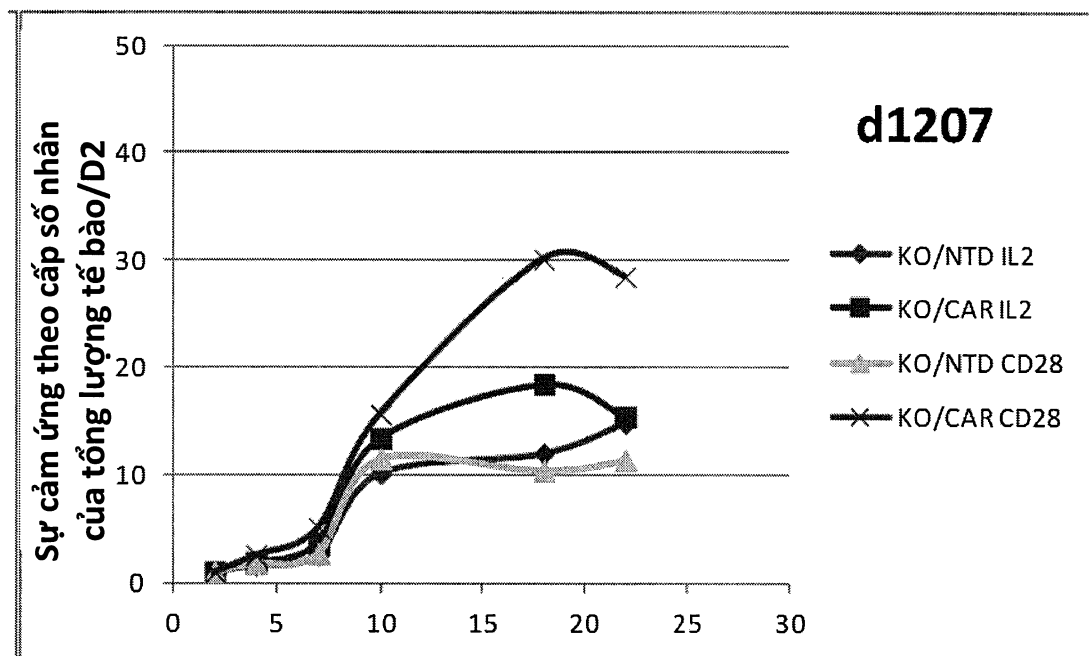
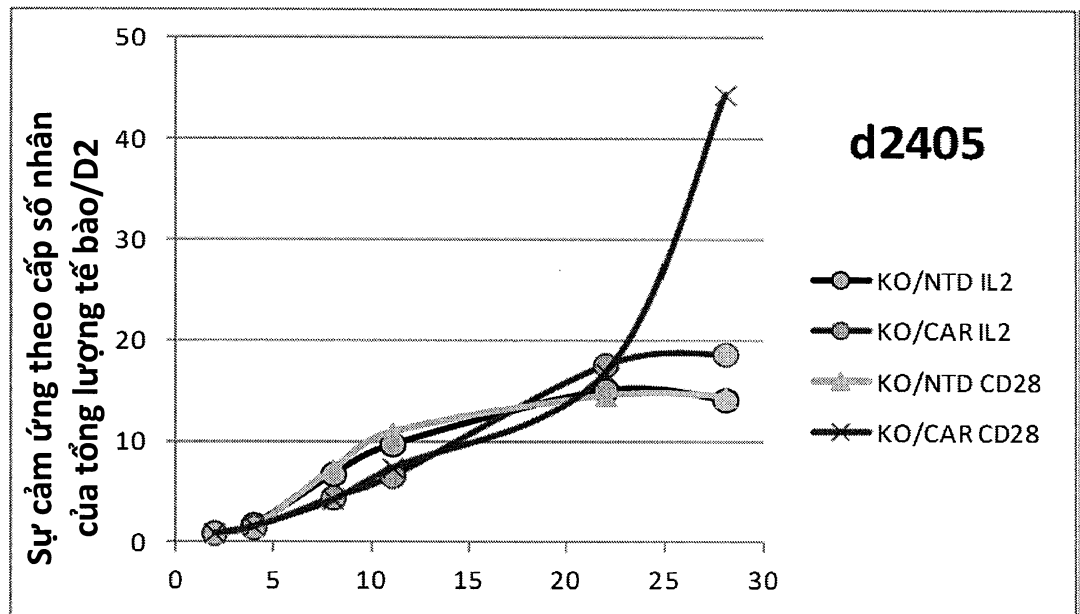


Fig. 1

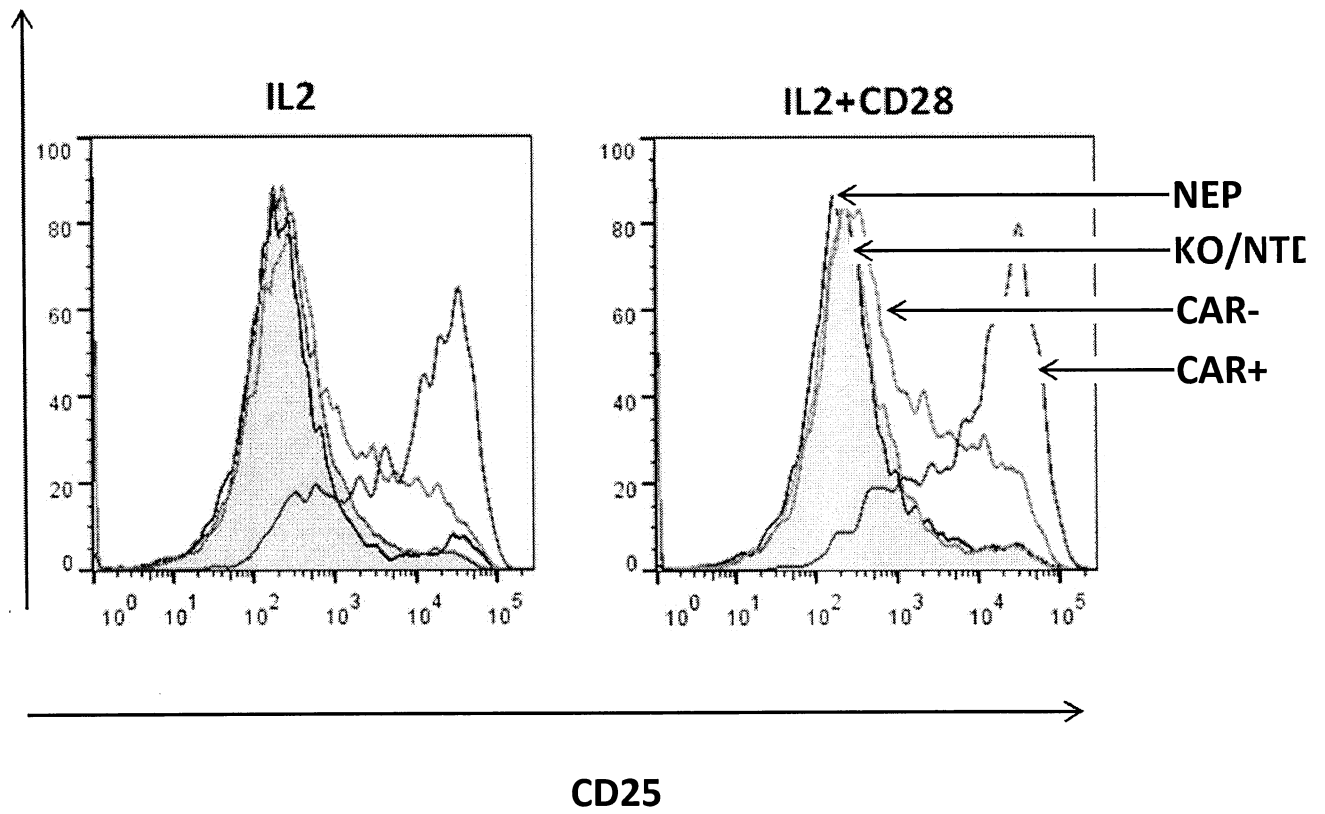


Fig.2

Số ngày
sau tải nạp

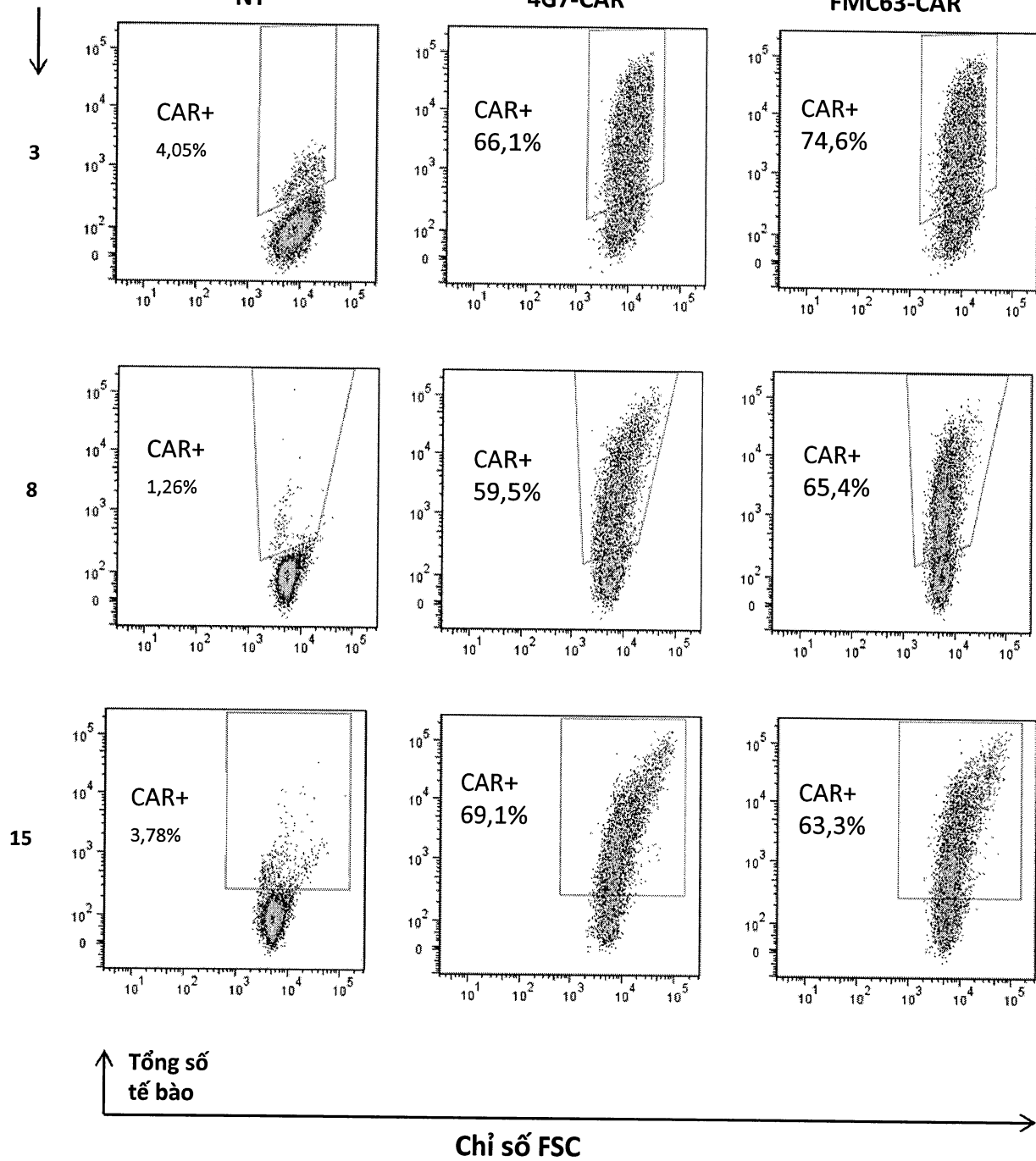


Fig.3

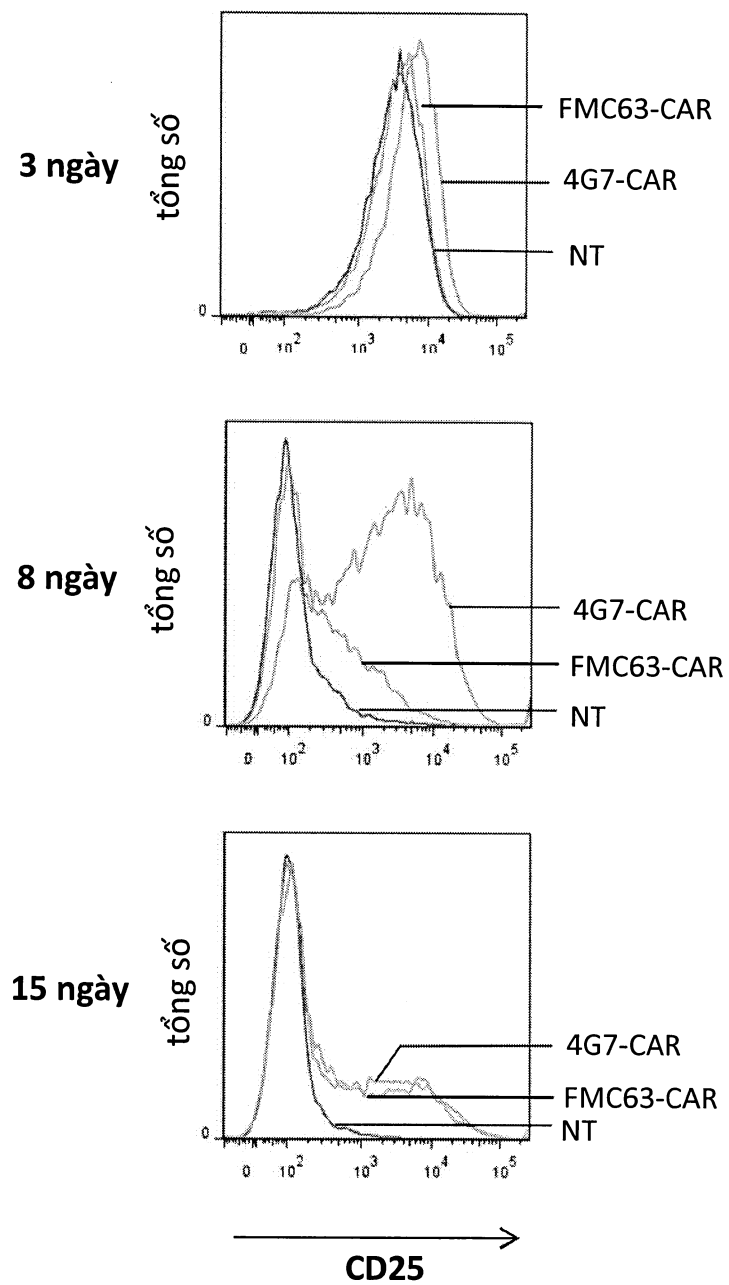


Fig.4

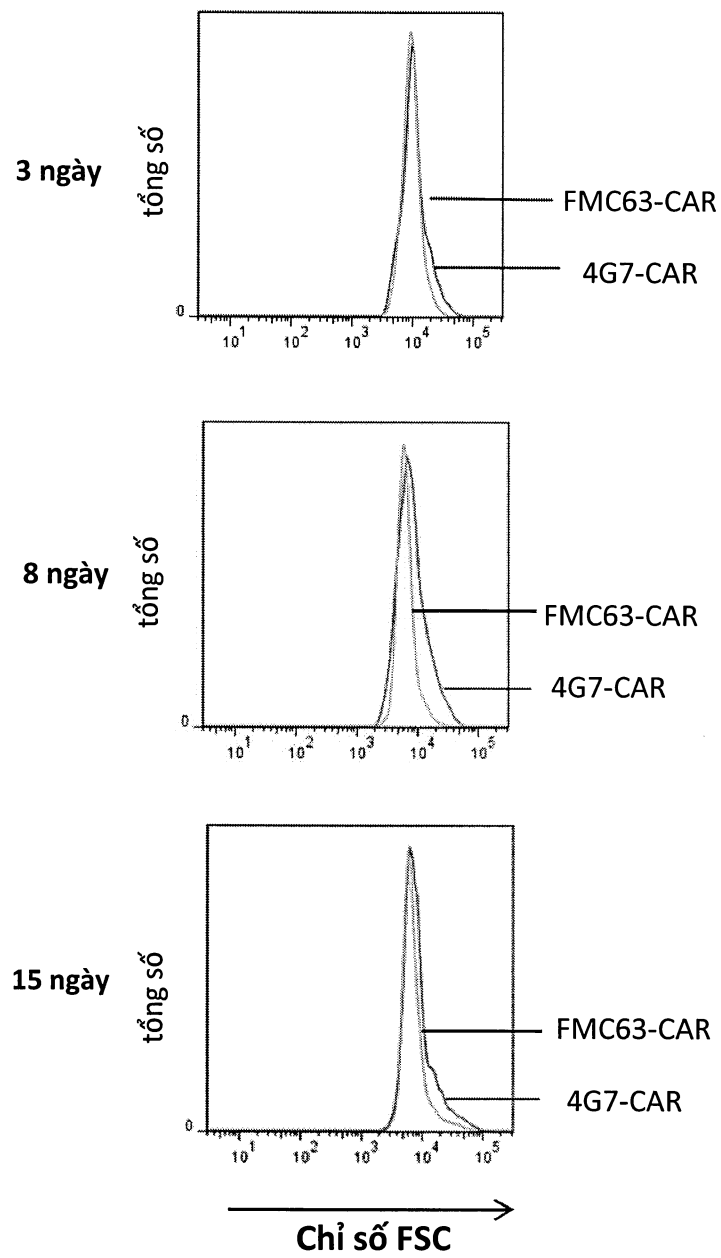


Fig.5

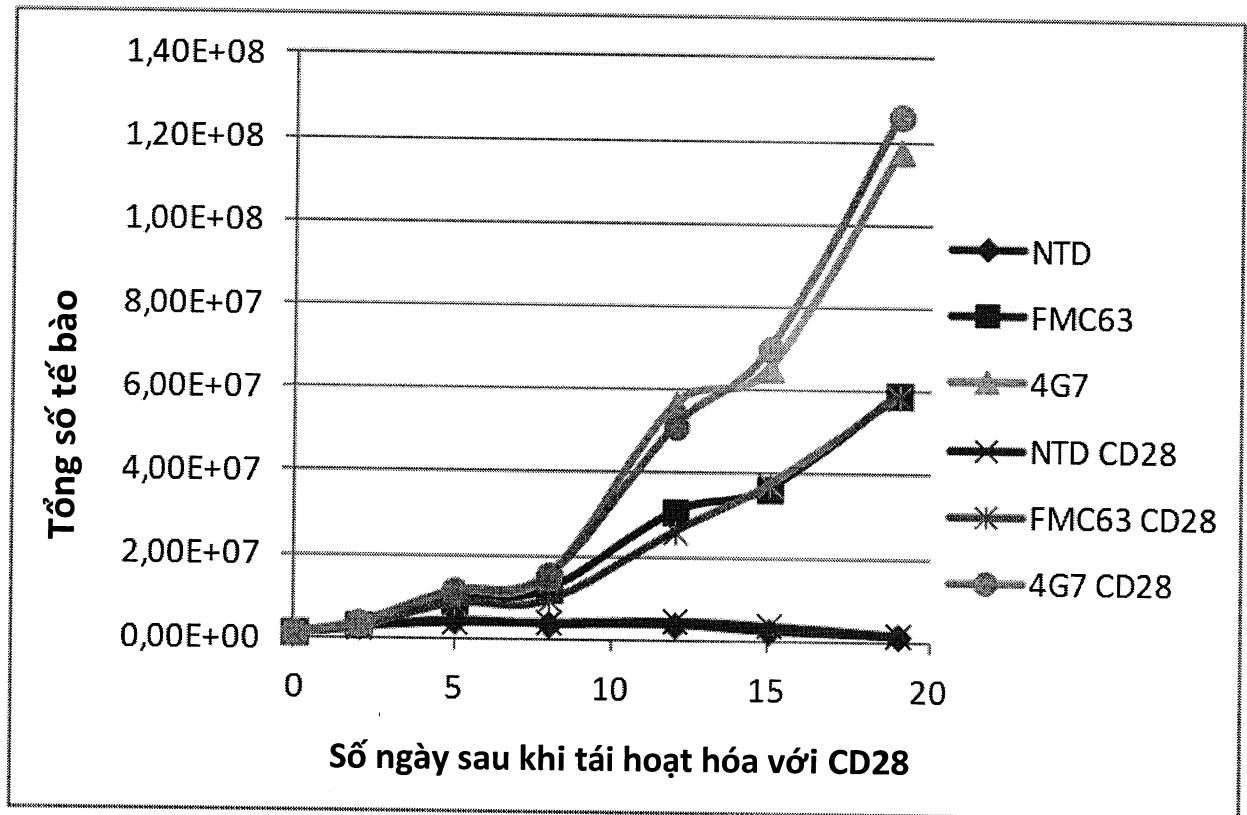


Fig.6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Collectis

<120> THỤ THỂ KHÁNG NGUYÊN DẠNG KHẢM ĐẶC HIỆU CD19,
POLYNUCLEOTIT, VECTƠ BIỂU HIỆN MÃ HÓA CHO THỤ THỂ NÀY,
TẾ BÀO MIỄN DỊCH BIỂU HIỆN THỤ THỂ NÀY TRÊN BỀ MẶT VÀ
PHƯƠNG PHÁP THIẾT KẾ TẾ BÀO MIỄN DỊCH NÀY

<130> P81403460PCT00

<150> PCT/US2013/040755

<151> 2013-05-13

<150> PCT/US2013/040766

<151> 2013-05-13

<150> US 13/892,805

<151> 2013-05-13

<150> USP 61/888,259

<151> 2013-10-08

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 464

<212> PRT

<213> chuột nhắt nhà

<220>

<223> Chuỗi nặng gamma 1 của phân tử globulin miễn dịch của
kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 kháng người

<400> 1

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr
Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
Ile Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln
Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr

Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser
 Ser 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 Val 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe
 Asp 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 Thr 130 135 140
 Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
 Asn 145 150 155
 160
 Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
 Pro 165 170 175
 Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
 Thr 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
 Val 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn
 Val 210 215 220
 Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro
 Arg 225 230 235
 240
 Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser

```

Ser
                245                      250                      255

Val Phe  Ile Phe  Pro Pro  Lys  Pro  Lys  Asp  Val  Leu  Thr  Ile  Thr
Leu
                260                      265                      270

Thr Pro  Lys  Val  Thr Cys  Val  Val  Val  Asp  Ile  Ser  Lys  Asp  Asp
Pro
                275                      280                      285

Glu Val  Gln Phe  Ser Trp  Phe  Val  Asp  Asp  Val  Glu  Val  His  Thr
Ala
                290                      295                      300

Gln Thr  Gln Pro  Arg Glu  Glu  Gln  Phe  Asn  Ser  Thr  Phe  Arg  Ser
Val
305                      310                      315
320

Ser Glu  Leu Pro  Ile Met  His  Gln  Asp  Trp  Leu  Asn  Gly  Lys  Glu
Phe
                325                      330                      335

Lys Cys  Arg Val  Asn Ser  Ala  Ala  Phe  Pro  Ala  Pro  Ile  Glu  Lys
Thr
                340                      345                      350

Ile Ser  Lys Thr  Lys Gly  Arg  Pro  Lys  Ala  Pro  Gln  Val  Tyr  Thr
Ile
                355                      360                      365

Pro Pro  Pro Lys  Glu Gln  Met  Ala  Lys  Asp  Lys  Val  Ser  Leu  Thr
Cys
                370                      375                      380

Met Ile  Thr Asp  Phe Phe  Pro  Glu  Asp  Ile  Thr  Val  Glu  Trp  Gln
Trp
385                      390                      395
400

Asn Gly  Gln Pro  Ala Glu  Asn  Tyr  Lys  Asn  Thr  Gln  Pro  Ile  Met
Asp
                405                      410                      415

Thr Asp  Gly Ser  Tyr Phe  Val  Tyr  Ser  Lys  Leu  Asn  Val  Gln  Lys

```

Ser

420

425

430

Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
Glu Gly

435

440

445

Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
Gly Lys

450

455

460

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> chuột nhắt nhà

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kappa của phân tử glolubin miễn dịch của kháng
thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 kháng người

<400> 2

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp
Ile Pro

1

5

10

15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile
Pro

20

25

30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys
Ser

35

40

45

Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln
Arg

50

55

60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu
Ala

65

70

75

80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala
Phe

85

90

95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
Tyr Tyr

	100		105		110
Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr					
Lys	115		120		125
Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe					
Pro	130		135		140
Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys					
Phe					
145		150		155	
160					
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile					
Asp					
	165		170		175
Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln					
Asp					
	180		185		190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr					
Lys					
	195		200		205
Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His					
Lys					
	210		215		220
Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys					
225		230		235	
<210> 3					
<211> 121					
<212> PRT					
<213> chuột nhắt nhà					
<220>					
<223> phân đoạn của chuỗi nặng gamma 1 của phân tử globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 không phải người (phần còn lại 20-140)					
<400> 3					
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly					

Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
Tyr

20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp
Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> chuột nhắt nhà

<220>

<223> phân đoạn của chuỗi nhẹ kappa của phân tử globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 kháng người (phần còn lại 21-130)

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr
Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn

Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
 Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
 Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg
 Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp
 115

<210> 5
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> phân đoạn của chuỗi nhẹ kappa của phân tử globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng 4G7 đặc hiệu CD19 kháng người (phần còn lại 21-130)

<400> 5
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr
 Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu
 Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg
Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
His

85

90

95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
Lys

100

105

110

Arg Ser Asp Pro

115

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: oligopeptit tổng hợp

<220>

<223> Linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 7

<211> 252

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<220>

<223> scFV 4G7 version 1

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro
Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
 Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp
 Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala
 Ala
 130 135 140
 Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys
 Arg
 145 150 155
 160
 Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 Trp
 165 170 175
 Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg
 Met
 180 185 190

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
Gly Ser

195

200

205

Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
Asp Val

210

215

220

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr
Phe Gly

225

230

235

240

Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro

245

250

<210> 8

<211> 251

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<220>

<223> scFV 4G7 version 2

<400> 8

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro
Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Ser Tyr

20

25

30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu
Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu
Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr
Ala Tyr

65		70		75		80								
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr
Cys														
			85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp
Gly														
			100					105					110	
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly														
			115					120					125	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala
Ala														
			130					135					140	
Pro	Ser	Ile	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys
Arg														
145						150							155	
160														
Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
Trp														
			165						170				175	
Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg
Met														
			180						185				190	
Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
Ser														
			195						200				205	
Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp
Val														
			210						215				220	
Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His	Leu	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe
Gly														
225						230					235			
240														
Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ala	Asp				
			245								250			

<210> 9

<211> 250

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<220>

<223> scFV FMC63

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
Ile

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Gly Gly
Gly

100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
Gly

115 120 125

Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
Ser

130 135 140
 Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro
 Asp
 145 150 155
 160
 Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu
 Trp
 165 170 175
 Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala
 Leu
 180 185 190
 Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
 Phe
 195 200 205
 Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 Cys
 210 215 220
 Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly
 225 230 235
 240
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp
 245 250
 <210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> người tinh khôn
 <220>
 <223> phân đoạn của chuỗi CD3 zeta của glycoprotein bề mặt tế
 bào T
 <400> 10
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 Glu Tyr

	20		25		30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly					
Lys					
	35		40		45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln					
Lys					
	50		55		60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu					
Arg					
	65		70		75
					80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr					
Ala					
		85		90	
					95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro					
Arg					
	100		105		110

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> người tinh khôn

<220>

<223> Phân đoạn của 4-1BB (phần còn lại 214-255)

<400> 11

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
Phe Met

1		5		10		15
---	--	---	--	----	--	----

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
Arg Phe

	20		25		30
--	----	--	----	--	----

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

	35		40
--	----	--	----

<210> 12

<211> 41
 <212> PRT
 <213> người tinh khôn
 <220>
 <223> Phân đoạn của CD28 của glycoprotein bề mặt tế bào đích T
 <400> 12
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn
 Met Thr
 1 5 10 15

 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
 Ala Pro
 20 25 30

 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

 <210> 13
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> người tinh khôn
 <220>
 <223> Phân đoạn của tiền chất của chất đồng phân 1 của chuỗi alpha CD3 của glycoprotein bề mặt tế bào T (phần còn lại 138-206)
 <400> 13
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 Ile Ala
 1 5 10 15

 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
 Ala Gly
 20 25 30

 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
 Tyr Ile
 35 40 45

 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
 Leu Val
 50 55 60

 Ile Thr Leu Tyr Cys

65

<210> 14

<211> 495

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<220>

<223> 4G7-CAR version 1

<400> 14

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu
Leu

20 25 30

Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly
Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr
Lys

65 70 75 80

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys
Ser

85 90 95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
Ser

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg
Val

115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly

Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 Val
 145 150 155
 160
 Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser
 Val
 165 170 175
 Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly
 Asn
 180 185 190
 Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln
 Leu
 195 200 205
 Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg
 Phe
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg
 Val
 225 230 235
 240
 Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu
 Tyr
 245 250 255
 Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 Asp
 260 265 270
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
 Ala
 275 280 285
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
 Gly
 290 295 300
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr

Ile
 305 310 315
 320
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 Val
 325 330 335
 Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
 Phe
 340 345 350
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
 Gly
 355 360 365
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 Arg
 370 375 380
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 Gln
 385 390 395
 400
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 Asp
 405 410 415
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 Pro
 420 425 430
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 Asp
 435 440 445
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 Arg
 450 455 460
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 Thr
 465 470 475
 480

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495

<210> 15

<211> 495

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<220>

<223> 4G7-CAR version 2

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val
 Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 Ile

20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
 Thr

35 40 45

Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln
 Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys
 Tyr

65 70 75 80

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser
 Ser

85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
 Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val
 Phe

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
Gly

140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val
Met

155

160

Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val
Ser

175

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn
Thr

190

Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu
Leu

205

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
Ser

220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val
Glu

235

240

Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr
Pro

255

Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp
Pro

270

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
Ala

285

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
Gly

300

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr
 Ile
 305 310 315
 320

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 Val
 325 330 335

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
 Phe
 340 345 350

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
 Gly
 355 360 365

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 Arg
 370 375 380

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 Gln
 385 390 395
 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 Asp
 405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 Pro
 420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 Asp
 435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 Arg
 450 455 460

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 Thr
 465 470 475
 480

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485

490

495

<210> 16

<211> 494

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<220>

<223> FMC63-CAR

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val
Pro

1

5

10

15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
Ser

20

25

30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
Asp

35

40

45

Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
Val

50

55

60

Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
Ser

65

70

75

80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
Ser

85

90

95

Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
Asn

100

105

110

Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
Lys

115

120

125

Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
Ser

130

135

140

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
Leu

145

150

155

160

Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly
Val

165

170

175

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg
Lys

180

185

190

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr
Tyr

195

200

205

Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
Lys

210

215

220

Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
Ala

225

230

235

240

Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
Met

245

250

255

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro
Thr

260

265

270

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
Ser

275

280

285

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
Gly

290

295

300

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 Trp
 305 310 315
 320

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 Ile
 325 330 335

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 Lys
 340 345 350

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 Cys
 355 360 365

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 Val
 370 375 380

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 Asn
 385 390 395
 400

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 Val
 405 410 415

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 Arg
 420 425 430

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 Lys
 435 440 445

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 Arg
 450 455 460

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 Lys
 465 470 475
 480

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 17

<211> 1488

<212> DNA

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<220>

<223> 4G7-CAR version 2

<400> 17

```

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg
cagcaccggc      60
gaggtgcagc tgcagcagag cggacccgag ctgatcaagc caggcgccag
cgtgaagatg     120
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctacgtga tgcactgggt
gaagcagaag     180
ccaggccagg gcctggagtg gatcggctac atcaaccctt acaacgacgg
caccaagtac     240
aacgagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accagcgaca agagcagcag
caccgcctac     300
atggagctga gcagcctgac cagcagaggac agcgccgtgt actactgcgc
cagaggcacc     360
tactactacg gcagccgggt gttcgactac tggggccagg gcaccaccct
gaccgtgagc     420
tctggcggag gcggctctgg cggaggcggc tctggcggag gcggcagcga
catcgtgatg     480
accagggctg cccccagcat ccccgtagacc ccaggcgaga gcgtgagcat
cagctgccgg     540
agcagcaaga gcctgctgaa cagcaacggc aacacctacc tgtactgggt
cctgcagcgg     600
ccaggccaga gccccagct gctgatctac cggatgagca acctggccag
cggcgtgccc     660
gaccggttca gcggcagcgg cagcggcacc gccttcaccc tgcggatcag
ccgggtggag     720
gccgaggacg tgggcgtgta ctactgcatg cagcacctgg agtaccctt
caccttcgga     780
gccggcacca agctggagct gaagcgggtc gatcccacca ccacccagc
cccacggcca     840
cctacccttg cccaaccat cgccagccag cccctgagcc tgcggcctga
agcctgcagg     900
cctgccgccg gaggagccgt gcacacaagg ggccctggact tcgcctgcga
catctatata     960
tgggccccc tggccgggac atgcggggtg ctgctgctgt
ccctgggtgat tacactgtat 1020
tgcaaacggg gccggaagaa gctgctgtac atcttcaagc
agcccttcat gcggcccgtg 1080
cagaccaccc aggaggagga cggctgcagc tgccggttcc ccgaggaaga

```

ggaaggcggc 1140
 tgcgagctgc ggggtgaagtt cagccggagc gccgacgccc
 cagcctacca gcagggccag 1200
 aaccagctgt acaacgagct gaacctggga cggcgggagg
 agtacgacgt gctggacaag 1260
 cggcggggac gggaccccga gatgggaggc aagcctcgcc
 ggaagaatcc ccaggagggc 1320
 ctgtacaacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct
 acagcgagat cggcatgaag 1380
 ggcgagcggc gccggggcaa gggccacgac ggcctgtacc
 agggcctgag caccgccacc 1440
 aaggacacct acgacgccct gcacatgcag gccctgccac
 cccggtga 1488

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: oligopeptit tổng hợp

<220>

<223> peptit tín hiệu

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp
Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: oligopeptit tổng hợp

<220>

<223> peptit tín hiệu

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu
Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 20

<211> 49

<212> DNA

<213> Người tinh khôn

<400> 1

ttgtcccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga
49

<210> 21

<211> 530

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<220>

<223> Lắp lại TRAC_T01-L

<400> 21

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln
Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn
Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu
Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser
Asn

65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro
Val

85 90 95

```

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile
Ala
          100                105                110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu
Leu
          115                120                125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val
Ala
          130                135                140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
Arg
145                150                155
160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln
Val
          165                170                175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr
Val
          180                185                190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro
Glu
          195                200                205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu
Glu
          210                215                220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu
Thr
225                230                235
240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln
Ala
          245                250                255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His
Gly
          260                265                270

```

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly
 Lys
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln
 Ala
 290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn
 Gly
 305 310 315
 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu
 Cys
 325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser
 Asn
 340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro
 Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile
 Ala
 370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu
 Leu
 385 390 395
 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val
 Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
 Ala
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln
 Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 Thr Val
 450 455 460
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro
 Glu
 465 470 475
 480
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu
 Glu
 485 490 495
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu
 Thr
 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro
 Ala
 515 520 525
 Leu Glu
 530
 <210> 22
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
 <220>
 <223> Lắp lại TRAC_T01-R
 <400> 22
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly
 Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln
 Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly
 Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu
 Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser
 His
 65 70 75 80
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro
 Val
 85 90 95
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile
 Ala
 100 105 110
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu
 Leu
 115 120 125
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val
 Ala
 130 135 140
 Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
 Arg
 145 150 155
 160
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln
 Val
 165 170 175
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr
 Val
 180 185 190
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro
 Gln
 195 200 205
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu
 Glu
 210 215 220

```

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu
Thr
225          230          235
240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln
Ala
          245          250          255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His
Gly
          260          265          270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly
Lys
          275          280          285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln
Ala
          290          295          300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly
Gly
305          310          315
320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu
Cys
          325          330          335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser
Asn
          340          345          350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro
Val
          355          360          365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile
Ala
          370          375          380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu
Leu
385          390          395
400

```

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val
 Ala 405 410 415
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
 Ala 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln
 Val 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr
 Val 450 455 460
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro
 Gln 465 470 475
 480
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu
 Glu 485 490 495
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu
 Thr 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro
 Ala 515 520 525
 Leu Glu
 530

<210> 23

<211> 2814

<212> DNA

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<220>

<223> TRAC_T01-R TALEN

<400> 23

```

atgggacgac ctaaaaagaa acgtaaggct atcgattacc catacgaagt
tccagattac      60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca
ggagaagatc     120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgagc caccacgagg cactgggtcg
ccacgggttt     180
acacacgcgc acatcggttc gttaagccaa caccggcgag cgtaggggac
cgtcgctgtc     240
aagtatcagg acatgatcgc agcggttgcca gaggcgacac acgaagcgat
cgtagggctc     300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc
gggagagttg     360
agagggtccac cgtagcagtt ggacacaggc caactttctca agattgcaaa
acgtggcggc     420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc
cccgctcaac     480
ttgaccccc agcagggtggg ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca
ggcgctggag     540
acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc
ccagcagggtg     600
gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca
gcggctgttg     660
ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat
cgccagcaat     720
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggct caggcgctgt tgccgggtgct
gtgccaggcc     780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg
caagcaggcg     840
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt
gaccccgag      900
cagggtggtg ccacgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac
ggtccagcg      960
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg
agcagggtgg ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcgcaagca ggcgctggag acgggtccagc
ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080
caggcccacg gcttgacccc ggagcagggt gtggccatcg
ccagcaatat tgggtggcaag 1140
caggcgctgg agacgggtga ggcgctgttg ccgggtgctgt
gccaggccca cggcttgacc 1200
ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac gatggcggca
agcaggcgct ggagacggct 1260
cagcggtgtg tgccgggtgt gtgccaggcc cacggcttga
ccccggagca ggtggtggcc 1320
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg
tgcaggcgct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag cagggtggtg
ccacgccag caataatggt 1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg
tgctgtgcca ggcccacggc 1500
ttgaccccg agcagggtgg ggccatcgcc agcaatattg
gtggcaagca ggcgctggag 1560
acgggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc

```

```

ccagcaggtg    1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgctgg
agacggtcca gcggtgtgtg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg
tggtggccat cgccagcaat 1740
attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt
tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca
atggcggtgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg
cccacggctt gaccccggag 1920
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg
cgctggagac ggtccagcgg 1980
ctgttgccgg tgctgtgccg ggcccacggc ttgaccctc
agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg
cccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctcgtcgct
tggcctgcct cggcgggcgt 2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta
tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca
agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc
aggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg
gcaagcacct gggcggtcc 2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca
tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg
gccaggccga cgaaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca
acccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttcctgttcg
tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca
actgcaacgg cgccgtgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg
ccggcaccct gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg
ataa 2814

```

<210> 24

<211> 2832

<212> DNA

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 24

```

atgggcatc ctaaaaagaa acgtaaggct atcgataagg agaccgccg
tgccaagttc    60
gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg
ctacagccag    120

```

cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgagca
 ccacgaggca 180
 ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca
 cccggcagcg 240
 ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga
 ggcgacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga
 ggccttgctc 360
 acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca
 acttctcaag 420
 attgcaaaac gtggcgggcg gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg
 caatgcactg 480
 acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag
 ccacgatggc 540
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca
 ggcccacggc 600
 ttgaccccc agcaggtggg ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca
 ggcgctggag 660
 acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc
 ggagcaggtg 720
 gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacgggtcca
 gcggtgttg 780
 ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tgggtggccat
 cgccagcaat 840
 attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct
 gtgccaggcc 900
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg
 caagcaggcg 960
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg
 cccacggctt gaccccgag 1020
 caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg
 cgctggagac ggtccagcgg 1080
 ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc
 agcaggtggg ggccatcgcc 1140
 agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc
 ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200
 caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg
 ccagcaataa tgggtggcaag 1260
 caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg ccggtgctgt
 gccaggccca cggttgacc 1320
 cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat aatggtggca
 agcaggcgct ggagacggtc 1380
 cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga
 cccccagca ggtggtggcc 1440
 atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg
 tccagcggct gttgccggtg 1500
 ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg
 ccatcgccag caatattggg 1560
 ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctggtgccgg
 tgctgtgcca ggcccacggc 1620
 ttgaccccc agcaggtggg ggccatcgcc agccacgatg
 gcggcaagca ggcgctggag 1680
 acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg
 gcttgacccc ggagcaggtg 1740
 gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg
 agacgggtga ggcgctgttg 1800
 ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tgggtggccat

```

cgccagccac    1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt
tgccggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca
ataatggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggct gttgccgggtg ctgtgccagg
cccacggctt gaccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg
cgctggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca
acgaccacct cgtcgccttg 2160
gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgctggat gcagtgaaaa
agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga
aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga
tcgcccggaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga
aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggtccag gaagcccgac ggcgccatct
acaccgtggg ctcccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg
gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga
ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg
agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca
ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg
gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat
caacttcgcg    2820
gccgactgat aa
2832

```