(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) **1-0030605**

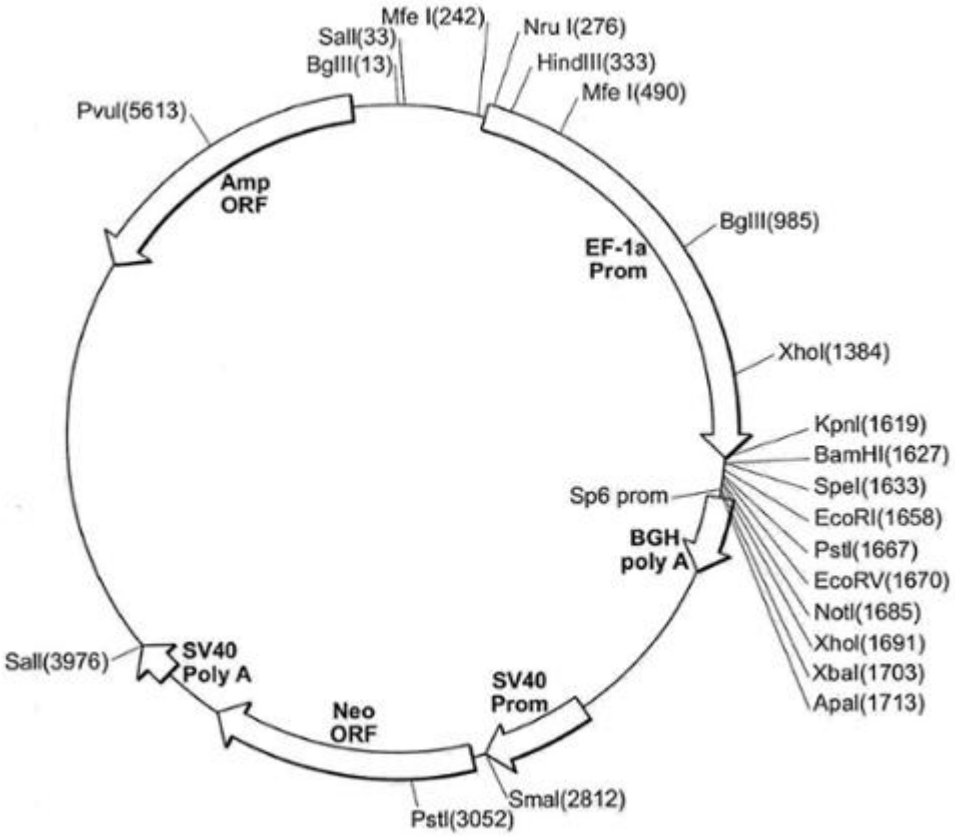
(51)[7] **C12N 15/10**

(13) **B**

(21) 1-2014-03971
(22) 27/04/2013
(86) PCT/US2013/038542 27/04/2013
(87) WO/2013/163633 31/10/2013
(30) 61/639,376 27/04/2012 US
(45) 25/12/2021 405
(43) 27/07/2015 328A
(73) MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (US)
40 Landsdowne Street, Cambridge, MA 02139, United States of America
(72) FRANK, Helen, Alison (US); MCDONALD, Alice, A. (US); O'KEEFE, Theresa, L. (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ KHÁNG THỂ KHÁNG GCC, VECTƠ VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PHÂN TỬ KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể và đoạn liên kết kháng nguyên chứa kháng thể mà liên kết GCC. Các phân tử của kháng thể kháng GCC là hữu dụng để làm phân tử của kháng thể trần và làm các thành phần của thể tiếp hợp miễn dịch. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC và tác nhân điều trị bệnh hoặc tác nhân đánh dấu. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sử dụng phân tử của kháng thể kháng GCC và thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế, ví dụ, để phát hiện GCC và các tế bào hoặc mô mà biểu hiện GCC. Các phương pháp này là hữu dụng, trong số đó, để chẩn đoán, tiên lượng bệnh, hiện hình, hoặc xác định giai đoạn bệnh do GCC gây ra.


Mfe I(242)
Nru I(276)
SalI(33)
BglII(13)
HindIII(333)
Mfe I(490)
PvuI(5613)
Amp
ORF
BglII(985)
EF-1a
Prom
XhoI(1384)
KpnI(1619)
BamHI(1627)
SpeI(1633)
Sp6 prom
EcoRI(1658)
BGH
poly A
PstI(1667)
EcoRV(1670)
NotI(1685)
XhoI(1691)
SalI(3976)
SV40
Poly A
XbaI(1703)
SV40
Prom
ApaI(1713)
Neo
ORF
SmaI(2812)
PstI(3052)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử của kháng thể liên kết GCC, và các phương pháp sử dụng chúng để chọn lọc bệnh nhân nhằm điều trị bệnh bằng phép điều trị hướng đích GCC, như thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC, hoặc đoạn của chúng, đã được tiếp hợp với tác nhân như tác nhân điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Guanylyl xyclaza C ("GCC") là thụ thể bề mặt của tế bào xuyên màng có vai trò trong việc duy trì dịch ruột non, tính nội cân bằng điện giải và sự tăng sinh tế bào, ví dụ, xem: Carrithers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3018-3020 (2003). GCC được biểu hiện tại các tế bào màng nhầy lót trong ruột non, ruột già và trực tràng (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). Sự biểu hiện GCC được duy trì cùng với sự biến nạp tạo khối u của các tế bào biểu mô ruột non, kèm theo sự biểu hiện trong tất cả các khối u của trực tràng ruột kết nguyên phát và di căn (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế, ít nhất một phần, dựa trên sự phát hiện ra các kháng thể kháng GCC mới. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử của kháng thể kháng GCC, như được bộc lộ theo sáng chế. Các phân tử của kháng thể kháng GCC là hữu dụng để làm phân tử của kháng thể trần và làm thành phần của thể tiếp hợp miễn dịch. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC nêu ở đây và tác nhân điều trị bệnh hoặc tác nhân đánh dấu. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sử dụng các phân tử của kháng thể kháng GCC và thể tiếp hợp miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, để phát hiện GCC và các tế bào hoặc mô mà biểu hiện GCC. Các phương pháp này là hữu dụng, trong số nhiều thứ khác, để chẩn đoán, tiên lượng bệnh, hiện ảnh, hoặc xác định giai đoạn bệnh do GCC gây ra. Do đó, theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp xác định đối tượng để điều trị bệnh bằng phép điều trị hướng đích GCC, ví dụ, phép điều trị bằng kháng thể kháng GCC, ví dụ, thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể kháng GCC đã được tiếp hợp với tác nhân điều trị bệnh. Sáng

chế còn đề xuất phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo* để xác định đối tượng bị bệnh ung thư sẽ là ứng viên tiềm năng cho phép điều trị hướng đích GCC, ví dụ, phép điều trị hướng đích GCC được bộc lộ theo sáng chế.

Các kháng thể kháng GCC, ví dụ, các kháng thể kháng GCC theo sáng chế, cũng là hữu dụng, ví dụ, để điều biến hoạt tính hoặc chức năng của protein GCC; và để điều trị bệnh do GCC gây ra, như được bộc lộ theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, phép điều trị này bao gồm việc tìm hiểu kiến thức về bệnh và/hoặc đánh giá mẫu hoặc đối tượng để xác định mức độ biểu hiện GCC, và nếu đối tượng biểu hiện GCC, thì sử dụng phép điều trị hướng đích GCC, ví dụ, phép điều trị hướng đích GCC được bộc lộ theo sáng chế. Theo các khía cạnh khác, phương pháp này bao gồm việc tạo ra một báo cáo điều trị cá nhân, ví dụ, báo cáo về phép điều trị hướng đích GCC, bằng cách lấy mẫu từ đối tượng và xác định mức độ biểu hiện GCC, ví dụ, bằng phương pháp phát hiện được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế, và dựa trên việc phát hiện này, chọn lọc báo cáo điều trị hướng đích cho đối tượng đó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất các axit nucleic phân lập được và/hoặc tái tổ hợp mà mã hóa trình tự axit amin phân tử của kháng thể kháng GCC, cũng như các vectơ và các tế bào của vật chủ chứa axit nucleic này, và các phương pháp sản xuất phân tử của kháng thể kháng GCC. Sáng chế còn đề xuất hỗn hợp phản ứng và kit chứa kháng thể kháng GCC, ví dụ, thể tiếp hợp, được bộc lộ theo sáng chế, cũng như thử nghiệm *in vitro*, ví dụ, chứa kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế, để phát hiện sự biểu hiện GCC.

Tất cả các ấn phẩm, đơn yêu cầu cấp patent, patent và các tài liệu khác được trích dẫn ở đây được đưa vào đây theo cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng.

Các dấu hiệu, mục đích và ưu điểm khác của sáng chế được bộc lộ theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng nhờ dựa vào phần mô tả và các hình vẽ, và các điểm yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là bản đồ dạng tròn của vectơ biểu hiện protein dùng để tạo ra protein dung hợp Fc của chuột (mFc), miền ngoại bào (ECD) GCC của người (hGCC) (hGCC-ECD-mFc) theo sáng chế.

Các hình 2A đến 2D thể hiện biểu đồ cột tóm tắt sự phân bố điểm số H (đỉnh và bào chất) kết hợp/tụ hợp của sự biểu hiện GCC trong các kiểu khối u lấy được từ các bệnh

nhân ung thư được thử nghiệm để tham gia vào Nghiên cứu C26001, một thử nghiệm lâm sàng Pha I của thể tiếp hợp miễn dịch hướng đích GCC. Hình 2A thể hiện sự phân bố điểm số H tụ hợp kết hợp trong các bệnh nhân ung thư trực tràng được sàng lọc; Hình 2B thể hiện sự phân bố điểm số H tụ hợp kết hợp trong số các bệnh nhân ung thư dạ dày được sàng lọc; Hình 2C thể hiện sự phân bố điểm số H tụ hợp kết hợp trong số các bệnh nhân ung thư tụy được sàng lọc; Hình 2D thể hiện sự phân bố điểm số H tụ hợp kết hợp trong số thực quản các bệnh nhân ung thư được sàng lọc.

Các hình 3A đến 3C thể hiện biểu đồ cột tóm tắt sự phân bố điểm số H (đỉnh và bào chất) kết hợp/tụ hợp về mức độ biểu hiện GCC trong nhiều vi mảng đặc hiệu khối u mà được sàng lọc. Hình 3A mô tả sự phân bố điểm số H kết hợp/tụ hợp trong số các mẫu trên các vi mảng khối u trực tràng ruột kết được thử nghiệm về mức độ biểu hiện GCC; Hình 3B thể hiện sự phân bố điểm số H kết hợp/tụ hợp trong các mẫu trên vi mảng khối u dạ dày được sàng lọc đối với sự biểu hiện GCC; Hình 3C thể hiện sự phân bố điểm số H kết hợp/tụ hợp trong các mẫu trên các vi mảng khối u tụy được sàng lọc đối với sự biểu hiện GCC.

Mô tả chi tiết sáng chế

Guanylyl xyclaza C (GCC) (còn được gọi là STAR, thụ thể ST, GUC2C, và GUCY2C) là thụ thể bề mặt của tế bào xuyên màng có chức năng trong việc duy trì dịch ruột non, chất điện giải tính nội cân bằng và sự tăng sinh tế bào (Carrithers et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3018-3020 (2003); Mann et al., *Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-466 (1997); Pitari et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2695-2699 (2003)); số truy cập GenBank là NM_004963, từng tài liệu trong số này được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn). Chức năng này được tạo ra nhờ liên kết của guanylin (Wiegand et al. *FEBS Lett.* 311:150 đến 154 (1992)). GCC cũng là thụ thể đối với độc tố ruột ổn định nhiệt (ST, ví dụ, có trình tự axit amin là NTFYCCELCCNPACAGCY, SEQ ID NO: 1) mà là peptit được tạo ra bởi *E. coli*, cũng như sinh vật gây nhiễm khác (Rao, M. C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93 (1985); Knoop F. C. and Owens, M. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 28:67-72 (1992)). Liên kết của ST với GCC sẽ hoạt hóa một loạt với tín hiệu mà gây ra các bệnh ở ruột, ví dụ, bệnh tiêu chảy.

Trình tự nucleotit đối với GCC của người (số truy cập GenBank là NM_004963; SEQ ID NO: 2):

```
   1 gaccagagag aagcgtgggg aagagtgggc tgagggactc cactagaggc tgtccatctg
  61 gattccctgc ctccctagga gcccaacaga gcaaagcaag tgggcacaag gagtatggtt
 121 ctaacgtgat tggggtcatg aagacgttgc tgttggactt ggctttgtgg tcactgctct
 181 tccagcccgg gtggctgtcc tttagttccc aggtgagtca gaactgccac aatggcagct
 241 atgaaatcag cgtcctgatg atgggcaact cagcctttgc agagcccctg aaaaacttgg
 301 aagatgcggt gaatgagggg ctggaaatag tgagaggacg tctgcaaaat gctggcctaa
 361 atgtgactgt gaacgctact ttcatgtatt cggatggtct gattcataac tcaggcgact
 421 gccggagtag cacctgtgaa ggcctcgacc tactcaggaa aatttcaaat gcacaacgga
 481 tgggctgtgt cctcataggg ccctcatgta catactccac cttccagatg taccttgaca
 541 cagaattgag ctaccccatg atctcagctg gaagttttgg attgtcatgt gactataaag
 601 aaaccttaac caggctgatg tctccagcta gaaagttgat gtacttcttg gttaactttt
 661 ggaaaaccaa cgatctgccc ttcaaaactt attcctggag cacttcgtat gtttacaaga
 721 atggtacaga aactgaggac tgtttctggt accttaatgc tctggaggct agcgtttcct
 781 atttctccca cgaactcggc tttaaggtgg tgttaagaca agataaggag tttcaggata
 841 tcttaatgga ccacaacagg aaaagcaatg tgattattat gtgtggtggt ccagagttcc
 901 tctacaagct gaagggtgac cgagcagtgg ctgaagacat tgtcattatt ctagtggatc
 961 ttttcaatga ccagtacttt gaggacaatg tcacagcccc tgactatatg aaaaatgtcc
1021 ttgttctgac gctgtctcct gggaattccc ttctaaatag ctctttctcc aggaatctat
1081 caccaacaaa acgagacttt gctcttgcct atttgaatgg aatcctgctc tttggacata
1141 tgctgaagat atttcttgaa aatggagaaa atattaccac ccccaaattt gctcatgctt
1201 tcaggaatct cacttttgaa gggtatgacg gtccagtgac cttggatgac tgggggggatg
1261 ttgacagtac catggtgctt ctgtatacct ctgtggacac caagaaatac aaggttcttt
1321 tgacctatga tacccacgta aataagacct atcctgtgga tatgagcccc acattcactt
1381 ggaagaactc taaacttcct aatgatatta caggccgggg ccctcagatc ctgatgattg
1441 cagtcttcac cctcactgga gctgtggtgc tgctcctgct cgtcgctctc ctgatgctca
1501 gaaaatatag aaaagattat gaacttcgtc agaaaaaatg gtcccacatt cctcctgaaa
1561 atatctttcc tctggagacc aatgagacca atcatgttag cctcaagatc gatgatgaca
1621 aaagacgaga tacaatccag agactacgac agtgcaaata cgacaaaaag cgagtgattc
```

1681 tcaaagatct caagcacaat gatggtaatt tcactgaaaa acagaagata gaattgaaca

1741 agttgcttca gattgactat tacaacctga ccaagttcta cggcacagtg aaacttgata

1801 ccatgatctt cggggtgata gaatactgtg agagaggatc cctccgggaa gttttaaatg

1861 acacaatttc ctaccctgat ggcacattca tggattggga gtttaagatc tctgtcttgt

1921 atgacattgc taagggaatg tcatatctgc actccagtaa gacagaagtc catggtcgtc

1981 tgaaatctac caactgcgta gtggacagta gaatggtggt gaagatcact gattttggct

2041 gcaattccat tttacctcca aaaaaggacc tgtggacagc tccagagcac ctccgccaag

2101 ccaacatctc tcagaaagga gatgtgtaca gctatgggat catcgcacag gagatcatcc

2161 tgcggaaaga aaccttctac actttgagct gtcgggaccg gaatgagaag attttcagag

2221 tggaaaattc caatggaatg aaacccttcc gcccagattt attcttggaa acagcagagg

2281 aaaaagagct agaagtgtac ctacttgtaa aaaactgttg ggaggaagat ccagaaaaga

2341 gaccagattt caaaaaaatt gagactacac ttgccaagat atttggactt tttcatgacc

2401 aaaaaaatga aagctatatg gataccttga tccgacgtct acagctatat tctcgaaacc

2461 tggaacatct ggtagaggaa aggacacagc tgtacaaggc agagagggac agggctgaca

2521 gacttaactt tatgttgctt ccaaggctag tggtaaagtc tctgaaggag aaaggctttg

2581 tggagccgga actatatgag gaagttacaa tctacttcag tgacattgta ggtttcacta

2641 ctatctgcaa atacagcacc cccatggaag tggtggacat gcttaatgac atctataaga

2701 gttttgacca cattgttgat catcatgatg tctacaaggt ggaaaccatc ggtgatgcgt

2761 acatggtggc tagtggtttg cctaagagaa atggcaatcg gcatgcaata gacattgcca

2821 agatggcctt ggaaatcctc agcttcatgg ggacctttga gctggagcat cttcctggcc

2881 tcccaatatg gattcgcatt ggagttcact ctggtccctg tgctgctgga gttgtgggaa

2941 tcaagatgcc tcgttattgt ctatttggag atacggtcaa cacagcctct aggatggaat

3001 ccactggcct ccctttgaga attcacgtga gtggctccac catagccatc ctgaagagaa

3061 ctgagtgcca gttccttttat gaagtgagag gagaaacata cttaaaggga agaggaaatg

3121 agactaccta ctggctgact gggatgaagg accagaaatt caacctgcca acccctccta

3181 ctgtggagaa tcaacagcgt ttgcaagcag aattttcaga catgattgcc aactctttac

3241 agaaaagaca ggcagcaggg ataagaagcc aaaaacccag acgggtagcc agctataaaa

3301 aaggcactct ggaatacttg cagctgaata ccacagacaa ggagagcacc tatttttaaa

Trình tự axit amin với GCC của người (số truy cập GenPept là NP_004954; SEQ ID NO: 3):

```
   1 mktllldlal wsllfqpgwl sfssqvsqnc hngsyeisvl mmgnsafaep lknledavne
  61 gleivrgrlq naglnvtvna tfmysdglih nsgdcrsstc egldllrkis naqrmgcvli
 121 gpsctystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktndl
 181 pfktyswsts yvykngtete dcfwylnale asvsyfshel gfkvvlrqdk efqdilmdhn
 241 rksnviimcg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvlvltls
 301 pgnsllnssf srnlsptkrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafrnltf
 361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdms ptftwknskl
 421 pnditgrgpq ilmiavftlt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
 481 tnetnhvslk idddkrrdti qrlrqckydk krvilkdlkh ndgnftekqk ielnkllqid
 541 yynltkfygt vkldtmifgv ieycergslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
 601 msylhsskte vhgrlkstnc vvdsrmvvki tdfgcnsilp pkkdlwtape hlrqanisqk
 661 gdvysygiia qeiilrketf ytlscrdrne kifrvensng mkpfrpdlfl etaeekelev
 721 yllvkncwee dpekrpdfkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysrnlehlve
 781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvkslk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys
 841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lpkrngnrha idiakmalei
 901 lsfmgtfele hlpglpiwir igvhsgpcaa gvvgikmpry clfgdtvnta srmestglpl
 961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq
1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprrv asykkgtley lqlnttdkes tyf
```

Nói chung, protein GCC có một số miền thường được chấp nhận mà mỗi miền đóng góp một chức năng riêng biệt cho phân tử GCC. Các phần của GCC bao gồm trình tự tín hiệu (để hướng protein đến bề mặt tế bào) kéo dài từ gốc axit amin 1 đến gốc 23, hoặc từ gốc 1 đến gốc 21 của SEQ ID NO: 3 (dạng thành thục bị cắt để tạo ra protein thành thục về mặt chức năng từ các gốc axit amin 22 hoặc 24 đến 1073 của SEQ ID NO: 3), miền ngoại bào đối với phối tử, ví dụ, guanylin hoặc ST, liên kết từ gốc axit amin 24 đến gốc 420, hoặc từ gốc 54 đến gốc 384 của SEQ ID NO: 3, miền xuyên màng từ gốc axit amin 431 đến gốc 454, hoặc từ gốc 436 đến gốc 452 của SEQ ID NO: 3, miền tương đồng kinaza, được dự đoán là có hoạt tính tyrosin của kinaza từ gốc axit amin 489 đến gốc 749, hoặc từ gốc 508 đến gốc 745 của SEQ ID NO: 3 và miền xúc tác guanylyl xyclaza từ gốc 750 đến gốc 1007, hoặc từ gốc 816 đến gốc 1002 của SEQ ID NO: 3.

Ở mô bình thường của người, GCC được biểu hiện trên tế bào màng nhầy, ví dụ, trên màng diềm bàn chải đỉnh, lớp lót ruột non, ruột già và trực tràng (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). Sự biểu hiện GCC được duy trì cùng với sự biến nạp tạo khối u của các tế bào biểu mô ruột non, cùng với sự biểu hiện trong tất cả các khối u trực tràng ruột kết nguyên phát và di căn (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994)). Các tế bào tạo khối u từ dạ dày, thực quản và đoạn nối dạ dày thực quản cũng biểu hiện GCC (ví dụ, xem US 6,767,704; Debruyne et al. *Gastroenterology* 130:1191 đến 1206 (2006)). Sự biểu hiện đặc hiệu với mô và sự liên quan đến bệnh ung thư, ví dụ, ung thư có nguồn gốc dạ dày-ruột, (ví dụ, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản hoặc bệnh ung thư ruột non), có thể được khai thác để sử dụng GCC làm chất đánh dấu dùng để chẩn đoán đối với bệnh này (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005)). Ngoài ra, như được minh họa trong các ví dụ nêu ở đây, một vài kiểu khác nhau của bệnh ung thư có nguồn gốc không phải là dạ dày-ruột đã được thấy là biểu hiện GCC, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư phổi, sacôm mô mềm dạ dày-ruột (ví dụ, sacôm cơ trơn và sacôm cơ vân) hoặc các khối u thần kinh nội tiết phế quản-phổi, và khối u thần kinh ngoại bì.

Đối với protein bề mặt tế bào, GCC cũng có thể có tác dụng làm đích chẩn đoán hoặc điều trị đối với các protein liên kết thụ thể như các kháng thể hoặc các phối tử. Trong mô ruột non bình thường, GCC được biểu hiện trên mặt đỉnh của các đoạn nối khít ở tế bào biểu mô mà tạo ra màng ngăn không thấm giữa môi trường của khoang và khoang mạch (Almenoff et al., *Mol Microbiol* 8: 865-873); Guarino et al., *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026 (1987)). Như vậy, việc áp dụng điều trị protein liên kết GCC theo cách dùng qua đường tĩnh mạch sẽ có tác dụng tối thiểu đến các thụ thể GCC ruột non, trong khi lại tiếp cận được các tế bào tạo khối u của hệ dạ dày-ruột, bao gồm tế bào ung thư ruột kết xâm lấn hoặc di căn, các khối u ruột kết ngoài ruột hoặc di căn, khối u thực quản hoặc khối u dạ dày, bệnh caxinom tuyến tại đoạn nối dạ dày thực quản. Ngoài ra, GCC nội tương tác thông qua sự nhập nội bào do thụ thể gây ra khi liên kết phối tử (Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 20-36 (1995)).

Các kháng thể đa dòng kháng lại miền ngoại bào của GCC (Nandi et al. *Protein Expr. Purif.* 8:151-159 (1996)) có khả năng ức chế liên kết peptit ST với GCC của người và GCC của chuột và ức chế sản sinh cGMP vòng do ST tạo ra bởi GCC của người.

GCC đã được xác định là protein liên quan đến các bệnh ung thư, bao gồm bệnh ung thư ruột kết. Xem cả tài liệu: Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995). Phân tử của kháng thể hướng đích GCC có thể được sử dụng riêng lẻ như vậy ở dạng không tiếp hợp để ức chế tế bào ung thư biểu hiện GCC. Ngoài ra, phân tử của kháng thể hướng đến GCC có thể được dùng ở dạng trần hoặc dạng đánh dấu, để phát hiện bệnh tế bào ung thư biểu hiện GCC. Các phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể liên kết với GCC của người. Theo một số phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể ức chế liên kết của phối tử, ví dụ, guanylin hoặc độc tố ruột ổn định nhiệt với GCC. Theo các phương án khác, phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế không ức chế liên kết của phối tử, ví dụ, guanylin hoặc độc tố ruột ổn định nhiệt với GCC.

Các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với GCC bao gồm GCC:B10 (Nandi et al., *J. Cell. Biochem.* 66:500-511 (1997)), GCC:4D7 (Vijayachandra et al. *Biochemistry* 39:16075-16083 (2000)) và GCC:C8 (Bakre et al. *Eur. J. Biochem.* 267:179-187 (2000)). GCC:B10 có chuỗi nhẹ kapa và isotyp IgG2a và phản ứng chéo với GCC của chuột, lợn và khỉ. GCC:B10 liên kết với 63 axit amin đầu tiên của miền nội bào của GCC, đặc biệt là với gốc 470 đến 480 của SEQ ID NO: 3 (Nandi et al. *Protein Sci.* 7:2175-2183 (1998)). GCC:4D7 liên kết với miền tương đồng kinaza bên trong các gốc 491 đến 563 của GCC (Bhandari et al. *Biochemistry* 40:9195-9206 (2001)). GCC:C8 liên kết với miền giống protein kinaza trong phần bào chất của GCC.

Định nghĩa

Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, các thuật ngữ khoa học và các thuật ngữ kỹ thuật được sử dụng liên quan đến sáng chế có nghĩa mà thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nói chung, danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các kỹ thuật, nuôi cấy tế bào và mô, sinh học phân tử, và hóa học protein và oligo- hoặc polynucleotit và kỹ thuật lai được bộc lộ theo sáng chế là đã biết

trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các số truy cập GenBank hoặc GenPept và các axit nucleic và trình tự peptit hữu dụng có thể được thấy tại trang web được duy trì bởi National Center for Biotechnological Information, Bethesda Md. Các kỹ thuật chuẩn được áp dụng để tái tổ hợp ADN, tổng hợp oligonucleotit, và nuôi cấy mô và biến nạp và chuyển nhiễm (ví dụ, xung điện, chuyển nhiễm liposom). Các phản ứng enzym và các kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc như thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được bộc lộ theo sáng chế. Các kỹ thuật và các quy trình nêu trên thường được thực hiện theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, đã được bộc lộ trong nhiều tài liệu tổng quan và chuyên biệt hơn mà được trích dẫn và bàn luận trong bản mô tả này. Ví dụ, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)) hoặc nói chung, xem: Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y. Các danh pháp được sử dụng có liên quan, và các quy trình và các kỹ thuật phòng thí nghiệm, được bộc lộ theo sáng chế là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hơn thế nữa, trừ khi văn cảnh cần được hiểu theo cách khác, trong phiên bản tiếng Anh, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm số ít.

Thuật ngữ "phân tử của kháng thể" theo sáng chế chỉ kháng thể, peptit kháng thể hoặc globulin miễn dịch, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của thành phần bất kỳ trong số chúng, ví dụ, của kháng thể. Phân tử của kháng thể bao gồm phân tử mạch đơn của kháng thể, ví dụ, scFv, ví dụ, xem: Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; và Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883), và phân tử miền đơn của kháng thể, ví dụ, xem: WO9404678. Mặc dù không được bao gồm trong thuật ngữ "phân tử của kháng thể," sáng chế còn bao gồm "chất tương tự kháng thể", các khung trên cơ sở protein mà không phải là phân tử của kháng thể, ví dụ, các protein dung hợp và/hoặc các thể tiếp hợp miễn dịch mà sử dụng các CDR để tạo ra liên kết kháng nguyên đặc hiệu.

"Phân tử của kháng thể kháng GCC" chỉ phân tử của kháng thể (nghĩa là kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể hoặc chất tương tự kháng thể) mà tương tác với, hoặc nhận biết, ví dụ, liên kết (ví dụ, liên kết đặc hiệu) với GCC, ví dụ, GCC của người. Các phân tử của kháng thể kháng GCC làm ví dụ là các phân tử được tổng kết trong bảng 1 và bảng 2.

Các thuật ngữ "kháng thể", "peptit của kháng thể" hoặc "globulin miễn dịch" theo sáng chế chỉ các protein và glycoprotein gồm mạch đơn, mạch kép, và nhiều mạch. Thuật ngữ kháng thể bao gồm kháng thể đa dòng, đơn dòng, khảm, ghép CDR và kháng thể của người hoặc các kháng thể được làm giống như kháng thể của người, tất cả được mô tả một cách chi tiết theo sáng chế. Thuật ngữ này còn bao gồm các kháng thể của lạc đà, ví dụ, xem: US2005/0037421, và các đoạn kháng thể thiếu chuỗi nhẹ, ví dụ, IgNAR (các kháng thể của cá mập), ví dụ, xem: WO03/014161. Thuật ngữ "kháng thể" còn bao gồm các biến thể tổng hợp và được xử lý về mặt di truyền.

Thuật ngữ "đoạn kháng thể" hoặc "đoạn liên kết kháng nguyên" của kháng thể theo sáng chế chỉ, ví dụ, các đoạn Fab, Fab', $F(ab')_2$, và Fv, các kháng thể chuỗi đơn, các kháng thể chuỗi nặng chức năng (các đoạn của kháng thể thiếu chuỗi nhẹ), cũng như đoạn bất kỳ của kháng thể có tính đặc hiệu với ít nhất một epitop mong muốn, mà cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn về độ đặc hiệu liên kết (ví dụ, đoạn có đủ các trình tự CDR và có đủ các trình tự khung để liên kết một cách đặc hiệu với epitop). Ví dụ, đoạn liên kết kháng nguyên có thể cạnh tranh để liên kết với epitop mà vốn liên kết với kháng thể mà đoạn này được lấy ra từ đó. Được lấy, như được dùng trong ở đây và ngữ cảnh tương tự, không ám chỉ phương pháp hoặc quy trình cụ thể bất kỳ để lấy, mà có thể chỉ được dùng để chỉ mức độ tương tự về mặt trình tự. Các đoạn liên kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật tái tổ hợp, hoặc bằng cách phân cắt bằng enzym hoặc theo phương pháp hóa học từ một kháng thể nguyên vẹn. Thuật ngữ đoạn liên kết kháng nguyên, khi được dùng với chuỗi đơn, ví dụ, chuỗi nặng, của kháng thể có chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có nghĩa là đoạn của mạch này phải đủ sao cho khi ghép cặp với vùng thay đổi đầy đủ của mạch khác, ví dụ, chuỗi nhẹ, nó sẽ cho phép liên kết ít nhất bằng 25%, 50%, 75%, 85% hoặc 90% so với liên kết quan sát được đối với vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ.

Thuật ngữ "nhóm liên kết kháng nguyên của CDR" hoặc "số lượng CDR đủ để cho phép liên kết" (và theo cách tương tự) theo sáng chế chỉ CDR đủ của mạch, ví dụ, chuỗi nặng, sao cho khi được đặt trong khung hoạt động và ghép cặp với vùng thay đổi đầy đủ của mạch khác, hoặc với một phần vùng thay đổi mạch khác có chiều dài tương tự và có cùng số CDR, ví dụ, chuỗi nhẹ, sẽ cho phép liên kết, ví dụ, ít nhất 25%, 50%, 75%, 85%

hoặc 90% so với liên kết quan sát được đối với vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ.

Thuật ngữ "kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người" theo sáng chế chỉ kháng thể mà thu được từ kháng thể không phải của người, ví dụ, thỏ, động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột đồng), cừu hoặc dê, mà giữ được hoặc hầu như giữ được đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể gốc nhưng kém sinh miễn dịch ở người hơn. Các kháng thể được làm giống như kháng thể của người theo sáng chế dự định bao gồm cả kháng thể bị làm mất khả năng gây miễn dịch. Nói chung, các kháng thể được làm giống như kháng thể của người bao gồm các CDR không phải của người và khung hoạt động và các vùng ổn định của người hoặc lấy từ người.

Thuật ngữ kháng thể "được cải biến" theo sáng chế chỉ các kháng thể mà được sản xuất, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập được theo cách tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào của vật chủ, các kháng thể phân lập được từ thư viện kháng thể tái tổ hợp kết hợp, các kháng thể phân lập được từ động vật không phải là người (ví dụ, thỏ, chuột nhắt, chuột to, cừu hoặc dê) mà được chuyển gen đối với gen globulin miễn dịch của người hoặc các kháng thể được sản xuất, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập được theo cách bất kỳ khác bao gồm việc cắt ghép các trình tự gen globulin miễn dịch của người vào các trình tự ADN khác. Các kháng thể được cải biến như vậy bao gồm các kháng thể được làm giống như kháng thể của người, CDR ghép (ví dụ, kháng thể có CDR thu được từ kháng thể thứ nhất và vùng khung thu được từ nguồn khác, ví dụ, kháng thể thứ hai hoặc khung hoạt động liên ứng), các kháng thể khảm, các kháng thể được tạo ra *in vitro* (ví dụ, bằng cách biểu hiện thể thực khuẩn), và có thể tùy ý chứa các vùng thay đổi hoặc vùng ổn định thu được từ các trình tự của globulin miễn dịch của tế bào dòng mầm của người hoặc globulin miễn dịch của gen người hoặc các kháng thể mà được sản xuất, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập được theo cách bất kỳ bao gồm việc nối ghép các trình tự gen globulin miễn dịch của người vào trình tự globulin miễn dịch khác. Theo các phương án, phân tử của kháng thể được cải biến bao gồm phân tử của kháng thể có trình tự thay đổi so với kháng thể quy chiếu.

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu đơn" chỉ kháng thể hoặc chế phẩm chứa kháng thể biểu hiện tính đặc hiệu liên kết đơn và ái lực với một epitop cụ thể. Thuật ngữ này bao gồm "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng".

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép" hoặc "kháng thể" có hai nhóm chức chỉ kháng thể mà biểu hiện tính đặc hiệu liên kết đôi trong hai epitop, nếu mỗi vị trí liên kết khác nhau và nhận biết epitop khác nhau.

Các thuật ngữ "kháng thể không tiếp hợp" và "kháng thể trần" được sử dụng thay thế nhau để chỉ phân tử của kháng thể mà không tiếp hợp với gốc không phải là kháng thể, ví dụ, tác nhân hoặc tác nhân đánh dấu.

Thuật ngữ "thể tiếp hợp miễn dịch", "thể tiếp hợp kháng thể-dược chất" và "thể tiếp hợp kháng thể" được sử dụng thay thế nhau và chỉ kháng thể mà được tiếp hợp với gốc không phải là kháng thể, ví dụ, tác nhân hoặc tác nhân đánh dấu. Thuật ngữ "tác nhân" theo sáng chế biểu thị hợp chất hóa học, hỗn hợp gồm các hợp chất hóa học, đại phân tử sinh học, hoặc dịch chiết từ các nguyên liệu sinh học. Thuật ngữ "tác nhân điều trị bệnh" chỉ tác nhân mà có hoạt tính sinh học. Các tác nhân điều trị bệnh làm ví dụ là các tác nhân hóa trị liệu.

Thuật ngữ "tác nhân trị bệnh ung thư" hoặc "tác nhân hóa trị liệu" theo sáng chế chỉ các tác nhân mà có đặc tính chức năng ức chế sự phát triển hoặc tiến triển của khối u tân sinh ở người, đặc biệt là tổn thương ác tính (ung thư), như caxinom, sacôm, u bạch huyết, hoặc bệnh bạch cầu. Việc ức chế di căn hoặc sự tạo mạch là đặc tính thường xuyên của các tác nhân trị bệnh ung thư hoặc các tác nhân hóa trị liệu. Tác nhân hóa trị liệu có thể là tác nhân độc đối với tế bào hoặc tác nhân kìm hãm tế bào. Thuật ngữ "tác nhân kìm hãm tế bào" chỉ tác nhân mà ức chế hoặc ngăn chặn sự sinh trưởng của tế bào và/hoặc sự nhân lên của tế bào.

Thuật ngữ "tác nhân gây độc tế bào" được dùng để chỉ hợp chất gây ra quá trình chết tế bào nguyên phát bằng cách can thiệp một cách trực tiếp với chức năng của tế bào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tác nhân alkyl hóa, các chất ức chế yếu tố hoại tử u, hợp chất cài xen, các chất ức chế vi ống, chất ức chế kinaza, các chất ức chế proteasom và các chất ức chế topoisomeraza. Thuật ngữ "lượng độc" theo sáng chế chỉ lượng vừa đủ của tác nhân gây độc tế bào mà, khi được phân phối đến tế bào, sẽ dẫn đến

quá trình làm chết tế bào. Việc phân phối lượng độc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một lượng đủ thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế và tác nhân gây độc tế bào. Việc phân phối lượng độc còn có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một lượng đủ thể tiếp hợp miễn dịch chứa tác nhân gây độc tế bào, trong đó thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể thứ cấp hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng sẽ nhận biết và liên kết với kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Thuật ngữ, trình tự "thu được từ" hoặc "đặc hiệu với trình tự chỉ ra" theo sáng chế chỉ trình tự mà chứa trình tự liền kề có khoảng ít nhất 6 nucleotit hoặc ít nhất 2 axit amin, ít nhất khoảng 9 nucleotit hoặc ít nhất 3 axit amin, ít nhất khoảng 10 đến 12 nucleotit hoặc 4 axit amin, hoặc ít nhất khoảng 15 đến 21 nucleotit hoặc 5 đến 7 axit amin tương đương, nghĩa là tương đồng hoặc bổ trợ với, ví dụ, với vùng liền kề của trình tự được chỉ ra. Theo các phương án nhất định, trình tự chứa tất cả các nucleotit hoặc trình tự axit amin được chỉ ra. Trình tự này có thể là bổ trợ (trong trường hợp trình tự polynucleotit) hoặc tương đồng với vùng trình tự mà đồng nhất với trình tự cụ thể như được xác định theo các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng mà từ đó các trình tự có thể được lấy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vùng mã hóa epitop đặc hiệu, các vùng mã hóa CDR, các vùng mã hóa trình tự khung, các vùng mã hóa các vùng của miền ổn định, các vùng mã hóa các vùng của miền thay đổi, cũng như các vùng không dịch mã và/hoặc không phiên mã. Trình tự được lấy sẽ không cần phải được lấy theo cách vật lý từ trình tự đã quan tâm trong nghiên cứu, mà có thể được tạo ra theo cách bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp tổng hợp hóa học, sao chép, phiên mã hoặc phiên mã ngược, mà dựa trên cơ sở thông tin được cung cấp bởi trình tự của các bazơ trong vùng mà từ đó polynucleotit được lấy. Như vậy, nó có thể được trình bày ở dạng gen dịch mã hoặc gen đối mã theo hướng của polynucleotit ban đầu. Ngoài ra, việc kết hợp các vùng tương ứng với trình tự được chỉ ra có thể được điều chỉnh hoặc kết hợp theo các cách đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là phù hợp với mục đích sử dụng. Ví dụ, trình tự có thể bao gồm hai hoặc nhiều trình tự liền kề mà mỗi trình tự chứa phần của trình tự được chỉ ra, và làm đứt mạch với vùng mà không tương đồng với trình tự được chỉ ra nhưng được nhằm để biểu thị trình tự thu được từ trình tự được chỉ ra. Liên quan đến phân tử của kháng thể, "lấy được từ đó" bao gồm phân tử của kháng thể có liên quan

về mặt chức năng hoặc về mặt cấu trúc đến kháng thể so sánh, ví dụ, "lấy được từ đó" bao gồm phân tử của kháng thể có trình tự hoặc cấu trúc tương tự hoặc hầu như cùng trình tự hoặc cấu trúc, ví dụ, có cùng CDR, khung hoạt động hoặc các vùng thay đổi hoặc tương tự. "Lấy được từ đó" đối với kháng thể còn bao gồm các gốc, ví dụ, một hoặc nhiều, ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc nhiều gốc, mà có thể hoặc có thể không liên tục, nhưng được xác định theo sơ đồ số hoặc mức độ tương đồng với cấu trúc kháng thể tổng quát hoặc các vùng lân cận ba chiều, nghĩa là bên trong CDR hoặc vùng khung, của trình tự so sánh. Thuật ngữ "lấy được từ đó" không chỉ giới hạn ở việc lấy theo cách vật lý từ đó mà bao gồm việc tạo ra theo cách thức bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng các thông tin về trình tự từ kháng thể so sánh để thiết kế kháng thể khác.

Thuật ngữ "được mã hóa bởi" theo sáng chế chỉ trình tự axit nucleic mà mã hóa trình tự polypeptit, trong đó trình tự polypeptit hoặc một phần của chúng chứa trình tự axit amin gồm ít nhất 3 đến 5 axit amin, ít nhất 8 đến 10 axit amin, hoặc ít nhất 15 đến 20 axit amin từ polypeptit đã được mã hóa bởi trình tự axit nucleic.

Thuật ngữ "bệnh ung thư trực tràng ruột kết", theo sáng chế thường được biết là bệnh ung thư ruột kết hoặc bệnh ung thư vùng ruột, để chỉ bệnh ung thư do sự sinh trưởng mất kiểm soát của tế bào trong ruột kết hoặc trực tràng (các phần của ruột già), hoặc trong ruột thừa.

Các thuật ngữ "bệnh ung thư vùng dạ dày" và "bệnh ung thư dạ dày" theo sáng chế được dùng thay thế cho nhau.

Việc tính "mức độ tương đồng" giữa hai trình tự có thể được thực hiện như sau. Các trình tự được duỗi thẳng nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khe hở có thể được đưa vào ở một hoặc cả hai trình tự axit amin hoặc trình tự axit nucleic thứ nhất và thứ hai để duỗi thẳng tối ưu và các trình tự không tương đồng có thể loại bỏ nhằm mục đích so sánh). Chiều dài của trình tự quy chiếu được duỗi thẳng nhằm mục đích so sánh ít nhất bằng 30%, 40%, hoặc 50%, ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, 80%, 90%, 95%, 100% chiều dài của trình tự quy chiếu. Sau đó, các gốc axit amin hoặc nucleotit ở vị trí axit amin hoặc vị trí nucleotit tương đương được so sánh. Nếu vị trí trong trình tự thứ nhất bị chiếm bởi cùng gốc axit amin hoặc nucleotit như vị trí tương đương trong trình tự thứ hai, thì các phân tử là giống hệt nhau ở vị trí đó (theo sáng chế, axit amin hoặc axit nucleic "đồng

nhất" là tương đương với axit amin hoặc axit nucleic "tương đồng"). Mức độ đồng nhất tính theo phần trăm giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí chung của các trình tự, có tính đến số lượng khe hở, và chiều dài của mỗi khe hở, mà cần phải được đưa vào để so sánh tối ưu hai trình tự này.

Việc so sánh các trình tự và việc xác định phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể thực hiện được bằng cách áp dụng thuật toán. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách áp dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970), thuật toán mà được đưa vào chương trình GAP trong gói phần mềm GCG, bằng cách sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, và trọng lượng của khe hở là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng lượng theo chiều dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự nucleotit còn có thể được xác định bằng cách áp dụng chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (Accelerys, Inc. San Diego, Calif.), bằng cách sử dụng NWSgapdna. Ma trận CMP và trọng lượng khe hở là 40, 50, 60, 70, hoặc 80 và trọng lượng theo chiều dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Tập hợp thông số làm ví dụ để xác định độ tương đồng là ma trận ghi điểm Blossum 62 với điểm phạt khe hở là 12, điểm phạt mở rộng khe hở là 4, và điểm phạt khe hở dịch khung là 5.

Thuật ngữ "lai trong các điều kiện nghiêm ngặt" được dùng trong bản mô tả này để chỉ điều kiện áp dụng cho bước lai và rửa. Hướng dẫn thực hiện các phản ứng lai có thể được tìm thấy trong mục *Current Protocols* trong ấn phẩm: *Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Các phương pháp dùng nước hoặc không dùng nước đã được bộc lộ trong tài liệu tham khảo này và có thể được áp dụng. Điều kiện lai cụ thể được nêu ở đây là như sau: 1) điều kiện lai có mức độ nghiêm ngặt thấp trong 6X natri clorua/natri xitrat (SSC) ở khoảng 45°C, tiếp theo là hai lần rửa trong dung dịch 0,2X SSC, 0,1% SDS ít nhất ở 50°C. (Nhiệt độ bước rửa có thể được tăng đến 55°C đối với điều kiện nghiêm ngặt thấp); 2) điều kiện lai có độ nghiêm ngặt trung bình trong 6X SSC ở khoảng 45°C, tiếp theo là rửa một hoặc nhiều lần trong dung dịch 0,2X SSC, 0,1% SDS ở 60°C; 3) điều kiện lai có độ nghiêm ngặt cao ở 6X SSC khoảng 45°C, tiếp theo là rửa một hoặc nhiều lần trong dung dịch 0,2X SSC, SDS 0,1% ở 65°C; và 4) điều kiện lai có độ nghiêm ngặt rất cao là dung dịch natri phosphat 0,5M, SDS 7% ở 65°C, tiếp theo rửa một hoặc nhiều lần trong dung dịch 0,2X SSC, SDS 1% ở 65°C. Các điều kiện rất

nghiêm ngặt (4) thường là các điều kiện được ưu tiên và là điều kiện nên được áp dụng trừ khi có quy định khác.

Cần phải hiểu rằng, các kháng thể và đoạn liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể bao gồm các thay thế axit amin bảo toàn hoặc không thiết yếu khác, mà không có tác động đáng kể đến chức năng polypeptit. Việc có hay không một thay thế cụ thể sẽ được dung nạp, nghĩa là không gây tác động bất lợi đến các tính chất sinh học mong muốn, như hoạt tính liên kết, có thể được xác định như đã được bộc lộ trong Bowie, J U et al. *Science* 247:1306-1310 (1990) hoặc Padlan et al. *FASEB J.* 9:133-139 (1995). "Thay thế axit amin bảo toàn" là khi một trong số các gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin có mạch bên tương tự. Nhóm các gốc axit amin có mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các nhóm này bao gồm các axit amin có mạch bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histiđin), mạch bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), mạch bên phân cực không tích điện (ví dụ, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), mạch bên không phân cực (ví dụ, glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), mạch bên nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histiđin).

Gốc axit amin "không thiết yếu" là gốc mà có thể bị thay đổi từ trình tự kiểu thông thường của tác nhân liên kết, ví dụ, kháng thể, mà không làm hỏng hoặc, không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học, trong khi gốc axit amin "thiết yếu" dẫn đến sự thay đổi này. Trong kháng thể, gốc axit amin thiết yếu có thể là gốc xác định tính đặc hiệu (SDR).

Thuật ngữ "phân lập được" theo sáng chế chỉ nguyên liệu mà được lấy ra khỏi môi trường của nó (ví dụ, môi trường tự nhiên nếu nó có trong tự nhiên). Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có trong tự nhiên có mặt trong sinh vật sống không được phân lập, nhưng có cùng polynucleotit hoặc ADN hoặc polypeptit, tách ra khỏi một số hoặc toàn bộ nguyên liệu cùng tồn tại trong hệ tự nhiên, được phân lập. Các polynucleotit hoặc polypeptit này có thể là một phần của vectơ và/hoặc polynucleotit hoặc polypeptit này là một phần của chế phẩm, ví dụ, hỗn hợp, dung dịch hoặc huyền phù chứa tế bào phân lập được hoặc tế bào nuôi cấy mà chứa polynucleotit hoặc polypeptit, và vẫn được phân lập để vectơ hoặc dược phẩm này không phải là một phần của môi trường tự nhiên của nó.

Thuật ngữ "đơn vị sao chép" theo sáng chế chỉ yếu tố di truyền bất kỳ, như plasmit, nhiễm sắc thể hoặc virut, mà thể hiện như một đơn vị tự động của bản sao chép polynucleotit trong tế bào.

Thuật ngữ "có khả năng liên kết" theo sáng chế chỉ tình huống mà trong đó các thành phần được mô tả có một quan hệ cho phép chúng thực hiện chức năng theo cách đã định. Do đó, ví dụ là trình tự đối chứng "có khả năng liên kết" với trình tự mã hóa được ghép nối theo cách sao cho sự biểu hiện của trình tự mã hóa đạt được trong các điều kiện tương thích với trình tự đối chứng.

Thuật ngữ "vectơ" theo sáng chế chỉ đơn vị sao chép trong đó đoạn polynucleotit khác sẽ được gắn vào, như để tạo ra sự sao chép và/hoặc sự biểu hiện của đoạn gắn vào.

Thuật ngữ "trình tự kiểm soát" theo sáng chế chỉ trình tự polynucleotit mà là cần thiết để tác động đến sự biểu hiện của trình tự mã hóa mà nó ghép nối vào. Bản chất của các trình tự kiểm soát này khác nhau tùy theo sinh vật chủ. Ở sinh vật chưa có nhân điển hình, các trình tự kiểm soát này thường bao gồm gen khởi đầu, vị trí liên kết ribosom và các đầu tận cùng và, trong một số trường hợp, bao gồm đoạn tăng cường. Vì vậy, thuật ngữ "trình tự kiểm soát nhằm bao gồm tối thiểu tất cả các thành phần mà sự có mặt của chúng là cần thiết để biểu hiện, và còn có thể bao gồm các thành phần bổ sung mà sự có mặt của chúng là có lợi, ví dụ, trình tự dẫn đầu.

Thuật ngữ "sản phẩm tinh chế" theo sáng chế chỉ sản phẩm ở dạng chế phẩm mà đã được phân tách ra khỏi các thành phần tế bào mà sản phẩm này thường liên kết với và/hoặc ra khỏi các loại các tế bào khác mà có thể có mặt trong mẫu đáng quan tâm.

Thuật ngữ "epitop" theo sáng chế chỉ thể xác định protein có khả năng liên kết một cách đặc hiệu với kháng thể. Các thể xác định epitop thường bao gồm các nhóm phân tử có hoạt tính bề mặt về mặt hóa học như các axit amin hoặc mạch bên của đường và thường có tính chất cấu trúc ba chiều đặc hiệu, cũng như tính chất tích điện đặc hiệu. Một số epitop là các epitop mạch thẳng trong khi các epitop khác là epitop có thể biến dạng. Epitop mạch thẳng là epitop trong đó trình tự bậc một axit amin liền kề chứa epitop đã được nhận biết. Epitop mạch thẳng thường chứa ít nhất 3, và nói chung nhiều hơn, ít nhất 5, ví dụ, chứa khoảng 8 đến 10 axit amin liền kề. Epitop biến dạng có thể tạo ra ít nhất hai tình huống, như: a) trình tự mạch thẳng chỉ được cho tiếp xúc với liên kết kháng thể

trong các cấu hình protein nhất định, ví dụ, tùy thuộc vào liên kết phối tử, hoặc tùy thuộc vào sự biến đổi (ví dụ, phosphoryl hóa) bằng cách dẫn truyền tín hiệu các phân tử; hoặc b) kết hợp các dấu hiệu cấu trúc từ nhiều hơn một phần của protein này, hoặc trong các protein siêu phân tử đa cấu trúc, từ nhiều hơn một cấu trúc siêu phân tử, trong đó các dấu hiệu này là đủ gần với không gian ba chiều để tham gia vào liên kết.

Theo sáng chế, "isotyp" chỉ nhóm kháng thể (ví dụ, IgM, IgA, IgE hoặc IgG) mà được mã hóa bởi gen của vùng ổn định của chuỗi nặng.

Thuật ngữ "tác nhân có thể phát hiện", "tác nhân đánh dấu" hoặc "bị đánh dấu" theo sáng chế chỉ việc kết chất chỉ thị có thể phát hiện được vào polypeptit hoặc glycoprotein. Các phương pháp khác nhau để đánh dấu các polypeptit và glycoprotein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được áp dụng. Các ví dụ về các tác nhân đánh dấu dùng cho các polypeptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất sau: các đồng vị phóng xạ hoặc các phóng xạ hạt nhân (ví dụ, inđi (^{111}In), iot (^{131}I hoặc ^{125}I), ytri (^{90}Y), luteti (^{177}Lu), actini (^{225}Ac), bismut (^{212}Bi hoặc ^{213}Bi), lưu huỳnh (^{35}S), cacbon (^{14}C), triti (^{3}H), rođi (^{188}Rh), techneti (^{99} mTc), praseođim, hoặc phospho (^{32}P) hoặc đồng vị phóng xạ phát positron, ví dụ, cacbon-11 (^{11}C), kali-40 (^{40}K), nitơ-13 (^{13}N), oxy-15 (^{15}O) 9, flo-18 (^{18}F), gali-68 (^{68}Ga), và iot-121 (^{121}I)), tác nhân đánh dấu huỳnh quang (ví dụ, FITC, rođamin, các chất phát quang lanthanit), các tác nhân đánh dấu enzym (ví dụ, peroxiđaza của cây củ cải cay, beta-galactosiđaza, luxiferaza, phosphataza kiềm), chất phát quang hóa học, các nhóm biotinyl (mà có thể được phát hiện bằng phân tử aviđin được đánh dấu, ví dụ, chứa gốc streptaviđin và tác nhân đánh dấu huỳnh quang hoặc enzym hoạt tính mà có thể được phát hiện theo các phương pháp quang học hoặc nhiệt lượng), và các epitop polypeptit định trước được phát hiện bởi chất thông báo thứ cấp (ví dụ, trình tự cặp leuxin khóa kéo, vị trí liên kết đối với các kháng thể thứ cấp, các miền liên kết kim loại, dấu epitop). Theo một số phương án, các tác nhân đánh dấu được gắn bởi các nhánh đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm cản trở không gian tiềm ẩn.

Các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu", "được liên kết đặc hiệu" hoặc "tính đặc hiệu liên kết" được dùng trong bản mô tả này, đối với phân tử của kháng thể kháng GCC, có nghĩa là phân tử của kháng thể liên kết với GCC, ví dụ, protein GCC của người, với ái lực cao hơn khi nó liên kết với protein không phải là GCC, ví dụ, BSA. Thông thường, phân tử kháng GCC sẽ có K_d đối với protein không phải là GCC, ví dụ, BSA, mà mạnh hơn 2,

mạnh hơn 10, mạnh hơn 100, mạnh hơn 1.000 lần, mạnh hơn 10^4, mạnh hơn 10^5, hoặc mạnh hơn 10^6 lần K_d của nó đối với GCC, ví dụ, protein GCC của người. Trong việc xác định K_d, K K_d đối với GCC và đối với protein không phải là GCC, ví dụ, BSA, nên được thực hiện trong cùng điều kiện.

Thuật ngữ "ái lực" hoặc "ái lực liên kết" chỉ hằng số liên kết khả kiến hoặc K_a. K_a là số nghịch đảo của hằng số phân ly (K_d). Kháng thể có thể, ví dụ, có ái lực liên kết ít nhất 10^5M^{-1}, 10^6M^{-1}, 10^7M^{-1}, 10^8M^{-1}, 10^9M^{-1}, $10^{10}M^{-1}$ và $10^{11}M^{-1}$ đối với phân tử đích cụ thể. Ái lực liên kết của kháng thể với đích thứ nhất cao hơn so với đích thứ hai có thể được biểu thị bằng K_A cao hơn (hoặc trị số K_D thấp hơn) đối với liên kết thứ hai để liên kết đích thứ nhất hơn là K_A (hoặc trị số K_D) để liên kết đích thứ hai. Trong các trường hợp này, kháng thể có tính đặc hiệu với đích thứ nhất (ví dụ, protein ở dạng thứ nhất hoặc dạng bắt chước của chúng) so với đích thứ hai (ví dụ, cùng với protein ở dạng thứ hai hoặc dạng bắt chước của chúng; hoặc protein thứ hai). Khác biệt về ái lực liên kết (ví dụ, về mức độ đặc hiệu hoặc các chỉ số so sánh khác) có thể ít nhất gấp 1, 5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37, 5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, hoặc 10^5 lần.

Ái lực liên kết có thể được xác định theo nhiều phương pháp khác nhau bao gồm việc thẩm tách ở trạng thái cân bằng, liên kết ở trạng thái cân bằng, lọc gel, ELISA, cộng hưởng 19act cc bề mặt, hoặc phổ (ví dụ, bằng cách áp dụng thử nghiệm huỳnh quang). Ví dụ, ái lực tương đối của phân tử của kháng thể kháng GCC có thể được đo từ phép đo ELISA đối với protein GCC (ví dụ, chất sinh miễn dịch dùng để tạo ra các phân tử của kháng thể kháng GCC), bằng phép đo FACS kết hợp tế bào biểu hiện GCC.

Điều kiện làm ví dụ để đánh giá ái lực liên kết là trong dung dịch đệm TRIS (50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM $CaCl_2$ ở độ pH=7,5). Các kỹ thuật này có thể được áp dụng để đo nồng độ của protein liên kết và protein không liên kết dưới dạng hàm số của nồng độ protein liên kết (hoặc đích). Nồng độ của protein liên kết ([liên kết]) liên quan đến nồng độ không liên kết ([tự do]) và nồng độ của vị trí liên kết đối với protein liên kết trên đích mà (N) là số lượng vị trí liên kết trên mỗi phân tử đích theo công thức sau:

$$[\text{liên kết}] = N \cdot [\text{tự do}]/((1/K_A) + [\text{tự do}]).$$

Không cần phải luôn luôn xác định chính xác K_A, mặc dù, vì đôi khi trị số này là đủ để định lượng ái lực, ví dụ, được xác định bằng cách áp dụng phương pháp như phân tích

ELISA hoặc FACS, là tỷ lệ với K_A, và do đó có thể được dùng để so sánh, như xác định có hay không có ái lực cao hơn, ví dụ, cao hơn 2 lần, để định lượng ái lực, hoặc để suy ra ái lực, ví dụ, bằng hoạt tính trong thử nghiệm chức năng, ví dụ, trong thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo*. Ái lực của các phân tử của kháng thể kháng GCC cũng có thể được đo bằng cách áp dụng công nghệ như Phân tích tương tác phân tử sinh học thời gian thực (BIA) (ví dụ, xem: Sjolander, S, and Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345 và Szabo et al., 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). Thuật ngữ "BIA" hay "cộng hưởng plasmon bề mặt" theo sáng chế chỉ công nghệ nghiên cứu tương tác đặc hiệu đôi trong thời gian thực, mà không đánh dấu chất tương tác bất kỳ (ví dụ, BIACORE™). Các thay đổi về khối lượng trên bề mặt liên kết (chỉ báo hiện tượng liên kết) gây ra sự thay đổi chỉ số khúc xạ của bề mặt gần ánh sáng (hiện tượng quang học của cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)), tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được mà có thể được dùng làm dấu hiệu chỉ báo về các phản ứng thời gian thực giữa các phân tử sinh học.

Phép đo ái lực của các phân tử của kháng thể kháng GCC bằng cách sử dụng hệ BIACORE™ T100 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) được bộc lộ trong ví dụ 1 của US2011/0110936, nội dung của nó được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn. Một cách vắn tắt, kháng thể kháng GCC (chế phẩm A) được pha loãng đến nồng độ thích hợp (ví dụ, 20µg/ml) trong dung dịch chứa 10mM natri axetat, độ pH=4,0 và kháng thể tham chiếu/đối chứng (chế phẩm B) được pha loãng đến nồng độ thích hợp (ví dụ, 10µg/ml) trong dung dịch chứa 10mM natri axetat, độ pH=4,0. Mỗi kháng thể được cố định đồng hóa trị với một vài chip CM4 BIACORE bằng cách sử dụng phép liên hợp amin tiêu chuẩn. Đối với mỗi chip CM4 chuẩn bị được, chế phẩm kháng thể được cố định với hai khoang lưu lượng ở khoảng 75 đến 100 RU trong khi chế phẩm kháng thể B được cố định với một khoang lưu lượng ở khoảng 70 đến 80 RU. Khoang lưu lượng thứ tư còn lại của mỗi chip CM4 được dùng làm khoang lưu lượng tham chiếu. Nồng độ của protein GCC có thể được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp được nêu một cách chi tiết bởi Pace và các đồng tác giả trong tài liệu: *Protein Science*, 4:2411 (1995), và bởi Pace và Grimsley trong tài liệu *Current Protocols in Protein Science* 3.1.1-3.1.9 (2003). Đối với mỗi chip CM4 chuẩn bị được, protein GCC được tiêm trong thời gian 2 phút ở nồng độ nằm trong khoảng từ 202nM đến 1,6nM (pha loãng hai lần), tiếp theo là 7 phút phân ly. Các mẫu được tiêm ngẫu nhiên lặp lại ba lần với một vài chu kỳ nạp vào dung dịch đệm

xen kẽ vào để tham chiếu kép. Để thu được dữ liệu phân rã phân ly đáng kể hơn, ba lần tiêm protein GCC 101nM nữa và ba lần tiêm dung dịch đệm nữa được thực hiện với phép tiêm 2 phút và thời gian phân ly 4 giờ. Lưu tốc = 100µl/phút được sử dụng đối với tất cả các thử nghiệm và tất cả các bề mặt được tái tạo với xung 20 giây của dung dịch chứa 10mM Glyxin-HCl (độ pH =2,0). Tất cả các mẫu được chuẩn bị trong dung dịch đệm chạy mẫu (ví dụ, nước muối đệm HEPES, polysorbate 20 0,005%, độ pH=7,4 (HBS-P)) với BSA 100µg/ml được bổ sung vào. Toàn bộ dữ liệu về biểu đồ cảm biến (đồ thị cộng hưởng plasmon bề mặt theo thời gian) có thể được xử lý bằng phần mềm Scrubber 2.0 (BioLogic Software, Campbell, Australia) và được làm khớp gộp với mô hình tương tác 1:1 bao gồm thời gian đối với hằng số chuyển khối k_m bằng cách sử dụng phần mềm CLAMP™ (Myszka and Morton *Trends Biochem. Sci.* 23:149-150 (1998)).

Thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị " được dùng trong bản mô tả này được xác định là việc cho đối tượng, ví dụ, bệnh nhân, dùng phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc dùng, ví dụ, bằng cách dùng cho mô hoặc tế bào phân lập được từ đối tượng mà sẽ được đưa trở lại vào đối tượng. Phân tử của kháng thể kháng GCC có thể được dùng riêng rẽ hoặc kết hợp với tác nhân thứ hai. Việc điều trị có thể là chữa trị, làm lành, làm thuyên giảm, làm nhẹ, làm thay đổi, cứu chữa, làm giảm, làm nhẹ bớt, cải thiện hoặc tác động đến các rối loạn, các triệu chứng rối loạn hoặc tố bẩm rối loạn, ví dụ, bệnh ung thư. Trong khi không mong muốn bị ràng buộc bởi giả thiết, việc điều trị bệnh được tin là ức chế, loại bỏ, hoặc diệt tế bào *in vitro* hoặc *in vivo*, hoặc theo cách khác, làm giảm khả năng của tế bào, ví dụ, tế bào bất thường, để gây ra rối loạn, ví dụ, rối loạn như được bộc lộ theo sáng chế (ví dụ, bệnh ung thư).

Thuật ngữ "đối tượng" được dùng trong bản mô tả này nhằm bao gồm các động vật có vú, các động vật linh trưởng, người và động vật không phải là người. Ví dụ, đối tượng có thể là con bệnh nhân (ví dụ, người hoặc động vật), mắc bệnh ung thư, trong đó ít nhất một vài trong số các tế bào biểu hiện GCC, như bệnh ung thư có nguồn gốc dạ dày-ruột (ví dụ, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, hoặc bệnh ung thư thực quản), bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô ở tế bào biểu mô có vảy, bệnh ung thư biểu mô tuyến vảy, bệnh ung thư tuyến), sacôm mô mềm (ví dụ, sacôm cơ trơn hoặc sacôm cơ vân), các loại u thần kinh nội tiết (ví dụ, dạ dày-ruột hoặc phế quản-phổi), hoặc khối u thần kinh ngoại bì; triệu chứng như các bệnh

ung thư biểu hiện GCC; hoặc tố bẩm đối với các bệnh ung thư biểu hiện GCC. Để làm ví dụ khác, đối tượng có thể là bệnh nhân mắc rối loạn dạ dày-ruột, trong đó ít nhất một vài trong số các tế bào của hệ dạ dày-ruột biểu hiện GCC, như trong hội chứng viêm ruột, bệnh Crohn và tình trạng táo bón. Theo ví dụ khác, đối tượng có thể là bệnh nhân mắc rối loạn thần kinh, trong đó ít nhất một số tế bào thần kinh bên trong hệ thần kinh trung ương biểu hiện GCC của bệnh nhân, như bệnh Parkinson. Thuật ngữ "động vật không phải là người" theo sáng chế bao gồm tất cả động vật có xương sống không phải là người, ví dụ, các động vật có vú không phải là người và không phải là động vật có vú, như các động vật linh trưởng không phải là người, cừu, chó, bò, gà, động vật lưỡng cư, loài bò sát, chuột nhắt, chuột to, thỏ hoặc dê v.v., trừ khi được nêu rõ theo cách khác. Theo một phương án, "đối tượng" loại trừ một hoặc nhiều hoặc tất cả chuột nhắt, chuột to, thỏ hoặc dê.

Theo sáng chế, lượng phân tử của kháng thể kháng GCC "có hiệu quả" hoặc "đủ" để điều trị rối loạn, hoặc "lượng hữu hiệu để điều trị bệnh" hoặc "lượng đủ để điều trị" chỉ lượng phân tử của kháng thể mà có hiệu quả, sau khi cho đối tượng dùng một hoặc nhiều liều, trong việc điều trị tế bào, ví dụ, tế bào ung thư (ví dụ, tế bào biểu hiện GCC của khối u), hoặc trong việc chữa trị kéo dài, làm giảm, làm nhẹ bớt hoặc cải thiện cho đối tượng mắc rối loạn như được bộc lộ theo sáng chế hơn mức độ mong đợi khi không điều trị bệnh theo cách đó. Theo sáng chế, "ức chế sự tăng trưởng" của khối u hoặc bệnh ung thư chỉ việc làm chậm, làm ngừng, kìm hãm hoặc dừng sự tăng trưởng và/hoặc di căn của nó và không nhất thiết phải chỉ việc loại bỏ hoàn toàn sự sinh trưởng của khối u.

Theo sáng chế, "GCC" còn được gọi là protein "STAR", "GUC2C", "GUCY2C" hoặc "thụ thể ST" chỉ GCC của động vật có vú, tốt hơn là protein GCC của người. GCC của người chỉ protein được nêu trong SEQ ID NO: 3 và các biến thể alen protein có trong tự nhiên của chúng. Alen được nêu trong SEQ ID NO: 3 có thể được mã hóa bởi trình tự axit nucleic của GCC được thể hiện trong SEQ ID NO: 2. Các biến thể khác là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem: số hiệu lưu giữ Ensp0000261170, Ensembl Database, European Bioinformatic Institute và Wellcome Trust Sanger Institute, mà có leuxin ở gốc 281; SEQ ID NO: 14 trong US 20060035852; hoặc số truy cập GenBank là AAB 19934. Nói chung, biến thể alen có trong tự nhiên có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95%, 97% hoặc 99% so với trình tự GCC của SEQ ID NO: 3. Bản sao đó mã hóa sản phẩm protein chứa 1073 axit amin, và bộc lộ trong số hiệu lưu giữ GenBank:

NM_004963. Protein GCC được xác định tính chất là protein thụ thể bề mặt của tế bào xuyên màng, và tin là đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì dịch ruột non, chất điện giải tính nội cân bằng và tăng sinh tế bào.

Các kháng thể kháng GCC

Được bộc lộ trong bản mô tả này là các phân tử của kháng thể kháng GCC mà là hữu dụng, *trong số các thứ khác,* để phát hiện sự biểu hiện GCC. Các phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, là hữu dụng để phát hiện GCC, có thể bao gồm các phân tử của kháng thể kháng GCC không phải của người (ví dụ, phân tử của kháng thể không phải của người và không phải là chuột đồng) mà liên kết đặc hiệu với GCC, ví dụ, với ái lực liên kết ít nhất 10^3M^{-1}, 10^4M^{-1}, 10^5M^{-1}, 10^6M^{-1}, 10^7M^{-1}, 10^8M^{-1}, 10^9M^{-1}, $10^{10}M^{-1}$ và $10^{11}M^{-1}$ đối với GCC. Phân tử của kháng thể kháng GCC có thể là phân tử của kháng thể không phải của người, không phải là chuột đồng và không phải của chuột to, ví dụ, phân tử của kháng thể kháng GCC của thỏ, ví dụ, được bộc lộ theo sáng chế.

Theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất các phân tử của kháng thể kháng GCC mà có các đặc tính như được tổng kết trong bảng 1 và bảng 2. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phân tử của kháng thể kháng GCC mà có các dấu hiệu như được tổng kết trong các bảng 3, 4, 5 và/hoặc 6.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC là kháng thể lai của thỏ và là một trong số kháng thể MIL-44-148-2 hoặc MIL-44-67-4. Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC thu được từ kháng thể MIL-44-148-2 hoặc MIL-44-67-4.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC sẽ có ái lực với GCC, ví dụ, đo được nhờ thử nghiệm liên kết trực tiếp hoặc liên kết cạnh tranh. Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC có K_d nhỏ hơn $1x10^{-6}M$, nhỏ hơn $1x10^{-7}M$, nhỏ hơn $1x10^{-8}M$, nhỏ hơn $1x10^{-9}M$, nhỏ hơn $1x10^{-10}M$, nhỏ hơn $1x\ 10^{-11}M$, nhỏ hơn $1x10^{-12}M$, hoặc nhỏ hơn $1x10^{-13}M$. Theo một phương án, phân tử của kháng thể là IgG, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, và có K_d nhỏ hơn $1x10^{-6}M$, nhỏ hơn $1x10^{-7}M$, nhỏ hơn $1x10^{-8}M$, hoặc nhỏ hơn $1x10^{-9}M$. Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng thể MIL-44-148-2 hoặc kháng thể thu được từ đó có K_d nằm trong khoảng từ 80pM đến 200pM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100pM đến 150pM hoặc khoảng 120pM. Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng

thể MIL-44-148-2 hoặc kháng thể thu được từ đó có k_a nằm trong khoảng từ $0,9x10^5M^{-1}$ giây đến $1,25x10^5M^{-1}$ giây, tốt hơn là khoảng $1,1x10^5M^{-1}$ giây. Theo một phương án, phân tử của kháng thể là ScFv và có K_d nhỏ hơn $1x10^{-6}$M, nhỏ hơn $1x10^{-7}$M, nhỏ hơn $1x10^{-8}$M, nhỏ hơn $1x10^{-9}$M, nhỏ hơn $1x10^{-10}$ M, $1x10^{-11}$M, nhỏ hơn $1x10^{-12}$M, hoặc nhỏ hơn $1x10^{-13}$M.

Theo các phương án, phân tử của kháng thể không phải là các thể tiếp hợp miễn dịch, nghĩa là kháng thể "trần" và theo các phương án, chúng gây ra phản ứng tế bào khi liên kết với GCC. Theo các phương án có liên quan, phản ứng tế bào được thực hiện bằng tế bào biểu hiện GCC mà kháng thể liên kết với. Phản ứng tế bào như vậy có thể là quá trình tải nạp tín hiệu do GCC gây ra, ví dụ, nếu phân tử của kháng thể là chất chủ vận của GCC (ví dụ, xem: US20040258687). Theo các phương án khác, phản ứng tế bào được thực hiện bằng tế bào thứ hai, ví dụ, tế bào tác động miễn dịch (ví dụ, tế bào giết tự nhiên) mà nhận biết phân tử của kháng thể liên kết với GCC trên tế bào thứ nhất. Theo một số phương án, các phân tử giám sát, ví dụ, các phân tử bổ trợ, tiếp xúc với phân tử của kháng thể liên kết GCC trước khi phản ứng tế bào. Các phản ứng tế bào theo các phương án này có thể gây chết tế bào biểu hiện GCC.

Theo phương án khác nữa, phân tử của kháng thể mà là các thể tiếp hợp miễn dịch có thể vừa gây phản ứng tế bào khi liên kết với GCC và nhập bào để phân phối tác nhân đến tế bào biểu hiện GCC mà nó liên kết với.

Theo một số phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể ức chế liên kết phối tử với GCC.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể không phải là GCC:B10, GCC:4D7 hoặc GCC:C8. Theo phương án khác, phân tử của kháng thể kháng GCC không liên kết với miền nội bào của GCC, các gốc axit amin 455 đến 1073 của SEQ ID NO: 3. Ví dụ, theo phương án này, phân tử của kháng thể kháng GCC không liên kết với miền tương đồng kinaza hoặc miền guanylyl xyclaza của GCC.

Đơn vị cấu trúc kháng thể động vật có vú có trong tự nhiên được làm ví dụ bởi tetrame. Mỗi tetrame chứa hai cặp chuỗi polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25kDa) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50 đến 70kDa). Phần đầu tận cùng amin của mỗi chuỗi chứa vùng thay đổi gồm 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm

nhận biết kháng nguyên. Phần đầu tận cùng carboxyl của mỗi chuỗi xác định vùng ổn định chủ yếu chịu trách nhiệm về chức năng cảm ứng. Các chuỗi nhẹ của người có thể được phân loại là chuỗi nhẹ kapa và chuỗi nhẹ lamda. Các chuỗi nặng có thể được phân loại là mu, delta, gama, alpha, hoặc epsilon, và xác định kiểu tương đương của kháng thể lần lượt là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Bên trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng thay đổi và vùng ổn định được nối bởi vùng "J" có khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng còn bao gồm vùng "D" có khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. Nói chung, xem: *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Các vùng thay đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo ra vị trí liên kết kháng thể. Các kiểu tương đương được ưu tiên đối với các phân tử của kháng thể kháng GCC là các globulin miễn dịch IgG, mà có thể được phân loại thành bốn nhóm phụ: IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, có chuỗi nặng gama khác nhau. Hầu hết các kháng thể điều trị bệnh là các kháng thể của người, kháng thể khảm, hoặc các kháng thể được làm giống như kháng thể của người thuộc isotyp IgG1. Theo phương án cụ thể, phân tử của kháng thể kháng GCC là kháng thể IgG của thỏ.

Các vùng thay đổi của mỗi cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên. Do đó, kháng thể IgG nguyên vẹn có hai vị trí liên kết giống nhau. Tuy nhiên, các kháng thể có hai chức năng hoặc đặc hiệu kép là các cấu trúc lai nhân tạo mà có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau, tạo ra hai vị trí liên kết khác nhau.

Các mạch đều thể hiện cấu trúc chung giống nhau của các vùng khung (FR) bảo toàn ở mức độ tương đối được nối bởi ba vùng siêu thay đổi, còn được gọi các vùng xác định tính bổ trợ hay CDR. Các CDR thu được từ hai chuỗi của mỗi cặp được so sánh trình tự theo các vùng khung, cho phép liên kết với epitop đặc hiệu. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4 này. Việc phân bổ các axit amin đến từng miền là theo định nghĩa nêu trong tài liệu: *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991)), hoặc Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). Theo sáng chế, CDR được dùng để chỉ từng vùng của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2, HCDR3) và chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Phân tử của kháng thể kháng GCC có thể chứa toàn bộ, hoặc phân nhóm liên kết kháng nguyên của CDR, của một hoặc cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, của một trong số các kháng thể nêu trên của thỏ. Các trình tự axit amin của các kháng thể lai của thỏ, chứa các vùng thay đổi và CDR, có thể được tìm thấy trong Bảng 3 và Bảng 5.

Do đó, theo một phương án, phân tử của kháng thể chứa một hoặc cả hai:

(a) một, hai, ba, hoặc nhiều liên kết kháng nguyên của CDR của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và/hoặc LCDR3) của một trong số các kháng thể lai nêu trên của thỏ. Theo các phương án, (các) CDR có thể có trình tự axit amin của một hoặc nhiều hoặc tất cả các LCDR1-3 như sau: LCDR1, hoặc LCDR1 được cải biến, trong đó một đến bảy axit amin được thay thế bảo toàn) LCDR2, hoặc LCDR2 được cải biến, trong đó một hoặc hai axit amin được thay thế bảo toàn); hoặc LCDR3, hoặc LCDR3 được cải biến, trong đó một hoặc hai axit amin được thay thế bảo toàn; và

(b) một, hai, ba, hoặc nhiều liên kết kháng nguyên của, CDR của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và/hoặc HCDR3) của một trong số các kháng thể lai nêu trên của thỏ. Theo các phương án, (các) CDR có thể có trình tự axit amin của một hoặc nhiều hoặc tất cả các HCDR1-3 như sau: HCDR1, hoặc HCDR1 được cải biến, trong đó một hoặc hai axit amin được thay thế bảo toàn; HCDR2, hoặc HCDR2 được cải biến, trong đó một đến bốn axit amin được thay thế bảo toàn; hoặc HCDR3, hoặc HCDR3 được cải biến, trong đó một hoặc hai axit amin được thay thế bảo toàn.

Chất sinh miễn dịch hữu dụng để tạo ra các phân tử của kháng thể kháng GCC bao gồm GCC, ví dụ, các tế bào biểu hiện GCC của người (ví dụ, dòng tế bào khối u, ví dụ, tế bào T84, hoặc các tế bào khối u ruột kết tươi hoặc được làm đông lạnh, các tế bào tái tổ hợp biểu hiện GCC); các phân đoạn màng của các tế bào biểu hiện GCC (ví dụ, tế bào khối u ruột kết, ví dụ, tế bào T84), hoặc các tế bào khối u ruột kết tươi hoặc được làm đông lạnh; các tế bào tái tổ hợp biểu hiện GCC; GCC phân lập được hoặc đã được tinh chế, ví dụ, protein GCC của người (ví dụ, GCC phân lập được theo phương pháp sinh hóa, ví dụ, phân lập được từ các tế bào của khối u dạ dày-ruột hoặc các tế bào tái tổ hợp biểu hiện GCC hoặc biến thể của chúng), một phần của chúng (ví dụ, miền ngoại bào của GCC, miền tương đồng kinaza của GCC hoặc miền xúc tác guanylyl xyclaza của GCC hoặc peptit tương ứng với phần của chúng, ví dụ, chứa ít nhất khoảng 8, 10, 12, 14, 16,

20, 24, 28 hoặc 32 gốc axit amin của SEQ ID NO: 3); hoặc chất sinh miễn dịch chứa SEQ ID NO: 46 hoặc chứa phần thành thục của chúng mà không có trình tự tín hiệu (nghĩa là không có các gốc axit amin 1 đến 21 hoặc 23 của SEQ ID NO: 46), ví dụ, protein hGCC(ECD)-mIgG2a FcR r-mutII thành thục (theo sáng chế được gọi là "pLKTOK108"), SEQ ID NO: 48.

Chất sinh miễn dịch có thể được dung hợp với các trình tự khác loại để hỗ trợ trong xử lý sinh hóa, tinh chế, gây miễn dịch hoặc phép đo chuẩn độ kháng thể. Các chất sinh miễn dịch có thể chứa phần GCC, ví dụ, miền ngoại bào, và phần chứa polypeptit không phải là GCC. Có nhiều lựa chọn để xây dựng protein dung hợp để dễ được làm sạch hoặc được cố định trên nền rắn, ví dụ, cột ái lực hoặc đĩa vi chuẩn độ hoặc cơ chất/chip thử nghiệm thích hợp khác. Ví dụ, gốc dung hợp có thể bổ sung vào miền, ví dụ, glutathion-S-transferaza/kinaza (GST), mà có thể liên kết với glutathion; vùng Fc của globulin miễn dịch, mà có thể liên kết với protein A hoặc protein G; các gốc axit amin, ví dụ, hai, ba, bốn, năm, tốt hơn là sáu, gốc histiđin mà có thể liên kết với niken hoặc coban trên cột ái lực; dấu epitop, ví dụ, phần c-myc của gen gây ung thư (myc-tag), dấu FLAG (US 4,703,004), dấu hemaglutinin (HA), dấu T7 gen 10, dấu V5, dấu HSV, dấu VSV-G mà có thể liên kết với kháng thể đặc hiệu với dấu; hoặc chất đồng yếu tố, ví dụ, biotin, mà có thể liên kết với streptaviđin.

Chất sinh miễn dịch mà chứa phần Fc globulin miễn dịch có thể giữ GCC, trong dung dịch hoặc được gắn vào tế bào, trong cấu hình mà cho phép tiếp cận về mặt cấu trúc với các epitop GCC bằng các thành phần giám sát miễn dịch của vật chủ để tạo ra kháng thể theo cách có hiệu quả. Vì các chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa các vùng Fc sẽ liên kết vào đime thông qua liên kết đisulfua giữa các mạch, chất sinh miễn dịch đã được tạo ra theo cách dung hợp với các vùng Fc là đime. Hóa trị của các protein dung hợp có thể phản ánh loại globulin miễn dịch tham gia vào vùng Fc. Ví dụ, các thể dung hợp với các protein IgG có thể là đime, các thể dung hợp IgA có thể tạo ra chất sinh miễn dịch tetrame, và các thể dung hợp IgM có thể tạo ra chất sinh miễn dịch đecame, trong đó tetrame và đecame được tạo điều kiện thuận lợi bằng cách đồng chuyển nhiễm với chuỗi J. Globulin miễn dịch làm ví dụ đối với protein dung hợp Fc là IgG1. Phần được sử dụng thường có miền bản lề IgG1, miền CH2 và CH3 được mã hóa bởi exon đơn. Vì exon này còn có phần của vùng CH1, mà có xystein được định hướng đến liên kết đisulfua với xystein lấy

từ chuỗi nhẹ, là cải biến hữu dụng để gây đột biến trên xystein CH1, ví dụ, thành serin, để đảm bảo không có xystein không ghép cặp trong protein dung hợp. Đột biến còn làm tăng mức độ linh hoạt của miền bản lề.

Phần Fc lấy từ các loài không phải là cơ thể chủ, ví dụ, vùng Fc Ig người, để dung hợp với chất sinh miễn dịch nhằm gây miễn dịch ở các loài vật chủ, ví dụ, chuột nhắt, chuột to, thỏ, dê, hoạt động như các tá dược. Chức năng tá dược này có thể khơi mào các kháng thể đặc hiệu chống lại cả các epitop Fc và GCC. Các kháng thể Fc phản ứng có thể được xác định và loại bỏ trong khi sàng lọc. Phần Fc có thể có trình tự kiểu thông thường hoặc trình tự bị đột biến để cải biến chức năng cảm ứng. Ví dụ, vùng ổn định bị đột biến (biến thể) có thể được đưa vào protein dung hợp để làm giảm đến mức tối thiểu liên kết với các thụ thể Fc và/hoặc khả năng gắn với bổ thể (ví dụ, xem GB 2,209,757 B của Winter và các đồng tác giả; WO 89/07142 của Morrison và các đồng tác giả; WO 94/29351 của Morgan và các đồng tác giả). Theo ví dụ được ưu tiên, lysin 235 và glyxin 237, được đánh số theo tiêu chuẩn vùng Fc, bị đột biến, ví dụ, thành alanin. Chất sinh miễn dịch/protein dung hợp với IgG bị đột biến Fc có thể có tương tác giảm với các thụ thể trong vật chủ. Protein dung hợp chất sinh miễn dịch hòa tan được ưu tiên (sau khi làm cho thành thục để cắt peptit dẫn truyền tín hiệu và tiết ra) là hGCC(ECD)-mIgG2a FcR r-mutII (pLKTOK108), mà chứa các gốc axit amin 24 đến 430 của SEQ ID NO: 3 dung hợp với Fc globulin miễn dịch của chuột bị đột biến IgG2a (gọi chung là SEQ ID NO:48).

Để chuẩn bị chất sinh miễn dịch được biểu hiện trong tế bào, phần globulin miễn dịch có thể được tạo cấu trúc để bắt chước phần globulin miễn dịch của thụ thể tế bào B. Ví dụ, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể được dung hợp tiếp với polypeptit chứa vùng xuyên màng của thụ thể miễn dịch, như các thụ thể Fcγ, các thụ thể Fcα, thụ thể Fcα/μ hoặc các thụ thể Fcε. Sự định hướng phù hợp của chất sinh miễn dịch liên kết tế bào mang thụ thể Fc cùng với việc để lộ ra đủ trên bề mặt tế bào có thể được cải thiện nếu tế bào biểu hiện chất sinh miễn dịch protein dung hợp còn chứa các thành phần bổ sung của phức kháng nguyên thụ thể, ví dụ, thụ thể IgM hoặc thụ thể IgD của tế bào B. Các thành phần thích hợp của phức bao gồm các protein bao globulin miễn dịch (Ig), như MB-1 và B29 (CD79A và CD79B; Hombach et al. *Eur. J. Immunol.* 20:2795-2799 (1990) đối với thụ thể IgM), mà tạo ra đime khác loại. Các protein bao Ig có thể được tạo ra theo phương pháp nội sinh bằng tế bào được chuyển nhiễm, ví dụ, nếu chuyển nhiễm dòng tế

bào u bạch huyết B; hoặc bằng cách đồng chuyển nhiễm chất sinh miễn dịch với các protein bao, ví dụ, trong vectơ riêng biệt hoặc trong cùng vectơ.

Epitop hữu dụng, ví dụ, epitop tham chiếu, từ phân tử GCC, đến các phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, các kháng thể đơn dòng của thỏ, hoặc các phiên bản được làm giống như của người của chúng, như được bộc lộ theo sáng chế, có thể liên kết, có thể được thấy trên phần GCC ngoại bào. Các epitop GCC này có thể liên kết với phân tử của kháng thể trên bề mặt của tế bào, ví dụ, ở bên ngoài tế bào.

Ví dụ, epitop đối với phân tử của kháng thể kháng GCC có thể nằm bên trong, hoặc bao gồm các gốc nằm trong các gốc từ 1 đến 50 của SEQ ID NO: 3, hoặc đoạn của chúng mà liên kết với phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, đoạn liên kết MIL-44-148-2 của chúng. Các đoạn này có thể chứa các gốc 1 đến 25, 5 đến 30, 10 đến 35, 15 đến 40, 20 đến 45, 25 đến 50, 5 đến 45, 10 đến 40, 15 đến 35, 20 đến 30 hoặc 33 đến 50 của SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, epitop đối với phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng thể MIL-44-148-2, là epitop biến dạng còn chứa một hoặc nhiều gốc axit amin bổ sung trong trình tự axit amin GCC ngoài gốc 50, nghĩa là được chọn trong số các gốc khoảng 50 đến 1073 của SEQ ID NO: 3.

Các kháng thể kháng lại các epitop hoặc miền ngoại bào này, ví dụ, các epitop nằm bên trong, hoặc chứa các gốc trong số các gốc axit amin từ 24 đến 420 của SEQ ID NO: 3, hoặc phần tham chiếu của chúng, ví dụ, các gốc từ 24 đến 75, 75 đến 150, 150 đến 225, 225 đến 300, 300 đến 375 hoặc 375 đến 420 của GCC, hoặc phân tử của kháng thể lấy được từ đó, có thể là hữu dụng để làm các kháng thể dung để điều trị hoặc chẩn đoán bệnh, như được bộc lộ theo sáng chế.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC có một hoặc nhiều đặc tính sau:

a) cạnh tranh để liên kết, ví dụ, liên kết với GCC bề mặt của tế bào hoặc GCC đã được tinh chế, trong đó một trong số các phân tử của kháng thể kháng GCC nêu trên đã được tóm tắt trong bảng 1 và bảng 2 chẳng hạn, các kháng thể lai của thỏ (ví dụ, MIL-44-148-2);

b) liên kết với cùng, hoặc hầu như cùng, epitop trên GCC như một trong số các phân tử của kháng thể kháng GCC nêu trên đã được tóm tắt trong bảng 1 và bảng 2, ví dụ, các

kháng thể lai của thỏ (ví dụ, MIL-44-148-2). Theo một phương án, kháng thể liên kết cùng với epitop, như được xác định theo một hoặc nhiều thử nghiệm mảng peptit hoặc nhờ liên kết với đột biến cắt, đột biến khảm hoặc đột biến điểm được biểu hiện trên bề mặt tế bào hoặc thành phần màng, ví dụ, các thử nghiệm được bộc lộ theo sáng chế;

c) liên kết với epitop mà có ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 hoặc 20 gốc axit amin liền kề chung với epitop của một trong số các phân tử của kháng thể kháng GCC nêu trên đã được tóm tắt trong bảng 1 và bảng 2, ví dụ, các kháng thể lai của thỏ (ví dụ, MIL-44-148-2);

d) liên kết với vùng GCC của người mà được liên kết bởi kháng thể kháng GCC theo sáng chế, trong đó, ví dụ, vùng ngoại bào hoặc vùng bào chất, có chiều dài từ 10 đến 15, 10 đến 20, 20 đến 30, hoặc 20 đến 40 gốc, và liên kết được xác định, ví dụ, bằng liên kết với đột biến cắt; Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC liên kết với vùng ngoại bào của GCC của người. Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC có thể liên kết với phần GCC của người của miền ngoại bào được xác định bởi các gốc axit amin 24 đến 420 của SEQ ID NO: 3. Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC có thể liên kết với vị trí guanylat xyclaza đặc trưng tại các gốc axit amin 931 đến 954 của SEQ ID NO: 3; hoặc

e) liên kết với epitop tham chiếu được bộc lộ theo sáng chế.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC liên kết với trình tự GCC là ILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLS (SEQ ID NO: 8).

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC liên kết với trình tự GCC là FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID NO: 9).

Theo một phương án, phân tử của kháng thể liên kết với epitop biến dạng. Theo các phương án khác, phân tử của kháng thể liên kết với epitop mạch thẳng.

Các phân tử của kháng thể kháng GCC có thể là các kháng thể đa dòng, các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đặc hiệu đơn, các kháng thể khảm (xem US 6,020,153) hoặc các kháng thể được làm giống như kháng thể của người hoặc các đoạn kháng thể hoặc các chất dẫn xuất của chúng. Các biến thể tổng hợp và đã được xử lý về mặt di truyền (xem US 6,331,415) của kháng thể bất kỳ trong số các dạng nêu trên cũng được dự tính bởi sáng chế. Các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra theo nhiều kỹ thuật, bao gồm hệ

phương pháp kháng thể đơn dòng chuột đồng thông thường (ví dụ, kỹ thuật lai dưỡng bào tiêu chuẩn của Kohler và Milstein, *Nature* 256: 495 (1975); nói chung, xem: Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies: *A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y), và công nghệ kháng thể đơn dòng của thỏ và dịch vụ được cung cấp bởi Epitomics (Burlingame, CA) mà tạo ra các kháng thể đơn dòng của thỏ theo yêu cầu (RabMAbs®) bằng cách sử dụng thể lai thỏ-thỏ đã được tạo ra bằng cách dung hợp các tế bào B phân lập được từ thỏ đã được gây miễn dịch bằng dòng tế bào đối tác dung hợp thích hợp của Epitomics, như đã được bộc lộ trong US 7,402,409, US 7,429,487, US 7,462,697, US 7,575,896, US 7,732,168, và US 8,062,867, mỗi tài liệu được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Việc gây miễn dịch bằng protein, ví dụ, GCC hoặc phần hòa tan, hoặc protein dung hợp chứa phần GCC (ví dụ, hGCC(ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII (pLKTOK108), hoặc các tế bào hoặc các phân đoạn màng của nó, ví dụ, các tế bào biểu hiện GCC được để lộ ra trên bề mặt hoặc một phần của chúng (ví dụ, sản phẩm pLKTOK4), có thể được thực hiện với chất sinh miễn dịch được chuẩn bị để tiêm theo cách gây ra đáp ứng, ví dụ, với tá dược, ví dụ, tá dược Freund đầy đủ. Các tá dược thích hợp khác bao gồm tá dược Titermax Gold® (CYTRX Corporation, Los Angeles, Calif.) và phèn. Chất sinh miễn dịch peptit nhỏ có thể được liên kết với phân tử lớn hơn, như hemoxyanin của hà. Chuột nhắt hoặc thỏ có thể được tiêm theo nhiều cách, ví dụ, dưới da, qua đường tĩnh mạch hoặc tiêm bắp ở nhiều vị trí, ví dụ, trong màng bụng (i.p.), gốc đuôi, hoặc lòng bàn chân, hoặc các vị trí kết hợp, ví dụ, trong màng bụng và gốc đuôi (BIP). Các liều tiêm tăng cường có thể chứa cùng một chất sinh miễn dịch hoặc chất sinh miễn dịch khác và còn có thể chứa tá dược, ví dụ, tá dược Freund không đầy đủ. Việc gây miễn dịch bằng ADN, ví dụ, ADN mã hóa GCC hoặc phần của nó hoặc protein dung hợp chứa GCC hoặc phần của nó (ví dụ, mã hóa hGCC(ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII) có thể được tiêm bằng cách áp dụng công nghệ súng bắn gen. Ví dụ, ADN được nạp vào các phần tử vàng cực nhỏ và được tiêm vào chuột nhắt hoặc thỏ cách nhau một thời gian ngắn.

Nói chung, nếu muốn có kháng thể đơn dòng, thì tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào thích hợp thu được từ dòng tế bào sống liên tục (ví dụ, dòng tế bào u tủy như SP2/0, P3X63Ag8.653 hoặc u tủy khác loại) với tế bào tạo ra kháng thể. Các tế bào tạo ra kháng thể có thể thu được từ máu ngoại biên hoặc, tốt hơn là lá lách hoặc hạch bạch

huyết của người, động vật chuyển gen bằng kháng người thể hoặc động vật thích hợp khác (ví dụ, thỏ) được gây miễn dịch bằng kháng nguyên đáng quan tâm. Các tế bào tạo ra các kháng thể có nguồn gốc từ người (ví dụ, kháng thể của người) có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp, ví dụ, phương pháp dung hợp tế bào để tạo ra kháng thể của người và u tủy khác loại hoặc thể ba, hoặc cố định tế bào B được hoạt hóa của người thông qua việc lây nhiễm virut Epstein Barr. (ví dụ, xem US 6,197,582 (cấp cho Trakht); Niedbala et al., *Hybridoma*, 17:299-304 (1998); Zanella et al., *J Immunol Methods*, 156:205-215 (1992); Gustafsson et al., *Hum Antibodies Hybridomas*, 2:26-32 (1991).) Các tế bào tạo ra kháng thể dung hợp hoặc được làm bất tử (thể lai) có thể được phân lập bằng cách sử dụng điều kiện nuôi cấy chọn lọc, và tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn. Các tế bào mà tạo ra các kháng thể có tính đặc hiệu mong muốn có thể được xác định bằng cách áp dụng thử nghiệm thích hợp (ví dụ, ELISA (ví dụ, với chất sinh miễn dịch, ví dụ, hGCC(ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII, được cố định trên giếng của đĩa vi chuẩn) hoặc bằng FACS trên tế bào biểu hiện GCC hoặc phần của nó, ví dụ, tế bào biểu hiện sản phẩm pLKTOK4). Ví dụ, nếu GCC-chất sinh miễn dịch chứa gốc dung hợp là chất phản ứng ái lực, thì gốc này có thể cho phép protein dung hợp chứa GCC hoặc phần của chúng được liên kết với ma trận, ví dụ, các đĩa vi chuẩn hoặc chip thử nghiệm được phủ protein G, được phủ streptaviđin, được tạo dẫn xuất glutathion - hoặc được phủ kháng thể, mà sau đó được kết hợp với huyết thanh miễn dịch hoặc môi trường đã được xử lý sơ bộ thu được từ tế bào lai hoặc tế bào tái tổ hợp biểu hiện kháng thể, và hỗn hợp này được ủ trong các điều kiện cho phép tạo ra phức (ví dụ, trong điều kiện vật lý về muối và độ pH). Sau khi ủ, các tế bào trong các giếng của đĩa vi chuẩn hoặc chip được rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết bất kỳ và mức độ liên kết bởi kháng thể kháng GCC được đo.

Theo các phương án, để ứng dụng nhằm điều trị bệnh, các kháng thể theo sáng chế là các kháng thể được làm giống như kháng thể của người. Ưu điểm của các kháng thể được làm giống như kháng thể của người là ở chỗ chúng làm giảm hoặc loại trừ một cách có hiệu quả tính sinh miễn dịch của kháng thể ở vật chủ nhận, nhờ đó cho phép tăng độ sinh khả dụng và làm giảm khả năng phản ứng miễn dịch bất lợi, do đó cho phép sử dụng có hiệu quả nhiều kháng thể.

Các kháng thể được cải biến bao gồm các kháng thể được làm giống như kháng thể của người, kháng thể khảm hoặc kháng thể ghép CDR. Đáp ứng của kháng thể của người kháng chuột (HAMA) đã dẫn đến sự phát triển các kháng thể khảm hoặc theo cách khác các kháng thể được làm giống như kháng thể của người. Trong khi các kháng thể khảm có vùng ổn định của người và vùng thay đổi không phải của người, mong đợi rằng sẽ quan sát thấy các đáp ứng chế phẩm chứa kháng thể khảm kháng người (HACA), đặc biệt là khi sử dụng kháng thể lâu dài mạn tính hoặc nhiều liều. Sự có mặt của các protein có nguồn gốc không phải của người (ví dụ, chuột đồng, chuột to, thỏ, cừu hoặc dê) có thể dẫn tới sự thanh thải nhanh các kháng thể hoặc có thể dẫn tới việc bệnh nhân sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng thể. Để tránh việc sử dụng các kháng thể có nguồn gốc không phải của người, các kháng thể được làm giống như kháng thể của người mà các trình tự được đưa vào trình tự kháng thể để tạo ra nó gần với trình tự kháng thể của người, hoặc các kháng thể hoàn toàn của người được tạo ra bằng cách đưa chức kháng thể của người vào loài không phải là người, như chuột nhắt, chuột to, thỏ, cừu hoặc dê, đã được phát triển sao cho các loài không phải của người sẽ tạo ra các kháng thể có trình tự hoàn toàn của người. Các kháng thể của người tránh được một số vấn đề liên quan đến các kháng thể có vùng thay đổi và/hoặc vùng ổn định của thỏ, động vật gặm nhấm, cừu hoặc dê.

Kỹ thuật làm cho giống như của người và biểu hiện và cải biến đối với kháng thể

Các phân tử của kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người có thể làm giảm đến mức tối thiểu phản ứng sinh miễn dịch và dị ứng nội sinh với mAb không phải của người hoặc mAb có nguồn gốc không phải của người và do đó, làm tăng hiệu quả và độ an toàn của các kháng thể được sử dụng. Việc sử dụng các phân tử của kháng thể được làm giống như kháng thể của người có thể mang lại lợi ích đáng kể trong việc điều trị các bệnh mạn tính và tái phát ở người, như bệnh viêm, bệnh tự miễn, và bệnh ung thư, mà cần sử dụng lặp lại kháng thể.

Việc tạo ra các kháng thể được làm giống như kháng thể của người với mức độ sinh miễn dịch giảm có thể được hoàn thành liên quan đến các kỹ thuật làm giống như kháng thể của người và các kỹ thuật biểu hiện bằng cách sử dụng các thư viện thích hợp. Cần phải nhận thấy rằng các kháng thể từ các loài không phải người, như chuột nhắt, chuột to, thỏ, cừu, dê, v.v., có thể được làm giống như kháng thể của người hoặc được làm giống

như kháng thể của động vật linh trưởng bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem: Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) và Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12125-168 (1992). Kháng thể đáng quan tâm có thể được xử lý theo các kỹ thuật sử dụng ADN tái tổ hợp để thay thế miền CH1, CH2, CH3, miền bản lề, và/hoặc khung hoạt động bằng trình tự của người tương đương (xem WO 92/02190 và US 5,530,101, US 5,585,089, US 5,693,761, US 5,693,792, US 5,714,350, và US 5,777,085). Ngoài ra, việc sử dụng ADN bổ trợ Ig để xây dựng gen globulin miễn dịch khảm là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Liu et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:3439 (1987) và *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). ARN thông tin được phân lập từ tế bào lai hoặc tế bào khác để tạo ra kháng thể và sử dụng để tạo ra ADN bổ trợ: ADN bổ trợ đáng quan tâm có thể được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeaza bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu (US 4,683,195 và US 4,683,202).

Theo cách khác, công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn (ví dụ, xem: McCafferty et al, *Nature*, 348:552-553 (1990)) có thể được dùng để tạo ra các kháng thể của người hoặc các kháng thể từ các loài khác, cũng như các đoạn kháng thể *in vitro*, từ gen miền thay đổi (V) globulin miễn dịch, ví dụ, từ kho thu được từ người cho không được gây miễn dịch. Theo kỹ thuật này, gen miền V kháng thể được tách dòng giữ nguyên khung thành gen protein vỏ lớn hoặc nhỏ của thể thực khuẩn dạng sợi, như M13 hoặc fd, và thể hiện ở dạng các đoạn kháng thể chức năng trên bề mặt của hạt thực khuẩn. Vì hạt dạng sợi chứa bản sao ADN sợi đơn của hệ gen thể thực khuẩn, việc chọn lọc trên cơ sở các tính chất chức năng kháng thể cũng dẫn đến việc chọn lọc gen mã hóa kháng thể thể hiện các đặc tính này. Do đó, thể thực khuẩn bắt chước một số trong số các tính chất của tế bào B. Việc biểu hiện thể thực khuẩn có thể được thực hiện ở nhiều dạng; về tổng quan, ví dụ, xem: Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571 (1993). Vài nguồn đoạn V-gen có thể được dùng để biểu hiện thể thực khuẩn. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) phân lập mảng đa dạng chứa các kháng thể kháng oxazolon lấy từ thư viện hỗn hợp ngẫu nhiên cỡ nhỏ của gen V thu được từ lá lách của chuột nhắt được gây miễn dịch. Kho gen V lấy từ người cho là người không được gây miễn dịch có thể được xây dựng và các kháng thể cho mảng đa dạng chứa các kháng nguyên (bao gồm tự kháng nguyên) có thể được phân lập chủ yếu theo các kỹ thuật được mô tả bởi Marks và các đồng tác giả, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), hoặc Griffith và các đồng tác giả,

EMBO J., 12:725-734 (1993). Xem US 5,565,332 và US 5,573,905. Thư viện biểu hiện có thể chứa các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên chứa các kháng thể mà chứa trình tự axit amin nhân tạo. Ví dụ, thư viện này có thể chứa các đoạn Fab mà chứa CDR nhân tạo (ví dụ, trình tự axit amin ngẫu nhiên) và các vùng khung của người. (Ví dụ, xem: US 6,300,064 (cấp cho Knappik và các đồng tác giả)).

Các trình tự của gen vùng ổn định người có thể là tìm thấy trong: Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H. publication no. 91-3242. Gen vùng C của người là các dòng đã biết sẵn có. Việc lựa chọn isotyp sẽ được chỉ dẫn bởi tác dụng hoặc chức năng mong muốn, như cố định bổ thể, hoặc hoạt tính độc đối với tế bào phụ thuộc kháng thể. Các kiểu tương đương có thể là IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Theo các phương án cụ thể, phân tử của kháng thể theo sáng chế là IgG1 và IgG2. Chuỗi nhẹ của vùng ổn định của người, kapa hoặc lamda, có thể được sử dụng. Sau đó, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như kháng thể của người được biểu hiện theo các phương pháp thông thường.

Theo một số phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể dẫn độc tính đối với tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) đến tế bào biểu hiện GCC, ví dụ, tế bào của khối u. Các kháng thể có các kiểu tương đương IgG1 và IgG3 là hữu dụng để tạo ra chức năng cảm ứng trong khả năng độc đối với tế bào phụ thuộc kháng thể, do chúng có khả năng liên kết với thụ thể Fc. Các kháng thể có kiểu tương đương IgG2 và IgG4 là hữu dụng để giảm đến mức tối thiểu đáp ứng ADCC do chúng ít có khả năng liên kết với thụ thể Fc. Theo các phương án thay thế liên quan về vùng Fc hoặc các thay đổi về glycosyl hóa, dược phẩm chứa kháng thể, ví dụ, bằng cách sinh trưởng trong dòng tế bào nhân chuẩn được cải biến, có thể được tạo ra để làm tăng khả năng của các thụ thể Fc khi nhận biết, liên kết, và/hoặc khiến tạo ra độc tính đối với các tế bào mà các kháng thể kháng GCC liên kết với (ví dụ, xem US 7,317,091, 5,624,821 và WO 00/42072, Shields, et al. *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazar et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 103:4005-4010 (2006), Satoh et al. *Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006)). Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể có nguồn gốc từ người, kháng thể của người) có thể bao gồm việc thay thế axit amin hoặc thay thế mà làm thay đổi hoặc biến đổi chức năng (ví dụ, chức năng cảm ứng). Ví dụ, vùng ổn định có nguồn gốc từ người (ví dụ, vùng ổn định γ1, vùng ổn định γ2) có thể

được thiết kế để làm giảm sự hoạt hóa bổ thể và/hoặc việc liên kết thụ thể Fc. (Ví dụ xem US 5,648,260 (cấp cho Winter và các đồng tác giả), US 5,624,821 (cấp cho Winter và các đồng tác giả) và US 5,834,597 (cấp cho Tso và các đồng tác giả), toàn bộ phần bộc lộ của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Tốt hơn, nếu trình tự axit amin của vùng ổn định có nguồn gốc từ người mà chứa các thay thế hoặc thay đổi axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95% với toàn bộ chiều dài của trình tự axit amin của vùng ổn định không bị thay đổi có nguồn gốc từ người, tốt hơn nữa nếu tương đồng ít nhất khoảng 99% với toàn bộ chiều dài của trình tự axit amin của vùng ổn định không bị biến đổi có nguồn gốc từ người.

Theo phương án khác nữa, các chức năng cảm ứng cũng có thể bị thay đổi bằng cách điều biến kiểu glycosyl hóa kháng thể. Làm thay đổi có nghĩa là loại bỏ một hoặc nhiều gốc hyđrat cacbon tìm thấy trong kháng thể, và/hoặc bổ sung một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa mà không có mặt trong kháng thể vào. Ví dụ, các kháng thể có hoạt tính ADCC tăng cường có cấu trúc hyđrat cacbon trưởng thành mà thiếu fucoza gắn vào vùng Fc của kháng thể được bộc lộ trong US 2003/0157108 (cấp cho Presta). Xem thêm US 2004/0093621 (cấp cho Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Glycofi cũng đã phát triển các dòng tế bào nấm men có khả năng tạo ra các dạng glyco đặc hiệu của các kháng thể.

Ngoài ra, hoặc theo cách khác, kháng thể có thể được tạo ra mà có kiểu glycosyl hóa bị thay đổi, như kháng thể hypofucosyl hóa có số lượng các gốc fucosyl bị làm giảm hoặc kháng thể có cấu trúc GlcNac cắt đôi gia tăng. Các kiểu glycosyl hóa bị thay đổi đã thể hiện là làm tăng khả năng ADCC của các kháng thể. Các cải biến hyđrat cacbon này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách biểu hiện kháng thể trong tế bào của vật chủ có cơ chế glycosyl hóa bị thay đổi. Các tế bào có cơ chế glycosyl hóa bị thay đổi đã được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được dùng làm các tế bào của vật chủ, trong đó chúng được xử lý để biểu hiện tái tổ hợp các kháng thể theo sáng chế để nhờ đó tạo ra kháng thể có glycosyl hóa bị thay đổi. Ví dụ, EP 1,176,195 cấp cho Hang và các đồng tác giả mô tả dòng tế bào có gen FUT8 bị phá vỡ về mặt chức năng, mà mã hóa fucosyl transferaza, sao cho các kháng thể được biểu thị theo dòng tế bào này biểu thị sự hypofucosyl hóa. WO 03/035835 của Presta mô tả biến thể dòng tế bào CHO, tế bào Lec13, có ái lực giảm khi gắn kết fucoza với hyđrat cacbon đã liên kết Asn(297), cũng gây ra sự hypofucosyl hóa đối với các kháng thể được biểu thị theo tế bào của vật chủ

(xem cả: Shields, R. L. et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Công bố đơn PCT số WO 99/54342 của Umana và các đồng tác giả mô tả các dòng tế bào được xử lý để biểu hiện glycoprotein-cải biến glycosyl transferaza (ví dụ, beta(1,4)-N axetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) sao cho các kháng thể được biểu thị theo các dòng tế bào đã được xử lý biểu thị các cấu trúc GlcNac cắt đôi gia tăng mà dẫn đến hoạt tính ADCC gia tăng của các kháng thể (xem cả tài liệu: Umana et al., 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Các kháng thể được làm giống như kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách áp dụng phương thức ghép CDR. Các kỹ thuật tạo ra các kháng thể này được làm giống như kháng thể của người là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nói chung, các kháng thể được làm giống như kháng thể của người được tạo ra bằng cách lấy các trình tự axit nucleic mà mã hóa các trình tự chuỗi nặng của vùng thay đổi và chuỗi nhẹ của vùng thay đổi của kháng thể mà liên kết với GCC, xác định vùng xác định bổ trợ hay "CDR" trong các trình tự chuỗi nặng của vùng thay đổi và chuỗi nhẹ của vùng thay đổi và ghép các trình tự axit nucleic CDR vào các trình tự axit nucleic khung của người. (Ví dụ, xem US 4,816,567 và US 5,225,539). Vị trí các CDR và các gốc khung có thể được xác định (xem: Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, và Chothia, C. et al. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Các phân tử của kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế có các trình tự axit amin CDR và các trình tự axit nucleic mã hóa CDR được liệt kê trong bảng 5 và bảng 6. Theo một số phương án, các trình tự nêu trong bảng 5 và bảng 6 có thể được đưa vào các phân tử mà nhận biết GCC để dùng trong các phương pháp điều trị hoặc chẩn đoán bệnh được bộc lộ theo sáng chế. Khung hoạt động người được chọn là loại mà thích hợp với việc sử dụng *in vivo*, nghĩa là nó không biểu thị tính sinh miễn dịch. Ví dụ, quyết định này có thể được tạo ra nhờ kinh nghiệm trước đó với việc sử dụng *in vivo* các kháng thể này và các nghiên cứu về mức độ tương đồng về trình tự axit amin. Vùng khung thích hợp có thể được chọn từ kháng thể có nguồn gốc từ người có mức độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất khoảng 65%, và tốt hơn nếu mức độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất khoảng 70%, 80%, 90% hoặc 95% so với chiều dài của vùng khung trong trình tự axit amin của phần tương đương (ví dụ, vùng khung) của kháng thể của người cho, ví dụ, phân tử của kháng

thể kháng GCC (ví dụ, 3G1). Mức độ tương đồng về trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán sắp thẳng hàng trình tự axit amin thích hợp, như CLUSTAL W, bằng cách sử dụng các thông số mặc định. (Thompson J. D. et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).)

Một khi các CDR và FR của kháng thể tách dòng mà được làm giống như của người được xác định, các trình tự axit amin mã hóa các CDR được xác định và các trình tự tương ứng axit nucleic được ghép lên FR đã được chọn của người. Điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi và các nhóm liên kết đã biết, việc chọn chúng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Toàn bộ CDR của kháng thể của người cụ thể có thể được thế bằng ít nhất một phần của CDR không phải của người hoặc chỉ một vài trong số các CDR có thể được thế bằng CDR không phải của người. Chỉ cần thay thế số lượng CDR liền kề để liên kết kháng thể đã được làm giống như kháng thể của người với kháng nguyên định trước. Sau khi các CDR được ghép lên FR của người được chọn, các trình tự chuỗi nặng của vùng thay đổi và chuỗi nhẹ của vùng thay đổi "đã được làm giống như của người" thu được được biểu hiện để tạo ra Fv được làm giống như trình tự của người hoặc kháng thể được làm giống như kháng thể của người mà liên kết với GCC. Tốt hơn, nếu CDR-ghép (ví dụ, kháng thể được làm giống như kháng thể của người) liên kết với protein GCC với ái lực tương tự với, hầu như giống với, hoặc tốt hơn ái lực của kháng thể của người cho. Nói chung, các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của vùng thay đổi được làm giống như trình tự của người được biểu hiện ở dạng protein dung hợp với vùng các trình tự ổn định người sao cho thu được kháng thể nguyên vẹn mà liên kết với GCC. Tuy nhiên, kháng thể Fv được làm giống như trình tự của người có thể được tạo ra mà không chứa trình tự cố định.

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các kháng thể được làm giống như kháng thể của người, trong đó các axit amin đặc hiệu đã được thế, loại bỏ hoặc đã được bổ sung vào. Cụ thể, các kháng thể được làm giống như kháng thể của người có thể có thay thế axit amin trong vùng khung, như để cải thiện liên kết với kháng nguyên. Ví dụ, một số ít gốc khung nhận được chọn của chuỗi globulin miễn dịch được làm giống như các gốc của người có thể được thế bằng axit amin cho tương ứng. Vị trí của các thay thế bao gồm các gốc axit amin liền kề với CDR, hoặc gốc axit amin có khả năng tương tác với CDR (ví dụ, xem US 5,585,089 hoặc 5,859,205). Khung hoạt động nhận có thể là trình tự khung

hoặc trình tự liên ứng của kháng thể trưởng thành của người. Thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này "trình tự liên ứng" chỉ trình tự thường tìm được nhất, hoặc lấy từ các gốc thông thường nhất ở mỗi vị trí trong trình tự trong vùng trong các thành viên nhóm có liên quan. Có sẵn nhiều trình tự liên ứng của kháng thể của người, kể cả các trình tự liên ứng đối với các phân nhóm khác nhau của các vùng thay đổi người (xem: Kabat, E. A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Dữ liệu Kabat và ứng dụng của nó vốn có sẵn trực tuyến, ví dụ, thông qua IgBLAST tại National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md. (xem cả tài liệu: Johnson, G. and Wu, T. T., *Nucleic Acids Research* 29:205-206 (2001)).

Các kỹ thuật khác để làm các kháng thể giống như kháng thể của người được bộc lộ trong EP 519596 A1 của Padlan và các đồng tác giả, công bố 23/12/1992.

Phân tử của kháng thể kháng GCC bao gồm các kháng thể khác được làm giống như kháng thể của người mà còn có thể được cải biến bằng cách loại bỏ đặc hiệu các epitop tế bào T của người hoặc "loại miễn dịch" theo các phương pháp đã bộc lộ trong WO 98/52976 và WO 00/34317, nội dung của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Một cách vắn tắt, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các vùng thay đổi của kháng thể kháng GCC của thỏ, hoặc các loài khác không phải của người, có thể được phân tích đối với các peptit mà liên kết với MHC Nhóm II; các peptit này thể hiện epitop tiềm năng của tế bào T. Để phát hiện epitop tiềm năng của tế bào T, phương thức lên mẫu bằng máy tính gọi là "tạo chuỗi peptit" có thể được áp dụng, và ngoài ra, cơ sở dữ liệu về MHC Nhóm II của người liên kết peptit có thể được tra cứu về các motif có mặt trong trình tự VH và VL của thỏ, như đã được bộc lộ trong WO 98/52976 và WO 00/34317. Các motif này liên kết với alotyp bất kỳ trong số 18 alotyp MHC Nhóm II DR cơ bản, và do đó tạo ra epitop tiềm năng của tế bào T. Các epitop tiềm năng của tế bào T được phát hiện có thể được loại bỏ bằng cách thay thế một số lượng nhỏ các gốc axit amin trong các vùng thay đổi, hoặc tốt hơn là loại bỏ bằng cách thay thế đơn axit amin. Đến mức có thể, việc thay thế bảo toàn được thực hiện, nhưng thường không độc quyền, axit amin thường ở vị trí ở các trình tự dòng mầm kháng thể của người có thể được sử dụng. Các trình tự dòng mầm của người được bộc lộ trong Tomlinson, I. A. et al., *J. Mol. Biol.* 227:776-798 (1992); Cook, G. P. et al., *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242 (1995); Chothia, D. et al., *J. Mol. Bio.*

227:799-817 (1992). Danh mục V BASE là danh mục đầy đủ gồm các trình tự vùng thay đổi globulin miễn dịch của người (do Tomlinson, I. A. và các đồng tác giả, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK, biên tập). Sau khi bị gây mất khả năng gây miễn dịch, VH và VL của kháng thể kháng GCC được xây dựng bằng cách gây đột biến gen VH và VL của thỏ, trình tự thay đổi bị đột biến có thể, tùy ý, được dung hợp với vùng ổn định của người, ví dụ, IgG1 của người hoặc các vùng ổn định K (kapa).

Theo các phương án khác, việc làm giảm đáp ứng sinh miễn dịch bằng kháng thể ghép CDR có thể đạt được nhờ sự thay đổi, ví dụ, loại bỏ, thay thế, các gốc axit trong CDR (Kashmiri et al. *Methods* 36:25-34 (2005), US 6,818,749, Tan et al. *J. Immunol.* 169:1119-1125 (2006)). Ví dụ, các gốc ở vị trí liên quan đến việc tiếp xúc với kháng nguyên, tốt hơn là không bị thay đổi. Nói chung, các gốc này, tính đặc hiệu xác định các gốc (SDR), nằm ở vị trí mà biểu hiện mức độ biến thiên cao trong số các kháng thể. Các trình tự liên ứng được lấy, ví dụ, bằng phương pháp Clustal (Higgins D. G. et al., *Meth. Enzymol.* 266:383-402 (1996)), từ các phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, từ các kháng thể được bộc lộ theo sáng chế, hỗ trợ trong việc xác định SDR. Trong các phân tử của kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế, SDR là như sau, ít nhất gốc thứ nhất hoặc theo một số phương án, bốn gốc thứ nhất thuộc chuỗi nặng CDR1; ít nhất phần đầu tận cùng N, ví dụ, bảy, mười hoặc 13 gốc thứ nhất của chuỗi nặng CDR2; gần như tất cả các chuỗi nặng CDR3; phần đầu tận cùng C, ví dụ, sau sáu, tám, hoặc chín gốc của chuỗi nhẹ CDR1; khoảng gốc thứ nhất, ở giữa và/hoặc cuối cùng của chuỗi nhẹ CDR2; và hầu hết chuỗi nhẹ CDR3, hoặc ít nhất sau hai hoặc ba gốc. Do đó, để duy trì liên kết với protein GCC, sau quá trình làm giống như kháng thể của người hoặc cải biến phân tử của kháng thể kháng GCC, các gốc SDR trong CDR của các phân tử của kháng thể kháng GCC sẽ không cần phải thay đổi, ví dụ, từ các gốc của thỏ thành các gốc liên ứng của người hơn là các gốc trong các gốc khác của các CDR hoặc các vùng khung. Ngược lại, có thể là có lợi nếu thay đổi các gốc trong CDR không phải của người, ví dụ, CDR của thỏ thành các gốc đã được xác định là liên ứng ở CDR của người, ví dụ, CDR của các phân tử của kháng thể kháng GCC đã được bộc lộ trong US 20110110936, nội dung của nó được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Các kháng thể kháng GCC mà không phải là các kháng thể nguyên vẹn cũng là hữu dụng theo sáng chế. Các kháng thể này có thể thu được từ kháng thể bất kỳ trong số các

kháng thể nêu trên. Phân tử của kháng thể hữu dụng thuộc loại này bao gồm (i) đoạn Fab, đoạn hóa trị một chứa các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) đoạn $F(ab')_2$, đoạn hóa trị hai chứa hai đoạn Fab được liên kết bằng cầu đisulfua trên vùng bản lề; (iii) đoạn Fd chứa miền VH và CH1; (iv) đoạn Fv chứa miền VL và VH của một nhánh của kháng thể, (v) đoạn dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)), mà chứa miền VH; (vii) kháng thể chuỗi nặng chức năng miền đơn, mà chứa miền VHH (còn được gọi là đoạn kháng thể thiếu chuỗi nhẹ) ví dụ xem, Cortez-Retamozo, et al., *Cancer Res.* 64: 2853-2857 (2004), và các tài liệu trích dẫn trong đó; và (vii) CDR phân lập được, ví dụ, một hoặc nhiều CDR phân lập được cùng với khung hoạt động đầy đủ để tạo ra đoạn liên kết kháng nguyên. Hơn thế nữa, mặc dù hai miền của đoạn Fv, VL và VH, mã hóa bởi gen riêng biệt, chúng có thể được liên kết, bằng cách áp dụng các phương pháp tái tổ hợp, nhờ nhóm liên kết tổng hợp mà cho phép chúng được tạo ra ở dạng một mạch protein, trong đó vùng VL và vùng VH ghép đôi để tạo ra các phân tử hóa trị một (còn được gọi là chuỗi đơn Fv (scFv); ví dụ xem: Bird et al. *Science* 242:423-426 (1988); và Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988). Các kháng thể đơn chuỗi này cũng dự tính được bao hàm trong thuật ngữ "liên kết đoạn kháng nguyên" của kháng thể. Các đoạn này của kháng thể thu được bằng cách áp dụng các kỹ thuật thông thường mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, và các đoạn được thử nghiệm để sử dụng theo cùng cách đó ở dạng các kháng thể nguyên vẹn. Các đoạn kháng thể như Fv, $F(ab')_2$ và Fab có thể được điều chế bằng cách phân cắt protein nguyên vẹn, ví dụ, bằng cách phân cắt bằng proteaza hoặc theo phương pháp hóa học.

Theo các phương án, một số hoặc toàn bộ trình tự CDR, của một hoặc cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, có thể được dùng trong phân tử khác của kháng thể, ví dụ, trong phân tử của kháng thể CDR-ghép, phân tử của kháng thể được làm giống như kháng thể của người, hoặc phân tử của kháng thể khảm.

Phương án bao gồm phân tử của kháng thể mà chứa đủ CDR, ví dụ, tất cả sáu CDR thu được từ một kháng thể trong số các kháng thể lai của thỏ được bộc lộ theo sáng chế để cho phép liên kết với GCC bề mặt của tế bào.

Theo một phương án, các CDR, ví dụ, toàn bộ HCDR, hoặc toàn bộ LCDR, hoặc tất cả sáu CDR, được gắn vào vùng khung của người hoặc vùng khung lấy từ người. Các ví dụ về các vùng khung của người bao gồm trình tự khung dòng mầm của người, các

trình tự dòng mầm của người mà đã thành thục về ái lực (*in vivo* hoặc *in vitro*), hoặc trình tự của người tổng hợp, ví dụ, trình tự liên ứng. Theo một phương án, khung hoạt động chuỗi nặng là khung hoạt động IgG1 hoặc IgG2. Theo một phương án, khung hoạt động chuỗi nhẹ là khung hoạt động kapa.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, kháng thể ghép CDR hoặc phân tử của kháng thể được làm giống như kháng thể của người, chứa đủ CDR, ví dụ, tất cả sáu CDR từ một trong số các kháng thể được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, các trình tự liệt kê trong Bảng 5, để cho phép liên kết với GCC. (Các trình tự axit nucleic làm ví dụ mà có thể mã hóa các trình tự axit amin CDR liệt kê trong Bảng 5, được nêu trong Bảng 6 ở đây). Theo các phương án cụ thể, phân tử của kháng thể kháng GCC có thể chứa các CDR từ MIL-44-148-2 hoặc MIL-44-67-4.

Đoạn kháng thể để điều trị hoặc chẩn đoán *in vivo* có thể có lợi ích do các cải biến mà cải thiện thời gian bán hủy trong huyết thanh. Các gốc hữu cơ thích hợp nhằm để tăng thời gian bán thải *in vivo* trong huyết thanh của kháng thể có thể bao gồm gốc có một, hai hoặc nhiều mạch thẳng hoặc mạch nhánh được chọn từ nhóm polyme ưa nước (ví dụ, polyme mạch thẳng hoặc mạch nhánh (ví dụ, polyalkan glycol như polyetylen glycol, monometoxy-polyetylen glycol và tương tự), hyđrat cacbon (ví dụ, đextran, xenluloza, polysacarit và tương tự), polyme của axit amin ưa nước (ví dụ, polylysin, polyaspartat và chất tương tự), polyalkan oxit và polyvinyl pyroliđon), nhóm axit béo (ví dụ, axit mono-carboxylic hoặc axit đi-carboxylic), nhóm este của axit béo, nhóm lipit (ví dụ, nhóm điaxylglyxerol, nhóm sphingolipit (ví dụ, xeramiđyl)) hoặc nhóm phospholipit (ví dụ, nhóm phosphatiđyl etanolamin). Tốt hơn, nếu gốc hữu cơ liên kết với vị trí định trước mà ở đó gốc hữu cơ không ảnh hưởng đến chức năng (ví dụ, làm giảm ái lực liên kết kháng nguyên) của thể tiếp hợp miễn dịch thu được so với gốc kháng thể không tiếp hợp. Gốc hữu cơ có thể có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 500Da đến 50.000Da, tốt hơn là khoảng 2000Da, 5000Da, 10.000Da hoặc 20.000Da. Ví dụ và các phương pháp để cải biến các polypeptit, ví dụ, các kháng thể, bằng các gốc hữu cơ có thể được tìm thấy, ví dụ, trong US 4,179,337 và US 5,612,460, WO 95/06058 và WO 00/26256, và US 20030026805.

Phân tử của kháng thể kháng GCC có thể chứa toàn bộ, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên vùng thay đổi, của một hoặc cả hai, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, của một trong số các kháng thể lai nêu trên của thỏ.

Theo một phương án, trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong mục (a) có thể khác biệt so với một trình tự trong số trình tự axit amin quy chiếu nêu ở mục (a)(i-ii) nhiều đến 1 gốc, 2 gốc, 3 gốc, 4 gốc, 5 gốc, 10 gốc, hoặc 15 gốc. Theo các phương án, sự khác biệt này là các thay thế bảo toàn. Theo các phương án, sự khác biệt này là ở trong các vùng khung. Theo một phương án, trình tự axit amin chuỗi nặng nêu ở mục (b) có thể khác biệt so với một trình tự trong số các trình tự axit amin quy chiếu nêu ở mục (b)(i-ii) nhiều đến 1 gốc, 2 gốc, 3 gốc, 4 gốc, 5 gốc, 10 gốc, hoặc 15 gốc. Theo các phương án, sự khác biệt này là các thay thế bảo toàn. Theo các phương án, sự khác biệt này là ở trong các vùng khung.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC chứa một hoặc cả hai:

(a) trình tự axit amin chuỗi nhẹ của toàn bộ, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên, của (i) vùng thay đổi của trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong Bảng 3, ví dụ, SEQ ID NO:13, hoặc (ii) vùng thay đổi của axit amin chuỗi nhẹ được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong Bảng 4, ví dụ, SEQ ID NO:12; và

(b) trình tự axit amin chuỗi nặng của toàn bộ, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên, của (i) vùng thay đổi của trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong Bảng 3, ví dụ, SEQ ID NO:11, hoặc (ii) trình tự axit amin chuỗi nặng được mã hóa bởi trình tự nucleotit nêu trong Bảng 4, ví dụ, SEQ ID NO:10.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC chứa một hoặc cả hai:

a) vùng thay đổi của chuỗi nhẹ, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, có mức độ tương đồng ít nhất 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% so với vùng thay đổi của chuỗi nhẹ phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế; và

(b) vùng thay đổi của chuỗi nặng, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, có mức độ tương đồng ít nhất 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% so với vùng thay đổi của chuỗi nặng của phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế.

Các trình tự axit amin của các vùng thay đổi của các kháng thể kháng GCC theo sáng chế có thể được tìm thấy trong Bảng 3.

Theo một phương pháp, các trình tự liên ứng mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các vùng J có thể được dùng để thiết kế các oligonucleotit để làm các đoạn mồi nhằm đưa vị trí cắt giới hạn hữu dụng vào vùng J đối với liên kết tiếp theo của đoạn vùng V với đoạn vùng C của người. ADN bổ trợ của vùng C có thể được cải biến bằng cách đột biến định hướng điểm để đặt vị trí cắt giới hạn vào vị trí tương tự trong trình tự của người.

Các vectơ biểu hiện bao gồm plasmit, retrovirut, cosmit, YAC, episom có nguồn gốc từ EBV, và các nhóm tương tự. Vectơ thuận tiện là vectơ mà mã hóa trình tự globulin miễn dịch CH hoặc CL đầy đủ về mặt chức năng của người, trong đó vị trí cắt giới hạn thích hợp được xử lý sao cho trình tự VH hoặc VL bất kỳ có thể dễ được chèn và biểu hiện. Trong vectơ này, việc cắt ghép thường xảy ra giữa điểm cho lát cắt trong vùng J được chèn và điểm nhận lát cắt nằm trước vùng C của người, và cũng ở các vùng cắt mà xuất hiện bên trong exon CH người. Các vectơ biểu hiện thích hợp có thể chứa nhiều thành phần, ví dụ, điểm gốc bản sao, gen đánh dấu chọn lọc, một hoặc nhiều yếu tố kiểm soát biểu hiện, như phiên mã yếu tố kiểm soát (ví dụ, trình tự khởi đầu, gen tăng cường, các gen kết thúc) và/hoặc một hoặc nhiều tín hiệu dịch mã, trình tự tín hiệu hoặc trình tự mở đầu, và các yếu tố tương tự. Việc kết thúc polyađenyl hóa và phiên mã xảy ra ở vị trí nhiễm sắc thể nguyên thể nằm sau vùng mã hóa. Kháng thể khảm thu được có thể được nối với trình tự khởi đầu mạnh bất kỳ. Các ví dụ về các vectơ thích hợp mà có thể được sử dụng bao gồm vectơ thích hợp đối với vật chủ là động vật có vú và trên cơ sở hệ sao chép virut, như virut simian 40 (SV40), virut sacôm Rous (RSV), adenovirut 2, virut u nhú bò (BPV), thể đột biến papovavirut BK (BKV), hoặc xytomegalovirut của chuột và của người (CMV), và virut gây bệnh bạch cầu ở chuột moloney (MMLV), các gen khởi đầu Ig nguyên thể, v.v.. Nhiều loại vectơ thích hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các vectơ mà được duy trì ở dạng một bản sao hoặc nhiều bản sao, hoặc được tích hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào của vật chủ, ví dụ, thông qua LTR, hoặc thông qua nhiễm sắc thể nhân tạo được xử lý bởi nhiều điểm tích hợp (Lindenbaum et al. *Nucleic Acids Res.* 32:e172 (2004), Kennard et al. *Biotechnol. Bioeng. Online* May 20, 2009). Các ví dụ khác về các vectơ thích hợp được liệt kê trong phần sau.

Do đó, sáng chế đề xuất vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể (ví dụ, kháng thể được làm giống như kháng thể của người, kháng thể khảm hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ trong số kháng thể này), mạch của kháng thể (ví dụ, chuỗi nặng, chuỗi nhẹ) hoặc phần liên kết kháng nguyên của mạch của kháng thể mà liên kết với protein GCC.

Sự biểu hiện trong tế bào của vật chủ nhân chuẩn là hữu dụng vì các tế bào này có khả năng hơn các tế bào không nhân trong việc tập hợp và tiết kháng thể gấp nếp và có hoạt tính miễn dịch học thích hợp. Tuy nhiên, kháng thể bất kỳ được tạo ra mà bị làm bất hoạt do sự gấp nếp không phù hợp có thể lấy lại các đặc tính vốn có theo các phương pháp đã biết (Kim and Baldwin, "*Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding*", *Ann. Rev. Biochem.* 51, pp. 459-89 (1982)). Có thể là các tế bào của vật chủ sẽ tạo ra các phần của các kháng thể nguyên vẹn, như đime của chuỗi nhẹ hoặc đime của chuỗi nặng, mà cũng là chất tương đồng kháng thể theo sáng chế.

Hơn nữa, như được bộc lộ theo sáng chế, các kháng thể hoặc các kháng thể thu được từ người hoặc các loài không phải người có thể được tạo ra thông qua các kỹ thuật kiểu biểu hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn, biểu hiện retro virut, biểu hiện ribosom, và các kỹ thuật khác, bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và các phân tử thu được có thể là đối tượng để làm cho thành thục tiếp, như thành thục về ái lực, vì các kỹ thuật đó là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) và Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12125-168 (1992), Hanes and Plucthau *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (biểu hiện ở ribosom), Parmley and Smith *Gene* 73:305-318 (1988) (biểu hiện ở thể thực khuẩn), Scott TIBS 17:241-245 (1992), Cwirla et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378-6382 (1990), Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty TIBTECH 10:80-84 (1992), và US 5,733,743. Nếu các kỹ thuật biểu hiện được áp dụng để tạo ra các kháng thể mà không phải là kháng thể của người, thì các kháng thể này có thể được làm giống như kháng thể của người như nêu trên.

Cần phải thấy rằng các kháng thể mà được tạo ra không cần có ngay một isotyp cụ thể mong muốn nhưng, đúng hơn là, kháng thể như được tạo ra có thể có isotyp bất kỳ.

Ví dụ, kháng thể tạo ra bởi thể lai MIL-44-148-2 của thỏ có isotyp IgG. Sau đó, isotyp của kháng thể này có thể được thay đổi, ví dụ, thành IgG2, hoặc IgG3 để tạo ra đáp ứng ADCC khi kháng thể này liên kết với GCC trên tế bào, bằng cách áp dụng các kỹ thuật thông thường mà là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này bao gồm việc áp dụng các kỹ thuật tái tổ hợp trực tiếp (ví dụ, xem US 4,816,397), các kỹ thuật dung hợp tế bào (ví dụ, xem US 5,916,771), trong số nhiều tài liệu khác. Theo kỹ thuật dung hợp tế bào, u tủy hoặc dòng tế bào khác được tạo ra mà có chuỗi nặng có isotyp mong muốn bất kỳ và dòng tế bào u tủy khác hoặc dòng tế bào khác được tạo ra mà có chuỗi nhẹ. Sau đó, các tế bào này có thể dung hợp và dòng tế bào biểu hiện kháng thể nguyên vẹn có thể được phân lập.

Theo các phương án nhất định, phân tử của kháng thể GCC là kháng thể IgG1 kháng GCC của thỏ. Vì các kháng thể này có liên kết mong muốn với phân tử GCC, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này có thể dễ được thay đổi isotyp để tạo ra isotyp khác trong khi vẫn giữ được vùng thay đổi của nó (mà xác định tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể, ở một mức độ nhất định). Do đó, để kháng thể ứng viên được tạo ra mà sẽ đáp ứng thuộc tính "kết cấu" mong muốn như nêu trên, chúng có thể thường được tạo ra mà có ít nhất một số thuộc tính "kết cấu" mong muốn thông qua việc thay đổi isotyp.

Theo một phương án, vùng thay đổi hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng có thể được liên hợp với vùng ổn định (hoặc đoạn của chúng) mà không phải là vùng ổn định đã được tạo ra, ví dụ, với vùng ổn định (hoặc đoạn của nó) thu được từ kháng thể khác hoặc với vùng ổn định tổng hợp (hoặc đoạn của nó). Theo các phương án, vùng ổn định là vùng ổn định IgG1 hoặc IgG2 (hoặc đoạn của nó). Sự thay đổi trình tự có thể được tạo ra trong các vùng thay đổi hoặc ổn định để điều chỉnh hoạt tính cảm ứng của phân tử của kháng thể.

Thiết kế và tạo ra các phép điều trị bệnh khác

Các kháng thể mà được tạo ra và được xác định tính chất ở đây liên quan đến GCC sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc thiết kết phương thức điều trị bệnh khác, bao gồm các kháng thể khác, các chất đối kháng khác, hoặc các gốc hóa học khác với các kháng thể. Phương thức này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể có hoạt tính liên kết hoặc chức năng tương tự, phép điều trị bệnh tiên tiến bằng cách dùng kháng thể, như

các kháng thể đặc hiệu kép, các thể tiếp hợp miễn dịch, và phép điều trị bệnh bằng cách đánh dấu đồng vị phóng xạ, việc tạo ra phép điều trị bệnh bằng peptit, đặc biệt là bằng thể nhân, và các phân tử nhỏ. Hơn thế nữa, như nêu trên, chức năng cảm ứng của các kháng thể theo sáng chế có thể thay đổi do sự thay đổi isotyp thành IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE, hoặc IgM cho nhiều ứng dụng điều trị bệnh khác nhau.

Liên quan đến các kháng thể đặc hiệu kép, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra sẽ bao gồm (i) hai kháng thể, một có tính đặc hiệu với GCC và kháng thể khác có tính đặc hiệu với phân tử thứ hai mà được tiếp hợp cùng với nhau, (ii) kháng thể đơn có một mạch đặc hiệu với GCC và mạch thứ hai đặc hiệu với phân tử thứ hai, hoặc (iii) kháng thể chuỗi đơn có tính đặc hiệu với GCC và phân tử khác. Các kháng thể đặc hiệu kép này có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các kỹ thuật mà là đã biết. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách liên kết ngang hai hoặc nhiều kháng thể (có cùng kiểu hoặc kiểu khác nhau). Các nhóm liên kết ngang thích hợp bao gồm các nhóm có hai nhóm chức khác loại, có hai các nhóm phản ứng riêng biệt được phân cách bởi phần tử đệm thích hợp (ví dụ, este m-maleimiđobenzoyl-N-hyđroxysucxinimit) hoặc hai nhóm chức giống nhau (ví dụ, đisucxinimiđyl suberat). Các nhóm liên kết này được Pierce Chemical Company, Rockford, Ill cung cấp trên thị trường. Ví dụ, xem cả tài liệu: Fanger et al. *Immunomethods* 4:72-81 (1994) và Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) và Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12125-168 (1992) và liên quan đến (iii), chẳng hạn, xem tài liệu: Traunecker et al. *Int. J. Cancer* (Suppl.) 7:51-52 (1992). Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992).

Ngoài ra, "các thể theo Kapa" (Ill. et al. "*Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions*" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), "các thể mini" (Martin et al. *EMBO J.* 13:5303-9 (1994), US 5,837,821), "các nhị thể" (Holliger et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448 (1993)), hoặc "Janusins" (Traunecker et al. *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) và Traunecker et al. *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)) cũng có thể được tạo ra.

Axit nucleic và các polypeptit

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit và các trình tự polypeptit mà mã hóa hoặc thể hiện phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế. Các polynucleotit này mã hóa cả vùng biến đổi và vùng cố định của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mặc dù các cách kết hợp khác cũng được dự tính bởi các tác giả sáng chế tùy theo các dược phẩm theo sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm các đoạn oligonucleotit thu được từ polynucleotit và các trình tự axit nucleic bổ trợ cho các polynucleotit này.

Các polynucleotit có thể ở dạng ARN hoặc ADN. Polynucleotit ở dạng ADN, ADN bổ trợ, ADN hệ gen, các chất tương tự axit nucleic và ADN tổng hợp đều nằm trong phạm vi của sáng chế. ADN có thể là sợi đôi hoặc sợi đơn, và nếu nó là sợi đơn, có thể là chuỗi mã hóa (dịch mã) hoặc chuỗi không mã hóa (không dịch mã). Trình tự mã hóa mà mã hóa polypeptit có thể là tương đồng với trình tự mã hóa theo sáng chế hoặc có thể là trình tự mã hóa khác với trình tự ghi mã, là do sự dư thừa hoặc thoái biến mã gen, mã hóa cùng polypeptit như ADN theo sáng chế.

Theo các phương án được đề xuất, polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng thay đổi của chuỗi nặng và ít nhất một vùng thay đổi của chuỗi nhẹ theo sáng chế, ví dụ, đã được tóm tắt trong Bảng 4.

Sáng chế còn bao gồm các biến thể polynucleotit chứa các cải biến như polynucleotit loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung, và các cải biến polypeptit bất kỳ thu được từ biến thể trình tự polynucleotit. Polynucleotit theo sáng chế còn có thể có trình tự mã hóa mà là biến thể của trình tự mã hóa theo sáng chế. Ví dụ, biến thể polynucleotit có thể có mức độ tương đồng ít nhất là 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 97% với polynucleotit liệt kê trong Bảng 4. Theo các phương án, biến thể polynucleotit này mã hóa cho phân tử của kháng thể kháng GCC.

Sáng chế còn đề xuất các polypeptit biểu thị các kháng thể theo sáng chế cũng như các đoạn, các chất tương tự và các chất dẫn xuất của các polypeptit này. Các polypeptit theo sáng chế có thể là polypeptit tái tổ hợp, các polypeptit được tạo ra tự nhiên hoặc các polypeptit tổng hợp. Các đoạn, dẫn xuất hoặc các chất tương tự của polypeptit theo sáng chế có thể là loại mà một trong số đó, một hoặc nhiều gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin bảo toàn hoặc không phải là bảo toàn (tốt hơn là gốc axit amin bảo toàn) và gốc

axit amin được thế này có thể hoặc không thể là gốc axit amin được mã hóa bởi mã gen; hoặc nó có thể là loại mà trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin bao gồm phần tử thế; hoặc nó có thể là loại mà trong đó polypeptit được dung hợp với hợp chất khác, như hợp chất để kéo dài thời gian bán thải của polypeptit (ví dụ, polyetylen glycol); hoặc nó có thể là loại mà trong đó các axit amin bổ sung được dung hợp với polypeptit, như trình tự dẫn đầu hoặc trình tự kích thích tiết hoặc trình tự mà được dùng để tinh chế polypeptit hoặc trình tự proprotein. Các đoạn, các chất dẫn xuất và các chất tương tự này đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo các khía cạnh khác nhau, các polypeptit theo sáng chế có thể là sản phẩm đã được tinh chế một phần, hoặc tinh khiết.

Polypeptit theo sáng chế có thể có trình tự axit amin tương đồng với trình tự axit amin của các kháng thể được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, được tóm tắt trong bảng 2 hoặc bảng 3, hoặc có trình tự axit amin khác nhau ở các thay đổi nhỏ do một hoặc nhiều axit amin thay thế. Thay đổi này có thể là "thay đổi bảo toàn", thường nằm trong khoảng 1 đến 5 axit amin, trong đó axit amin được thế có các đặc điểm cấu trúc hoặc tính chất hóa học tương tự, ví dụ, thay thế leuxin bằng isoleuxin hoặc threonin bằng serin; thay thế lysin bằng arginin hoặc histiđin. Trái lại, các thay đổi có thể bao gồm các thay đổi không bảo toàn, ví dụ, thay thế glyxin bằng tryptophan. Các thay đổi nhỏ tương tự có thể còn bao gồm việc loại bỏ axit amin hoặc cài xen hoặc cả hai. Hướng dẫn để xác định nhiều gốc axit amin nào và như thế nào có thể được thế, cài xen, hoặc loại bỏ mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học hoặc miễn dịch học của chúng có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, phần mềm ADNSTAR (ADNSTAR, Inc., Madison, Wis.).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các axit nucleic phân lập được và/hoặc tái tổ hợp mã hóa các phân tử của kháng thể kháng GCC. Theo các phương án, các axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều phân tử của kháng thể của chuỗi nặng, chuỗi nhẹ, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ, vùng thay đổi của chuỗi nặng, các phần của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế (ví dụ, vùng thay đổi của đoạn chuỗi nhẹ mà khi ghép cặp với vùng thay đổi có chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng là liên kết kháng nguyên, hoặc vùng thay đổi của đoạn chuỗi nặng mà khi ghép cặp với vùng thay đổi có chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ là liên kết kháng nguyên), và CDR. Các phương án bao gồm các axit nucleic được đặt vào vectơ, ví dụ, vectơ biểu hiện. Hơn thế nữa, sáng

chế bao hàm phân tử của kháng thể được tạo ra bởi các tế bào của vật chủ, ví dụ, phân tử của kháng thể biểu hiện được mã hóa bởi các plasmit này.

Theo một phương án, vectơ được đề xuất, ví dụ, vectơ biểu hiện, chứa một hoặc cả hai:

trình tự mã hóa vùng thay đổi của chuỗi nhẹ, ví dụ, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ đã được bộc lộ trong Bảng 3, ví dụ, trình tự được liệt kê trong Bảng 4, đoạn liên kết kháng nguyên của nó, hoặc một, hai hoặc ba CDR lấy từ chuỗi nhẹ (và tùy ý vùng khung), được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, CDR được bộc lộ trong Bảng 5, ví dụ CDR mã hóa trình tự nêu trong Bảng 6; và

trình tự mã hóa vùng thay đổi của chuỗi nặng, ví dụ, vùng thay đổi của chuỗi nặng đã được bộc lộ trong Bảng 3, ví dụ, trình tự được liệt kê trong Bảng 4, đoạn liên kết kháng nguyên của nó, hoặc một, hai hoặc ba CDR lấy từ chuỗi nặng (và tùy ý vùng khung), được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, CDR được bộc lộ trong Bảng 5, ví dụ, CDR mã hóa trình tự nêu trong Bảng 6.

Theo các phương án được đề xuất, polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng thay đổi của chuỗi nặng hoặc ít nhất một vùng thay đổi của chuỗi nhẹ của các kháng thể theo sáng chế. Theo các phương án được đề xuất, các polypeptit có thể mã hóa ít nhất một vùng thay đổi của chuỗi nặng và một vùng thay đổi của chuỗi nhẹ của các kháng thể theo sáng chế.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC chứa một hoặc cả hai:

(a) vùng thay đổi của chuỗi nhẹ, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, mã hóa bởi axit nucleic mà lai trong điều kiện nghiêm ngặt với, (i) bổ thể của phân tử của kháng thể kháng GCC-ghi mã-trình tự axit nucleic được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, trong Bảng 4, hoặc (ii) trình tự axit nucleic bất kỳ mà mã hóa chuỗi nhẹ của phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, một trong số các kháng thể nêu trên của thỏ được tóm tắt trong bảng 1 và bảng 2; và

(b) vùng thay đổi của chuỗi nặng, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, mã hóa bởi axit nucleic lai trong điều kiện nghiêm ngặt với, (i) bổ thể của phân tử của kháng thể kháng GCC-ghi mã-trình tự axit nucleic được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, trong Bảng 4, hoặc (ii) trình tự axit nucleic bất kỳ mà mã hóa chuỗi nặng của phân tử của kháng thể

kháng GCC theo sáng chế, ví dụ, một trong số các kháng thể nêu trên của thỏ được tóm tắt trong bảng 1 và bảng 2.

Theo một phương án, điều kiện nghiêm ngặt được chọn là các điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc các điều kiện rất nghiêm ngặt, ví dụ, các điều kiện được bộc lộ theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất các vectơ chứa polynucleotit theo sáng chế, các tế bào của vật chủ mà được xử lý về mặt di truyền bằng các vectơ theo sáng chế và sản xuất các kháng thể theo sáng chế bằng các kỹ thuật tái tổ hợp.

Trình tự ADN thích hợp có thể được cài xen vào vectơ này theo rất nhiều quy trình. Nói chung, trình tự ADN được cài xen vào vị trí endonucleaza giới hạn nhất định theo các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trình tự polynucleotit trong vectơ biểu hiện được liên kết linh hoạt với trình tự đối chứng biểu hiện thích hợp (nghĩa là trình tự khởi đầu) để tổng hợp ARN thông tin theo cách trực tiếp. Các ví dụ về các gen khởi đầu này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut sacôm Rous LTR hoặc trình tự khởi đầu SV40 sớm hoặc muộn, *E. coli* lac hoặc trp, trình tự khởi đầu thể thực khuẩn lamda P_L và các gen khởi đầu khác đã biết để kiểm soát sự biểu hiện của gen ở các tế bào có nhân nguyên thủy (ví dụ, tac, T3, T7 các gen khởi đầu đối với *E. coli*) hoặc tế bào nhân chuẩn (ví dụ, trình tự khởi đầu xytomegalovirut, trình tự khởi đầu muộn adenovirut, gen khởi đầu EF-1a) hoặc virut chứa chúng. Vectơ biểu hiện còn chứa vị trí liên kết ribosom để khơi mào sự dịch mã và các gen kết thúc phiên mã. Vectơ này còn có thể chứa các trình tự thích hợp để khuếch đại sự biểu hiện. Ví dụ, vectơ này có thể chứa gen tăng cường, mà là các trình tự ADN kích thích sự phiên mã có nguồn gốc virut, như trình tự thu được từ virut ở khỉ như SV40, polyoma virut, xytomegalovirut, virut u nhú ở bò hoặc virut sacôm Moloney, hoặc hệ gen, điểm gốc. Tốt hơn, nếu vectơ này còn chứa điểm gốc sao chép. Vectơ này có thể được xây dựng để chứa điểm gốc sao chép ngoại sinh hoặc, điểm gốc sao chép này có thể thu được từ SV40 hoặc nguồn virut khác, hoặc bởi cơ chế sao chép của nhiễm sắc thể của tế bào của vật chủ.

Ngoài, các vectơ tùy ý chứa gen đánh dấu để chọn lọc các tế bào của vật chủ đã được chuyển nhiễm như gen đánh dấu đihyđrofolat ređuctaza để cho phép chọn lọc metotrexat trong nhiều vật chủ, hoặc thuốc kháng sinh, như gen beta-lactamaza (kháng

ampixilin), gen Tet (để kháng tetraxyclin) được dùng trong các tế bào có nhân nguyên thủy hoặc neomyxin, GA418 (genetixin, một dẫn xuất của neomyxin) gpt (axit mycophenolic), ampixilin, hoặc gen kháng hygromyxin, hoặc gen bổ trợ cho tổn thương gen của các tế bào vật chủ như sự không có mặt của thymiđin kinaza, hypoxanthin phosphoribosyl transferaza, đihyđrofolat ređuctaza, v.v.. Gen mã hóa sản phẩm gen chứa gen đánh dấu dinh dưỡng thụ động của vật chủ (ví dụ, LEU2, URA3, HIS3) thường được dùng làm các gen đánh dấu có thể chọn lọc trong nấm men.

Để thu được các kháng thể theo sáng chế, một hoặc nhiều trình tự polynucleotit mà mã hóa các vùng thay đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và các vùng cố định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể theo sáng chế cần được đưa vào vectơ. Các trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể theo sáng chế có thể được đưa vào một hoặc nhiều vectơ và sau đó được đưa vào các tế bào của vật chủ .

Các vectơ biểu hiện thích hợp để biểu hiện ở tế bào của các động vật có vú bao gồm, ví dụ, pCDM8, pcDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, Calif.), pCDEF3 (Goldman, L. A., et al., *Biotechniques*, 21:1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GIBCO division of Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.), pEF-Bos (Mizushima, S., et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (19900)), vectơ retro Bicistronic GPEX® (Gala Biotech, Middleton, Wis.) và vectơ tương tự. Các vectơ biểu hiện thích hợp để sử dụng trong các vật chủ biểu hiện khác, như các tế bào có nhân nguyên thủy (*E. coli*), các tế bào của côn trùng (tế bào *Drosophila* Schnieder S2, Sf9) và nấm men (*P. metanolica, P. pastoris, S. cerevisiae*) cũng có sẵn. Các vectơ làm ví dụ là pLKTOK58 (trình tự kiểu thông thường IgG1 Fc) và pLKTOK59 (trình tự đột biến IgG1 Fc) (xem US 20060147445).

Cần phải hiểu rằng, các kháng thể theo sáng chế có thể được biểu hiện ở các dòng tế bào không phải là dòng tế bào lai. Các trình tự mã hóa ADN bổ trợ hoặc các dòng hệ gen đối với các kháng thể cụ thể có thể được sử dụng đối với các tế bào của vật chủ của động vật có vú hoặc động vật không có vú thích hợp. Việc biến nạp có thể được thực hiện theo phương pháp đã biết bất kỳ để đưa polynucleotit vào tế bào của vật chủ, bao gồm, ví dụ, gói polynucleotit trong virut (hoặc trong vectơ virut) và tải nạp tế bào của vật chủ với virut (hoặc vectơ) hoặc theo các quy trình chuyển nhiễm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật

này, để đưa các polynucleotit khác loài vào tế bào của các động vật có vú, ví dụ, chuyển nhiễm do đextran thực hiện, làm kết tủa canxi phosphat, chuyển nhiễm do polybren thực hiện, dung hợp thể plasmon, xung điện, bao nang polynucleotit trong các liposom và nạp trực tiếp phân tử ADN vào tế bào. Quy trình chuyển hóa này được áp dụng tùy theo vật chủ cần được biến nạp. Các phương pháp đưa các polynucleotit khác loài vào tế bào của các động vật có vú là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuyển nhiễm do đextran thực hiện, làm kết tủa canxi phosphat, chuyển nhiễm do polybren thực hiện, dung hợp thể plasmon, xung điện, bắn hạt, bao nang (các) polynucleotit trong các liposom, các thể tiếp hợp peptit, các polyme tổng hợp dạng cây, và nạp trực tiếp ADN vào nhân.

Theo khía cạnh khác, sáng chế bao gồm tế bào của vật chủ chứa axit nucleic được bộc lộ theo sáng chế. Theo các phương án, tế bào này biểu hiện phân tử của kháng thể, hoặc thành phần của nó, bộc lộ theo sáng chế. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra phân tử của kháng thể, ví dụ, phân tử của kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, phân tử của kháng thể của thỏ, hoặc được làm giống như kháng thể của phiên bản người của nó, bao gồm việc duy trì tế bào của vật chủ trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện, nhờ đó chuỗi globulin miễn dịch được biểu hiện và phân tử của kháng thể được tạo ra. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào của vật chủ chứa vectơ bất kỳ trong số các vectơ biểu hiện nêu trên mã hóa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Tế bào của vật chủ có thể là tế bào nhân chuẩn, ví dụ, tế bào của động vật có vú, tế bào của côn trùng, tế bào của nấm men, hoặc tế bào có nhân nguyên thủy, ví dụ, *E. coli*. Ví dụ, tế bào của động vật có vú có thể là tế bào được nuôi cấy hoặc dòng tế bào. Tế bào làm ví dụ của các động vật có vú bao gồm các dòng tế bào bạch huyết (ví dụ, NS0), tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO), các tế bào COS. Theo phương án cụ thể, tế bào của vật chủ nuôi cấy là tế bào CHO chứa các trình tự axit nucleic mã hóa phân tử của kháng thể MIL-44-148-2. Theo phương án khác, tế bào của vật chủ là tế bào lai MIL-44-148-2 (PTA-8132). Ngoài ra, các tế bào bao gồm tế bào noãn bào, và các tế bào lấy từ động vật chuyển gen, ví dụ, tế bào biểu mô của động vật có vú. Ví dụ, các axit nucleic mã hóa phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế có thể được biểu hiện trong động vật chuyển gen không phải là người.

Các dòng tế bào của động vật có vú sẵn có để làm vật chủ nhằm biểu hiện là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm nhiều dòng tế bào đã được làm bất tử sẵn có từ American Type Culture Collection (ATCC), bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào buồng trứng (CHO) của chuột đồng, tế bào NSO, các tế bào HeLa, tế bào thận của chuột đồng bào tử (BHK), tế bào thận của khỉ (COS), tế bào ung thư biểu mô của tế bào gan của người (ví dụ, Hep G2), và nhiều dòng tế bào khác. Các tế bào không phải là của động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vi khuẩn, nấm men, côn trùng, và thực vật cũng có thể được dùng để biểu hiện tái tổ hợp các kháng thể. Sự đột biến hướng điểm của miền CH2 kháng thể để loại bỏ glycosyl hóa có thể được ưu tiên để ngăn ngừa các thay đổi về tính sinh miễn dịch, dược động học, và/hoặc các chức năng cảm ứng sinh ra từ việc glycosyl hóa không phải của người. Các phương pháp biểu hiện được chọn bằng cách xác định hệ nào sẽ tạo ra mức độ biểu hiện cao nhất và tạo ra các kháng thể có đặc tính liên kết GCC cơ định.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, phân tử của kháng thể của thỏ hoặc phiên bản được làm giống như của người của chúng, bao gồm việc duy trì tế bào của vật chủ chứa các axit nucleic được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, một hoặc nhiều axit nucleic trình tự được liệt kê trong Bảng 4 hoặc Bảng 6, trong các điều kiện thích hợp với sự biểu hiện của globulin miễn dịch, nhờ đó chuỗi globulin miễn dịch được biểu hiện và phân tử của kháng thể, ví dụ, phân tử của kháng thể của thỏ, hoặc phiên bản được làm giống như của người của chúng, mà liên kết với GCC, hoặc đoạn hoặc các biến thể của chúng, được tạo ra. Ví dụ, các phương pháp biểu hiện phân tử của kháng thể bao gồm việc sử dụng các tế bào của vật chủ trong đó phân tử axit nucleic tái tổ hợp thứ nhất mã hóa phân tử của kháng thể, ví dụ, chuỗi nhẹ của kháng thể của thỏ hoặc phiên bản được làm giống như phiên bản của người của chúng, và phân tử axit nucleic tái tổ hợp thứ hai mã hóa phân tử của kháng thể, ví dụ, chuỗi nặng của kháng thể của thỏ hoặc phiên bản được làm giống như phiên bản của người của chúng, thuộc một vectơ biểu hiện cơ định. Theo các phương án khác, chúng là các vectơ riêng biệt. Phương pháp này còn có thể bao gồm bước phân lập hoặc thu hồi kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể, mạch của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của mạch của kháng thể, nếu muốn.

Ví dụ, phân tử axit nucleic (nghĩa là một hoặc nhiều phân tử axit nucleic) mã hóa các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của kháng thể của thỏ (hoặc được làm giống như kháng thể của người) mà liên kết với protein GCC, hoặc cấu trúc biểu hiện (nghĩa là một hoặc nhiều cấu trúc) chứa phân tử axit nucleic này, có thể được đưa vào tế bào của vật chủ thích hợp để tạo ra tế bào của vật chủ tái tổ hợp bằng cách áp dụng phương pháp bất kỳ thích hợp đối với tế bào của vật chủ được chọn (ví dụ, biến nạp, chuyển nhiễm, xung điện, gây nhiễm), sao cho phân tử axit nucleic được liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều yếu tố kiểm soát sự biểu hiện (ví dụ, trong vectơ, trong cấu trúc được tạo ra theo các quy trình trong tế bào, tích hợp vào hệ gen của tế bào của vật chủ). Tế bào của vật chủ tái tổ hợp thu được có thể được duy trì trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện (ví dụ, với sự có mặt của chất cảm ứng, ở động vật thích hợp không phải là người, trong môi trường nuôi cấy thích hợp có bổ sung muối, yếu tố sinh trưởng, thuốc kháng sinh, chất bổ sung dinh dưỡng, v.v. thích hợp), nhờ đó tạo ra polypeptit mã hóa. Nếu muốn, protein mã hóa có thể được phân lập hoặc thu hồi (ví dụ, từ động vật, tế bào của vật chủ, môi trường, sữa). Quy trình này bao gồm sự biểu hiện trong tế bào của vật chủ của động vật chuyển gen không phải là người (ví dụ, xem: WO 92/03918, GenPharm International) hoặc thực vật.

Hơn nữa, sự biểu hiện các kháng thể theo sáng chế (hoặc các gốc khác từ đó) từ các dòng tế bào tạo ra có thể được tăng cường bằng cách áp dụng nhiều kỹ thuật đã biết. Ví dụ, glutamin synthetaza và hệ biểu hiện gen DHFR là các cách thức thông thường để làm gia tăng mức độ biểu hiện trong một số điều kiện. Các dòng tế bào biểu hiện ở mức độ cao có thể được xác định bằng cách áp dụng các kỹ thuật thông thường, như tách dòng pha loãng hạn chế, công nghệ Microdrop, hoặc các phương pháp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hệ GS được bàn luận một cách đầy đủ hoặc một phần trong EP 0216846, EP 0256055, và EP0323997 và EP 89303964.4.

Trong hệ làm ví dụ để biểu hiện tái tổ hợp kháng thể được cải biến, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, vectơ biểu hiện tái tổ hợp mã hóa cả chuỗi nặng của kháng thể và chuỗi nhẹ của kháng thể được đưa vào các tế bào dhfr-CHO bằng cách chuyển nhiễm do canxi phosphat gây ra. Bên trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp này, mỗi gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được liên kết linh hoạt với yếu tố điều hòa tăng cường/trình tự khởi đầu (ví dụ, thu được từ SV40, CMV, ađenovirut và yếu tố tương tự, như yếu tố điều hòa gen tăng cường CMV/trình tự khởi đầu AdMLP hoặc

yếu tố điều hòa gen tăng cường SV40/trình tự khởi đầu AdMLP) để dẫn đến sự phiên mã gen ở mức độ cao. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp này còn mang gen DHFR, mà cho phép chọn lọc các tế bào CHO mà đã được chuyển nhiễm với vectơ này bằng cách áp dụng phép chọn lọc/khuếch đại bằng metotrexat. Các tế bào của vật chủ biến nạp đã chọn được nuôi cấy để cho phép biểu hiện kháng thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và kháng thể nguyên vẹn được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn được dùng để tạo ra vectơ biểu hiện tái tổ hợp này, chuyển nhiễm các tế bào của vật chủ, chọn lọc các thể biến nạp, nuôi cấy các tế bào của vật chủ và thu hồi kháng thể từ môi trường nuôi cấy này.

Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra theo cách chuyển gen thông qua việc tạo ra động vật có vú hoặc thực vật mà là chuyển gen đối với các trình tự globulin miễn dịch của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đáng quan tâm và sự tạo ra kháng thể ở dạng có thể thu hồi từ đó. Liên quan đến việc chuyển gen ở các động vật có vú, các kháng thể có thể được tạo ra trong, và thu hồi từ sữa dê, bò, hoặc các động vật có vú khác. Ví dụ, xem US 5,827,690, US 5,756,687, US 5,750,172, và US 5,741,957.

Các kháng thể, liên kết các đoạn kháng nguyên, mạch của kháng thể và các phần liên kết kháng nguyên của chúng được bộc lộ theo sáng chế cũng có thể được tạo ra trong hệ biểu hiện thích hợp *in vitro*, bằng cách tổng hợp theo phương pháp hóa học hoặc theo phương pháp thích hợp khác.

Các protein dung hợp và các thể tiếp hợp miễn dịch

Các kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế có thể được liên kết về mặt chức năng theo phương pháp thích hợp bất kỳ (ví dụ, liên hợp hóa học, dung hợp di truyền, liên hợp không cộng hóa trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều phân tử không phải là kháng thể.

Các protein dung hợp có thể được tạo ra, trong đó phân tử của kháng thể kháng GCC như được bộc lộ theo sáng chế và gốc không phải là kháng thể là các thành phần của một chuỗi polypeptit liên tục. Gốc không phải là kháng thể có thể nằm ở đầu tận cùng N, đầu C, hoặc bên trong, so với gốc kháng thể. Ví dụ, theo một số phương án, nó có thể được tạo ra bằng cách chèn axit nucleic mã hóa các trình tự globulin miễn dịch vào vectơ biểu hiện thích hợp, như vectơ pET (ví dụ, pET-15b, Novagen), vectơ thể thực khuẩn (ví dụ,

pCNATAB 5 E, Pharmacia), hoặc vectơ khác, ví dụ, vectơ dung hợp Protein A pRIT2T, Pharmacia). Cấu trúc thu được có thể được biểu hiện để tạo ra mạch của kháng thể mà chứa gốc không phải là kháng thể (ví dụ, dấu histiđin, dấu E, hoặc miền liên kết IgG Protein A). Các protein dung hợp có thể được phân lập hoặc thu hồi bằng cách áp dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, như sắc ký bằng cách sử dụng ma trận ái lực thích hợp (ví dụ, xem: *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M et al., eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8 (1991)).

Sáng chế đề xuất các phân tử của kháng thể kháng GCC mà được hướng đến và, theo các phương án, được nhập bào vào tế bào. Chúng có khả năng phân phối các tác nhân điều trị bệnh hoặc các tác nhân phát hiện được đến hoặc vào các tế bào biểu hiện GCC, nhưng không đến hoặc vào các tế bào không biểu hiện đích. Do đó, sáng chế còn đề xuất các thể tiếp hợp miễn dịch kháng GCC chứa phân tử của kháng thể kháng GCC như được bộc lộ theo sáng chế, mà được tiếp hợp với tác nhân điều trị bệnh hoặc tác nhân phát hiện được. Theo các phương án, ái lực với GCC của thể tiếp hợp miễn dịch kháng GCC ít nhất 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, hoặc 95% so với ái lực của kháng thể không tiếp hợp. Điều này có thể được xác định bằng cách sử dụng GCC bề mặt của tế bào hoặc GCC phân lập. Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC, ví dụ, thể tiếp hợp miễn dịch, có LD50, như được xác định theo thử nghiệm được bộc lộ theo sáng chế, nhỏ hơn 1000pM, 500pM, 250pM, 100pM, hoặc 50pM.

Phân tử của kháng thể kháng GCC có thể được cải biến để hoạt động như thể tiếp hợp miễn dịch bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, *Vitetta Immunol Today* 14:252 (1993). Xem thêm US 5,194,594. Việc tạo ra các kháng thể đánh dấu đồng vị phóng xạ cũng có thể dễ được chuẩn bị bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, Junghans et al., *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996). Xem thêm US 4,681,581, US 4,735,210, US 5,101,827, US 5,102,990 (US35,500), US5,648,471, và US5,697,902.

Theo một số phương án, phân tử của kháng thể và gốc không phải của kháng thể được liên kết bằng nhóm liên kết. Theo các phương án này, thể tiếp hợp miễn dịch được thể hiện bằng công thức (I):

$$Ab-(X-Z)_m$$

trong đó:

Ab là phân tử của kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế;

X là gốc liên kết Ab và Z, ví dụ, gốc của nhóm liên kết được bộc lộ theo sáng chế sau khi liên kết đồng hóa trị với một hoặc cả hai Ab và Z;

Z là tác nhân điều trị bệnh hoặc đánh dấu; và

m nằm trong khoảng từ 1 đến 15.

Biến m biểu thị số lượng gốc --X--Z của mỗi phân tử của kháng thể trong thể tiếp hợp miễn dịch có công thức (I). Theo các phương án khác nhau, m nằm trong khoảng từ 1 đến 15, từ 1 đến 10, từ 1 đến 9, từ 1 đến 8, từ 1 đến 7, từ 1 đến 6, từ 1 đến 5, từ 1 đến 4, từ 1 đến 3, hoặc từ 1 đến 2. Theo một số phương án, m nằm trong khoảng từ 2 đến 10, từ 2 đến 9, từ 2 đến 8, từ 2 đến 7, từ 2 đến 6, từ 2 đến 5, từ 2 đến 4 hoặc từ 2 đến 3. Theo các phương án khác, m bằng 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6. Trong các dược phẩm chứa nhiều thể tiếp hợp miễn dịch có công thức (I), m là số lượng gốc --X--Z trung bình trên mỗi Ab, còn được gọi là lượng dược chất trung bình. Lượng dược chất trung bình có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 15 gốc -X--Z trên mỗi Ab. Theo một số phương án, khi m thể hiện lượng dược chất trung bình, m là khoảng 1, khoảng 2, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5, khoảng 6, khoảng 7, hoặc khoảng 8. Theo các phương án làm ví dụ, m nằm trong khoảng từ 2 đến 8. Theo một phương án, m là khoảng 8. Theo phương án khác, m là khoảng 4. Theo phương án khác, m là khoảng 2.

Số lượng trung bình gốc --X--Z trên mỗi Ab có thể được xác định bằng cách cách thức thông thường như phổ khối, thử nghiệm ELISA, và sắc ký lỏng cao áp. Phân phối định lượng các thể tiếp hợp miễn dịch xét theo m cũng có thể được xác định. Trong một số trường hợp, việc phân lập, tinh chế, và xác định tính chất của các thể tiếp hợp miễn dịch đồng nhất, trong đó m có trị số nhất định, như được phân biệt với các thể tiếp hợp miễn dịch có lượng dược chất khác, có thể đạt được bằng cách như sắc ký lỏng cao áp pha đảo hoặc điện di.

Các thể tiếp hợp miễn dịch có công thức (I) có thể tồn tại ở dạng hỗn hợp, trong đó mỗi thành phần của hỗn hợp này có trị số m khác nhau. Ví dụ, thể tiếp hợp miễn dịch có

công thức (I) có thể tồn tại ở dạng hỗn hợp gồm hai thành phần tiếp hợp miễn dịch riêng biệt: một thành phần tiếp hợp miễn dịch, trong đó m bằng 7, và thành phần tiếp hợp miễn dịch khác, trong đó m bằng 8.

Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch có công thức (I) tồn tại ở dạng hỗn hợp bao gồm ba thể tiếp hợp miễn dịch riêng biệt, trong đó m đối với ba thể tiếp hợp miễn dịch riêng biệt lần lượt bằng 1, 2, và 3; lần lượt bằng 3, 4, và 5; lần lượt bằng 5, 6, và 7; lần lượt bằng 7, 8, và 9; lần lượt bằng 9, 10, và 11; lần lượt bằng 11, 12, và 13; hoặc lần lượt bằng 13, 14, và 15.

Nhiều loại nhóm liên kết thích hợp (ví dụ, các chất phản ứng có hai nhóm chức khác loại để liên kết phân tử của kháng thể với tác nhân điều trị bệnh hoặc tác nhân đánh dấu) và các phương pháp tạo ra các thể tiếp hợp miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. (Ví dụ xem: Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992).) Nhóm liên kết có thể bị phân cắt, ví dụ, trong các điều kiện sinh lý, ví dụ, trong điều kiện nội bào, sao cho sự phân cắt nhóm liên kết giải phóng dược chất (nghĩa là tác nhân điều trị bệnh hoặc tác nhân đánh dấu) trong môi trường nội bào. Theo các phương án khác, nhóm liên kết không bị phân cắt, và dược chất được giải phóng, ví dụ, bằng cách làm thoái biến kháng thể.

Nhóm liên kết có thể liên kết với nhóm có hoạt tính phản ứng hóa học trên gốc của kháng thể, ví dụ, với nhóm amin tự do, imin, hyđroxyl, thiol hoặc carboxyl (ví dụ, với đầu tận cùng N- hoặc C, với nhóm amin ở vị trí epsilon bao gồm một hoặc nhiều gốc lysin, nhóm axit carboxylic tự do bao gồm một hoặc nhiều gốc axit glutamic hoặc axit aspartic, hoặc với nhóm sulfhyđryl bao gồm một hoặc nhiều gốc xysteinyl). Vị trí mà nhóm liên kết liên kết có thể là gốc tự nhiên trong trình tự axit amin của gốc kháng thể hoặc nó có thể được đưa vào gốc kháng thể, ví dụ, bằng công nghệ tái tổ hợp ADN (ví dụ, bằng cách đưa vị trí phân cắt xystein hoặc proteaza trong trình tự axit amin) hoặc bằng cách sinh hóa học protein (ví dụ, khử, điều chỉnh độ pH hoặc phân giải protein).

Một trong số các phương pháp không đặc hiệu thường hay được sử dụng nhất để liên kết đồng hóa trị là phản ứng carbođiimit để liên kết nhóm carboxy (hoặc amin) của hợp chất với các nhóm amino (hoặc carboxy) của phân tử của kháng thể. Ngoài ra, các tác nhân có hai nhóm chức như đialđehyt hoặc imiđoeste đã được dùng để liên kết nhóm amin của hợp chất với các nhóm amin của phân tử của kháng thể. Phương pháp hiện có

để liên kết dược chất (nghĩa là tác nhân điều trị bệnh hoặc tác nhân đánh dấu) với phân tử của kháng thể là phản ứng bazơ Schiff. Phương pháp này bao gồm việc oxy hóa periođat dược chất mà chứa nhóm glycol hoặc hyđroxy, do đó tạo ra alđehyt mà sau đó sẽ phản ứng với phân tử của kháng thể. Việc liên kết xảy ra thông qua sự hình thành bazơ Schiff với các nhóm amin của phân tử của kháng thể. Isothioxyanat cũng có thể được dùng làm các tác nhân liên hợp để liên kết đồng hóa trị các dược chất với phân tử của kháng thể. Các kỹ thuật khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo các phương án nhất định, chất trung gian, mà là tiền chất của nhóm liên kết (X), được cho phản ứng với dược chất (Z) trong điều kiện thích hợp. Theo các phương án nhất định, các nhóm phản ứng được sử dụng trên dược chất và/hoặc chất trung gian. Sản phẩm của phản ứng giữa dược chất (nghĩa là tác nhân điều trị bệnh hoặc tác nhân đánh dấu) và chất trung gian, hoặc dược chất dẫn xuất, được cho phản ứng tiếp với phân tử của kháng thể trong điều kiện thích hợp.

Thể tiếp hợp miễn dịch có thể được tinh chế khỏi các chất phản ứng bằng cách áp dụng hệ phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ, sắc ký cột (ví dụ, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, lọc gel, sắc ký tương tác kỵ nước), lọc thẩm tách hoặc làm kết tủa. Thể tiếp hợp miễn dịch có thể được đánh giá bằng cách áp dụng hệ phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ, SDS-PAGE, phổ khối, hoặc điện di mao dẫn.

Theo một số phương án, nhóm liên kết bị phân cắt bằng tác nhân phân cắt có mặt trong môi trường nội bào (ví dụ, bên trong thể sinh tan hoặc hạt thể nhân hoặc caveolea). Nhóm liên kết có thể, ví dụ, là nhóm liên kết peptiđyl mà bị phân cắt bằng enzym peptiđaza hoặc proteaza nội bào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, proteaza thể sinh tan hoặc hạt thể nhân. Theo một số phương án, nhóm liên kết peptiđyl có độ dài ít nhất hai axit amin hoặc có độ dài ít nhất ba axit amin. Các tác nhân phân cắt có thể bao gồm cathepsin B và D và plasmin, tất cả là đã biết để thủy phân là các chất dẫn xuất dược chất dipeptit để giải phóng dược chất (nghĩa là tác nhân điều trị bệnh hoặc tác nhân đánh dấu) bên trong các tế bào đích (ví dụ xem: Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Tiêu biểu nhất là nhóm liên kết peptiđyl mà bị phân cắt bằng enzym có mặt trong tế bào biểu hiện GCC. Ví dụ, nhóm liên kết peptiđyl bị phân cắt bằng proteaza

cathepsin-B phụ thuộc vào thiol, mà được biểu hiện ở mức độ cao ở mô ung thư, có thể được sử dụng (ví dụ, nhóm liên kết Phe-Leu hoặc Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:319)). Các ví dụ khác về các nhóm liên kết này được bộc lộ, ví dụ, trong US 6,214,345, được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn và đối với mọi mục đích. Theo khía cạnh cụ thể, nhóm liên kết peptiđyl bị phân cắt bằng proteaza nội bào là nhóm liên kết Val-Cit hoặc nhóm liên kết Phe-Lys (ví dụ, xem US 6,214,345, mà mô tả quy trình tổng hợp đoxorubixin với nhóm liên kết val-cit). Một ưu điểm của cách sử dụng dược chất (nghĩa là tác nhân điều trị bệnh hoặc đánh dấu) giải phóng nhờ sự phân giải protein nội bào là ở chỗ dược chất này thường bị yếu đi khi tiếp hợp và mức độ ổn định trong huyết thanh của các thể tiếp hợp này thường cao.

Theo các phương án khác, nhóm liên kết bị phân cắt nhạy với độ pH, nghĩa là nhạy với sự thủy phân ở một số trị số độ pH. Nói chung, nhóm liên kết nhạy với độ pH có thể bị thủy phân trong các điều kiện axit. Ví dụ, nhóm liên kết không bền với axit có thể bị thủy phân trong thể sinh tan (ví dụ, hydrazon, semicarbazon, thiosemicarbazon, xis-aconitic amit, orthoeste, axetal, ketal, hoặc tương tự) có thể được sử dụng. (Ví dụ, xem US 5,122,368; US 5,824,805; US 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.) Các nhóm liên kết này là tương đối phù hợp trong điều kiện độ pH trung tính, như độ pH trong máu, nhưng không ổn định ở độ pH thấp hơn 5,5 hoặc 5,0, vốn là khoảng độ pH của thể sinh tan. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có thể bị thủy phân là nhóm liên kết thioete (ví dụ, thioete gắn vào tác nhân điều trị bệnh thông qua liên kết axylhydrazon (ví dụ, xem US 5,622,929).

Theo các phương án khác nữa, nhóm liên kết bị phân cắt trong điều kiện khử (ví dụ, liên kết đisulfua). Nhiều loại liên kết đisulfua là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, liên kết mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng SATA (N-sucxinimiđyl-5-axetylthioaxetat), SPDP (N-sucxinimiđyl-3-(2-pyriđylđithio)propionat), SPDB (N-sucxinimiđyl-3-(2-pyriđylđithio)butyrat) và SMPT (N-sucxinimiđyl-oxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-pyriđyl-đithio)toluen)-, SPDB và SMPT (ví dụ, xem: Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Xem thêm US 4,880,935).

Theo các phương án cụ thể khác nữa, nhóm liên kết là nhóm liên kết malonat (Johnson et al., 1995, *AntiCancer Res.* 15:1387-93), nhóm liên kết maleimiđobenzoyl (Lau et al., 1995, *Bioorg Med. Chem.* 3(10):1299-1304), hoặc chất tương tự 3'-N-amit (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

Theo các phương án khác nữa, đơn vị liên kết không bị phân cắt và dược chất (nghĩa là tác nhân điều trị bệnh hoặc đánh dấu) được giải phóng bằng cách làm thoái biến kháng thể. (Ví dụ, xem US 20050238649, nội dung của nó được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn).

Nói chung, nhóm liên kết hầu như không nhạy với môi trường ngoại bào. Theo sáng chế, "hầu như không nhạy với môi trường ngoại bào", trong phạm vi nhóm liên kết, có nghĩa là không nhiều hơn khoảng 20%, thường là không nhiều hơn khoảng 15%, thường không nhiều hơn khoảng 10%, và thường không nhiều hơn khoảng 5%, không nhiều hơn khoảng 3%, hoặc không nhiều hơn khoảng 1% các nhóm liên kết, trong mẫu của thể tiếp hợp miễn dịch, bị phân cắt khi thể tiếp hợp miễn dịch này có mặt trong môi trường ngoại bào (ví dụ, trong huyết tương). Việc nhóm liên kết hầu như không nhạy với môi trường ngoại bào hay không có thể được xác định, ví dụ, bằng cách ủ thể tiếp hợp miễn dịch với huyết tương trong khoảng thời gian định trước (ví dụ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 16 giờ, hoặc 24 giờ) và sau đó định lượng dược chất tự do có mặt trong huyết tương.

Theo phương án khác, không phải là các phương án loại trừ lẫn nhau, nhóm liên kết tăng cường sự nhập bào vào tế bào. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết làm tăng cường sự nhập bào vào tế bào khi đã được tiếp hợp với tác nhân điều trị bệnh hoặc đánh dấu (Z). Theo các phương án khác nữa, nhóm liên kết tăng cường sự nhập bào vào tế bào khi đã được tiếp hợp với cả gốc Z và phân tử của kháng thể kháng GCC.

Nhiều loại nhóm liên kết làm ví dụ mà có thể được dùng với các dược phẩm này và các phương pháp đã được bộc lộ trong WO 2004-010957, US 20060074008, US 20050238649, và US 20060024317 (mà nội dung của từng công bố đơn được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn và đối với mọi mục đích).

Các ví dụ về các nhóm liên kết có khả năng được dùng để liên hợp phân tử của kháng thể với tác nhân điều trị bệnh hoặc đánh dấu bao gồm, ví dụ, các nhóm liên kết maleimiđocaproyl (mc); maleimiđocaproyl-p-aminobenzylcarbamat; maleimiđocaproyl-

peptit-aminobenzylcarbamat, ví dụ, maleimiđocaproyl-L-phenylalanin-L-lysin-p-aminobenzylcarbamat và maleimiđocaproyl-L-valin-L-xitrulin-p-aminobenzylcarbamat (vc); N-sucxinimiđyl 3-(2-pyriđylđithio)proprionat (còn được gọi là N-sucxinimiđyl 4-(2-pyriđylđithio)pentanoat hoặc SPP); 4-sucxinimiđyl-oxycarbonyl-2-metyl-2-(2-pyriđylđithio)-toluen (SMPT); N-sucxinimiđyl 3-(2-pyriđylđithio)propionat (SPDP); N-sucxinimiđyl 4-(2-pyriđylđithio)butyrat (SPDB); 2-iminothiolan; S-axetylsucxinic anhyđrit; đisulfua benzyl carbamat; cacbonat; các nhóm liên kết hyđrazon; N-(α-maleimiđoaxetoxy) sucxinimit este; N-[4-(p-azidosalixylamiđo)butyl]-3'-(2'-pyriđylđithio)propionamit (AMAS); este N-[.beta.-maleimiđopropyloxy]sucxinimit (BMPS); este [N-ε-Maleimiđocaproyloxy]sucxinimit (EMCS); N-[γ-Maleimiđobutyryloxy]sucxinimit este (GMBS); sucxinimiđyl-4-[N-maleimiđometyl]xyclohexan-1-carboxy-[6-amiđocaproat] (LC-SMCC); sucxinimiđyl 6-(3-[2-pyriđylđithio]-propionamiđo)hexanoat (LC-SPDP); este m-maleimiđobenzoyl-N-hyđroxysucxinimit (MBS); N-sucxinimiđyl[4-iođoaxetyl]amincbenzoat (SIAB); sucxinimiđyl 4-[N-maleimiđometyl]xyclohexan-1-carboxylat (SMCC); N-Sucxinimiđyl 3-[2-pyriđylđithio]-propionamiđo (SPDP); este [N-ε-maleimiđocaproyloxy]sulfosucxinimit (sulfo-EMCS); este N-[□γ-maleimiđobutyryloxy]sulfosucxinimit (sulfo-GMBS); 4-sulfosucxinimiđyl-6-metyl-α-(2-pyriđylđithio)toluamiđo]hexanoat) (sulfo-LC-SMPT); sulfosucxinimiđyl 6-(3'-[2-pyriđylđithio]-propionamiđo)hexanoat (sulfo-LC-SPDP); este m-maleimiđobenzoyl-N-hyđroxysulfosucxinimit (sulfo-MBS); N-Sulfosucxinimiđyl[4-iođoaxetyl]aminobenzoat (Sulfo-SIAB); sulfosucxinimiđyl 4-[N-maleimiđometyl]xyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC); sulfosucxinimiđyl 4-[p-maleimiđophenyl]butyrat (sulfo-SMPB); etylen glycol-bis(este N-hyđroxysucxinimit của axit sucxinic) (EGS); axit đisucxinimiđyl tartrat (DST); 1,4,7,10-tetraazaxyclođođecan-1,4,7,10-tetraaxetic (DOTA); axit đietylentriamin-pentaaxetic (DTPA); và các nhóm liên kết thioure.

Theo một số phương án, tác nhân điều trị bệnh là tác nhân kìm hãm tế bào hoặc tác nhân gây độc tế bào. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất chống chuyển hóa (ví dụ, azathioprin, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, fluđarabin, pentostatin, cladribin, 5-floraxil (5FU), floxuriđin (FUDR), xytosin arabinosit (xytarabin), metotrexat, trimethoprim, pyrimethamin, pemetrexed); các tác nhân alkyl hóa (ví dụ,

xyclophosphamit, mechlorethamin, uramustin, melphalan, clorambuxil, thiotepa/clorambuxil, ifosfamit, carmustin, lomustin, streptozoxin, busulfan, đibromomanitol, xisplatin, carboplatin, nedaplatin, oxaliplatin, satraplatin, triplatin tetranitrat, procarbazin, altretamin, đacarbazin, mitozolomide, temozolomit); anthraxyclin (ví dụ, đaunorubixin, đoxorubixin, epirubixin, iđarubixin, valrubixin); thuốc kháng sinh (ví dụ, đactinomyxin, bleomyxin, mithramyxin, anthramyxin, streptozotoxin, gramixidin D, mitomyxin (ví dụ, mitomyxin C), duocarmyxin (ví dụ, CC-1065), calicheamixin); các tác nhân chống phân bào (bao gồm, ví dụ, các maytansinoit, auristatin, dolastatin, cryptophyxin, vinca alkaloit (ví dụ, vincristin, vinblastin, vinđesin, vinorelbin), các taxan (ví dụ, paclitaxel, đoxetaxel, hoặc taxan mới (ví dụ, xem: công bố đơn quốc tế số WO 01/38318, công bố ngày 31 tháng 5 năm 2001)), và colchixin; các chất ức chế topoisomeraza (ví dụ, irinotecan, topotecan, amsacrin, etoposit, teniposit, mitoxantron); và các chất ức chế proteasom (ví dụ, peptiđyl axit boronic).

Theo một số phương án, tác nhân điều trị bệnh là maytansinoit. Các hợp chất maytansinoitd và các phương pháp để tiếp hợp chúng với các kháng thể được bộc lộ, ví dụ, trong Chari et al., *Cancer Res.*, 52: 127-131 (1992); Widdison et al., *J. Med. Chem.* 49: 4392-4408 (2006); và các patent Mỹ số 5,208,020 và 6,333,410. Các ví dụ về các maytansinoit bao gồm các chất tương tự maytansin có nhân thơm đã được cải biến (ví dụ, C-19-declo, C-20-demetoxy, C-20-axyloxy) và chất có các cải biến ở vị trí khác (ví dụ, C-9-CH, C-14-alkoxymetyl, C-14-hyđroxymetyl hoặc axyloxymetyl, C-15-hyđroxy/axyloxy, C-15-metoxy, C-18-N-demetyl, 4,5-đeoxy). Theo các phương án nhất định, maytansinoit là N.sup.2'-đeaxetyl-N.sup.2'-(4-mercapto-1-oxopentyl)maytansin (DM3), N.sup.2'-đeaxetyl-N.sup.2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin (DM1), hoặc N.sup.2'-đeaxetyl-N.sup.2'-(4-mercapto-4-metyl-1-oxopentyl)maytansin (DM4).

Các hợp chất maytansinoit chứa nhóm sulfhyđryl có thể được liên hợp với các kháng thể bằng cách sử dụng nhóm liên kết có hai nhóm chức khác loại mà liên kết với hợp chất maytansinoit bằng liên kết thioete hoặc đisulfua. Theo các phương án này, nhóm liên kết được liên hợp với nhóm amin trên kháng thể (ví dụ, nhóm đầu tận cùng amin hoặc nhóm amin ở vị trí epsilon bao gồm gốc lysin. Theo một số phương án, nhóm liên kết có hai nhóm chức khác loại mà được dùng để liên hợp các hợp chất maytansinoit với kháng thể là N-sucxinimiđyl 3-(2-pyriđylđithio)proprionat (còn được gọi là N-sucxinimiđyl 4-(2-

pyriđyldithio)pentanoat, hoặc SPP), 4-sucxinimiđyl-oxycarbonyl-2-metyl-2-(2-pyriđyldithio)-toluen (SMPT), N-sucxinimiđyl 4-[N-maleimiđometyl]xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), N-sucxinimiđyl 3-(2-pyriđyldithio) propionat (SPDP); N-sucxinimiđyl 4-(2-pyriđyldithio)butyrat (SPDB), 2-iminothiolan, hoặc anhyđrit S-axetylsucxinic.

Theo một số phương án khác, tác nhân điều trị bệnh là dolastatin. Theo một số phương án, tác nhân điều trị bệnh là auristatin, như auristatin E (cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này ở dạng chất dẫn xuất của dolastatin-10) hoặc chất dẫn xuất của chúng. Các hợp chất auristatin và các phương pháp để tiếp hợp chúng với các kháng thể được bộc lộ, ví dụ, trong tài liệu Doronina et al., *Nature Biotech.,* 21: 778-784 (2003); Hamblett et al, *Clin. Cancer Res.,* 10: 7063-7070 (2004); Carter and Senter, *Cancer J.,* 14 154-169 (2008); US 7,498,298, US7,091,186, US 6,884,869; US 6,323,315; US 6,239,104; US6,034,065; US5,780,588; US5,665,860; US5,663,149; US5,635,483; US5,599,902; US5,554,725; US5,530,097; US5,521,284; US5,504,191; US5,410,024; US5,138,036; US5,076,973; US4,986,988; US4,978,744; US4,879,278; US4,816,444; và US4,486,414; US20090010945, US20060074008, US20080300192, US20050009751, US20050238649, và US20030083236; WO 04/010957 và WO 02/088172, mà toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn và đối với mọi mục đích.

Auristatin có thể, ví dụ, là este được tạo ra bởi auristatin E và axit keto. Ví dụ, auristatin E có thể được cho phản ứng với paraaxetyl axit benzoic hoặc axit benzoylvaleric để lần lượt tạo ra AEB và AEVB. Auristatin làm ví dụ khác bao gồm auristatin phenylalanin phenylenđiamin (AFP), monometyl auristatin E (MMAE), và monometyl auristatin F (MMAF).

Theo một số phương án, tác nhân điều trị bệnh là đồng vị phóng xạ. Các ví dụ về các đồng vị phóng xạ hữu dụng làm độc tố trong việc điều trị bệnh bằng cách dùng phóng xạ bao gồm: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb và ^{212}B. Các đồng vị khác phóng xạ đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng bao gồm: ^{32}P và ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193}MPt, ^{197}Hg, tất cả các chất phát xạ hạt beta âm và/hoặc chất phát xạ auger. Một số đồng vị phóng xạ được ưu tiên bao gồm: ^{90}Y, ^{131}I, ^{211}At và $^{212}Pb/^{212}Bi$.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tiếp hợp phân tử của kháng thể kháng GCC với đồng vị phóng xạ bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, Magerstadt, M. (1991) *Antibody Conjugates And Malignant Disease*, CRC Press, Boca Raton, Fla.,; và Barchel, S. W. and Rhodes, B. H., (1983) *Radioimaging and Radiotherapy*, Elsevier, NY, N.Y., từng tài liệu trong số này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, hướng dẫn việc tiếp hợp các đồng vị phóng xạ khác nhau để điều trị và chẩn đoán bệnh với các axit amin của các kháng thể. Các phản ứng này có thể được áp dụng đối với việc tiếp hợp các đồng vị phóng xạ với các phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế bằng tác nhân chelat hóa và/hoặc nhóm liên kết thích hợp.

Các trình tự kháng thể kháng GCC

Các kháng thể kháng GCC đơn dòng của thỏ được tạo ra bằng một vài phương pháp, như được bàn luận một cách chi tiết hơn trong các ví dụ. Một cách vắn tắt, các kháng thể đơn dòng của thỏ MIL-44-148-2 và MIL-44-67-4 được tạo ra bằng công nghệ gây miễn thể truyền thống ở thỏ. Thể lai thực của thỏ-thỏ được tạo ra tại Epitomics (Burlingame, CA) bằng cách dung hợp các tế bào B phân lập được từ thỏ được gây miễn dịch bằng dòng tế bào đối tác dung hợp độc quyền Epitomics (xem US 7,402,409; US 7,429,487; US 7,462,697; US 7,575,896; US 7,732,168; và US 8,062,867). Tính đặc hiệu của các kháng thể với GCC được thử bằng ELISA và phép đếm tế bào theo dòng chảy (FCM).

Bảng 1 dưới đây tóm tắt các kháng thể kháng GCC đơn dòng của thỏ theo sáng chế đã được tạo ra bằng cách sử dụng chất sinh miễn dịch hGCC(ECD)/mIgG2a FcR-mutII.

Các trình tự của các vùng thay đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được xác định trong Bảng 2 dưới đây là tóm tắt của các SEQ ID NO đối với các vùng thay đổi của một số kháng thể. Các trình tự axit amin và axit nucleic đối với các vùng thay đổi của mỗi chuỗi nặng và mỗi chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng GCC của thỏ được lần lượt thể hiện trong bảng 3 và bảng 4.

Các trình tự axit amin và axit nucleic đối với mỗi CDR của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng GCC lần lượt được thể hiện trong bảng 5 và bảng 6.

Việc xác định trình tự các CDR cho phép xác định các gốc mà có thể đóng vai trò làm vị trí tiếp hợp độc tố. Ví dụ, xystein tự do không ghép cặp trong vùng liên kết kháng nguyên có thể là vị trí để tiếp hợp auristatin và lysin có thể là vị trí để tiếp hợp maytansin.

Việc tiếp hợp độc tố với axit amin của CDR có thể dẫn đến việc làm thay đổi ái lực liên kết của kháng thể với GCC. Do đó, theo các phương án, các CDR thiếu axit amin mà có thể được tiếp hợp với tác nhân điều trị bệnh.

Bảng 1: Tóm tắt trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mAb kháng GCC của thỏ

mAb	Mạch IgG	Axit nucleic SEQ ID NO	Axit amin SEQ ID NO
MIL-44-148-2 H2	Chuỗi nặng	4	42
MIL-44-148-2 L5	Chuỗi nhẹ	5	43
MIL-44-67-4 H2	Chuỗi nặng	6	44
MIL-44-67-4 L4	Chuỗi nhẹ	7	45

Axit nucleic MIL-44-148-2 H2 (SEQ ID NO: 4)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
GTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTCTTCAAGCCAACGGATACCCTGACACTCACCT
GCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTCATAGAATGAACTGGGTCCGCCAGACTCCA
GGGAAGGGGCTGGAATGGATCGCAATCATTACTCATAATAGTATCACATACTACGCGAG
CTGGGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAGCGAGAACACGGTGACTCTGA
AAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACTTATTTCTGTGCCAGAGAGGATAGT
ATGGGGTATTATTTTGACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAG
CTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGA
CCTGGAACTCGGGCACCCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCC
TCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCAC
CTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGA
CATGCAGCAAGCCCACGTGCCCACCCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTCATC
TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCCGAGGTCACATGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAACAACG
AGCAGGTGCGCACCGCCCGGCCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGC
GTGGTCAGCACCCTCCCCATCGCGCACCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTG
CAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAG
GGCAGCCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGC

AGGTCGGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGA
GTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACA
GCGACGGCTCCTACTTCCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCCACGAGTGAGTGGCAGCGG
GGCGACGTCTTCACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCACAACCACTACACGCAGAA
GTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

Axit amin MIL-44-148-2 H2 (SEQ ID NO: 42)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSHRMNWVRQTP
GKGLEWIAIITHNSITYYASWAKSRSTITRNTSENTVTLKMTSLTAADTATYFCAREDS
MGYYFDLWGPGTLVTISSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTW
NSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTC
SKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQ
VRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQ
PLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSD
GSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

Axit nucleic MIL-44-148-2 L5 (SEQ ID NO: 5)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC
CAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCA
CAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAACTGGTTAGCCTGGTATCAG
CAGAAACCAGGGCAGTCTCCCAAGCCCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGG
GGTCTCATCGCGGTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGTG
GCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAGCAGACTTATACTAATAATCAT
CTTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA

GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAAC
TGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCT
GGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGAAT
TCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAA
CAGCCACAAAGAGTACACCTGCAGGGTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCT
TCAATAGGGGTGACTGTTAG

Axit amin MIL-44-148-2 L5 (SEQ ID NO: 43)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISNWLAWYQ
QKPGQSPKPLIYRASTLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISGVECADAATYYCQQTYTNNH
LDNGFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGT
TQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCRVTQGTTSVVQSFNRGDC

Axit nucleic MIL-44-67-4 H2 (SEQ ID NO: 6)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
GTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCT
GCACAGCCTCTGGATCCGACATCAGTAACTATGCAATATCCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAATTCATCGGATATATTAGTTATGGTAAAAGTATATACTACGCGAG
CTGGGCGAAAGGCCGGTTCGCCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGGATCTGGAAA
TCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTTTGTGCCAGAGAGGATAGTGCT
ACTTATAGTCCTAACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAG
CTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGA
CCTGGAACTCGGGCACCCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCC
TCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCAC
CTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGA
CATGCAGCAAGCCCACGTGCCCACCCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTCATC
TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCCGAGGTCACATGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAACAACG
AGCAGGTGCGCACCGCCCGGCCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGC
GTGGTCAGCACCCTCCCCATCGCGCACCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTG
CAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAG
GGCAGCCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGC
AGGTCGGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGA
GTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACA
GCGACGGCTCCTACTTCCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCCACGAGTGAGTGGCAGCGG
GGCGACGTCTTCACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCACAACCACTACACGCAGAA
GTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

Axit amin MIL-44-67-4 H2 (SEQ ID NO: 44)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGSDISNYAISWVRQAP

GKGLEFIGYISYGKSIYYASWAKGRFAISKTSSTTVDLEITSPTTEDTATYFCAREDSA
TYSPNLWGPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWN
SGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCS
KPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQV
RTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQP
LEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDG
SYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

Axit nucleic MIL-44-67-4 L4 (SEQ ID NO: 7)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC
CAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCA
CAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTTAGCCTGGTATCAG
CAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGG
GGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCG
GCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTTATAATAAT
CTTGATCGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCACA

GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAAC
TGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCT
GGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGAAT
TCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAA
CAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCT
TCAATAGGGGTGACTGTTAG

Axit amin MIL-44-67-4 L4 (SEQ ID NO: 45)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSINTYLAWYQ
QKPGQRPKLLIYRASTLASGVSSRFKGSGSGTEFTLTISGVECADAATYYCQQGYSYNN
LDRAFGGGTEVVVTGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGT
TQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

Bảng 2: Tóm tắt trình tự của các vùng thay đổi của mAb kháng GCC của thỏ

mAb	Đoạn IgG	Axit nucleic SEQ ID NO	Axit amin SEQ ID NO
MIL-44-148-2 H2	Chuỗi nặng	10	11

mAb	Đoạn IgG	Axit nucleic SEQ ID NO	Axit amin SEQ ID NO
MIL-44-148-2 L5	Chuỗi nhẹ	12	13
MIL-44-67-4 H2	Chuỗi nặng	14	15
MIL-44-67-4 L4	Chuỗi nhẹ	16	17

Bảng 3: Các trình tự axit amin các vùng thay đổi mAb của mAb kháng GCC của thỏ

mAb	Đoạn IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
MIL-44-148-2	Chuỗi nặng	11	QSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSHRMN WVRQTPGKGLEWIAIITHNSITYYASWAKSRSTIT RNTSENTVTLKMTSLTAADTATYFCAREDSMGY YFDLWGPGTLVTISS
MIL-44-148-2	Chuỗi nhẹ	13	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISNWL AWYQQKPGQSPKPLIYRASTLASGVSSRFRGSGS GTQFTLTISGVECADAATYYC QQTYTNNHLDNGFGGGTEVVVK
MIL-44-67-4	Chuỗi nặng	15	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGSDISNYAISW VRQAPGKGLEFIGYISYGKSIYYASWAKGRFAISK TSSTTVDLEITSPTTEDTATYFCAR EDSATYSPNLWGPGTLVTVSS
MIL-44-67-4	Chuỗi nhẹ	17	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSINTYLA WYQQKPGQRPKLLIYRASTLASGVSSRFKGSGSG TEFTLTISGVECADAATYYC QQGYSYNNLDRAFGGGTEVVVT

Bảng 4: Các trình tự axit nucleic các vùng thay đổi mAb của mAb kháng GCC của thỏ

mAb	Đoạn IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit nucleic
MIL-44-148-2	Chuỗi nặng	10	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTCTT CAAGCCAACGGATACCCTGACACTCACCTGCA CCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTCATAGAA TGAACTGGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGGG GCTGGAATGGATCGCAATCATTACTCATAATA GTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGC CGATCCACCATCACCAGAAACACCAGCGAGA ACACGGTGACTCTGAAAATGACCAGTCTGACA GCCGCGGACACGGCCACTTATTTCTGTGCCAG

mAb	Đoạn IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit nucleic
			AGAGGATAGTATGGGGTATTATTTTGACTTGT GGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA
MIL-44-148-2	Chuỗi nhẹ	12	GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGT GGAGGTAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCA AGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAACTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGTC TCCCAAGCCCCTGATCTACAGGGCATCCACTC TGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAGAGGC AGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCAT CAGTGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTT ACTACTGTCAGCAGACTTATACTAATAATCAT CTTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGT GGTGGTCAAA
MIL-44-67-4	Chuỗi nặng	14	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGT CACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCA CAGCCTCTGGATCCGACATCAGTAACTATGCAA TATCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG CTGGAATTCATCGGATATATTAGTTATGGTAAAA GTATATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGG TTCGCCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGT GGATCTGGAAATCACCAGTCCGACAACCGAGG ACACGGCCACCTATTTTTGTGCCAGAGAGGATA GTGCTACTTATAGTCCTAACTTGTGGGGCCCAG GCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
MIL-44-67-4	Chuỗi nhẹ	16	GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTG GAGGTAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAA GTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTT AGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTC CCAAGCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGG CATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGT GGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAG CGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTA CTGTCAACAGGGTTATAGTTATAATAATCTTGAT CGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGT CACA

Bảng 5: Các trình tự axit amin của CDR mAb kháng GCC của thỏ

mAb	IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
MIL-44-148-2-H2	VH CDR1	21	SHRMN

mAb	IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
MIL-44-148-2-H2	VH CDR2	22	IITHNSITYYASWAKS
MIL-44-148-2-H2	VH CDR3	23	EDSMGYYFDL
MIL-44-148-2-L5	VK CDR1	27	QASQSISNWLA
MIL-44-148-2-L5	VK CDR2	28	RASTLAS
MIL-44-148-2-L5	VK CDR3	29	QQTYTNNHLDNG
MIL-44-67-4 H2	VH CDR1	33	NYAIS
MIL-44-67-4 H2	VH CDR2	34	YISYGKSIYYASWAKG
MIL-44-67-4 H2	VH CDR3	35	EDSATYSPNL
MIL-44-67-4 L4	VK CDR1	39	QASQSINTYLA
MIL-44-67-4 L4	VK CDR2	40	RASTLAS
MIL-44-67-4 L4	VK CDR3	41	QQGYSYNNLDRA

Bảng 6: Các trình tự axit nucleic của CDR mAb kháng GCC của thỏ

mAb	IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit nucleic
MIL-44-148-2-H2	VH CDR1	18	AGTCATAGAATGAAC
MIL-44-148-2-H2	VH CDR2	19	ATCATTACTCATAATAGTATCA CATACTACGCGAGCTGGGCGA AAAGC
MIL-44-148-2-H2	VH CDR3	20	GAGGATAGTATGGGGTATTATT TTGACTTG
MIL-44-148-2-L5	VK CDR1	24	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTA ACTGGTTAGCC
MIL-44-148-2-L5	VK CDR2	25	AGGGCATCCACTCTGGCATCT
MIL-44-148-2-L5	VK CDR3	26	CAGCAGACTTATACTAATAATC ATCTTGATAATGGT
MIL-44-67-4 H2	VH CDR1	30	AACTATGCAATATCC
MIL-44-67-4 H2	VH CDR2	31	TATATTAGTTATGGTAAAAGTA TATACTACGCGAGCTGGGCGAA AGGC
MIL-44-67-4 H2	VH CDR3	32	AGTCCTAACTTG
MIL-44-67-4 L4	VK CDR1	36	CAGGCCAGTCAGAGTATTAACA CCTACTTAGCC
MIL-44-67-4 L4	VK CDR2	37	AGGGCATCCACTCTGGCATCT

mAb	IgG	SEQ ID NO:	Trình tự axit nucleic
MIL-44-67-4 L4	VK CDR3	38	CAACAGGGTTATAGTTATAATA ATCTTGATCGTGCT

Sử dụng để điều trị bệnh

Các phân tử của kháng thể kháng GCC đơn dòng của thỏ được bộc lộ theo sáng chế có ứng dụng *in vitro* và *in vivo*. Ví dụ, phân tử của kháng thể này có thể được dùng cho các tế bào trong môi trường nuôi cấy, ví dụ, *in vitro* hoặc *ex vivo*, hoặc được dùng ở đối tượng, ví dụ, *in vivo*, để điều trị và/hoặc phòng, nhiều rối loạn. Theo một số phương án về ứng dụng điều trị theo sáng chế, các phân tử của kháng thể kháng GCC đơn dòng của thỏ theo sáng chế được làm giống như kháng thể của người, bằng cách áp dụng một hoặc nhiều kỹ thuật nêu trên.

Phân tử của kháng thể, các thể tiếp hợp miễn dịch, và các protein dung hợp được bộc lộ theo sáng chế có thể được dùng để điều biến hoạt tính hoặc chức năng của protein GCC, như liên kết phối tử (ví dụ, liên kết của ST hoặc guanylin), tải nạp tín hiệu do GCC gây ra, duy trì dịch ruột non, nội cân bằng chất điện giải, giải phóng canxi nội bào (dòng canxi), biệt hóa tế bào, tăng sinh tế bào, hoặc hoạt hóa tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm phương pháp diệt, ức chế hoặc điều biến sự phát triển, hoặc can thiệp vào sự chuyển hóa của tế bào biểu hiện GCC. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự dẫn truyền tín hiệu trong tế bào do GCC gây ra hoặc phương pháp diệt tế bào. Phương pháp này có thể được dùng với tế bào hoặc mô bất kỳ mà biểu hiện GCC, như tế bào ung thư. Các ví dụ về các tế bào ung thư biểu hiện GCC bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào của ung thư dạ dày-ruột (ví dụ, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, hoặc bệnh ung thư thực quản), bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô ở tế bào biểu mô có vảy, bệnh ung thư biểu mô tuyến vảy, bệnh ung thư tuyến), sacôm mô mềm như sacôm cơ trơn hoặc sacôm cơ vân, các khối u thần kinh nội tiết dạ dày-ruột hoặc phế quản-phổi, hoặc các khối u thần kinh ngoại bì, hoặc tổn thương di căn bất kỳ của chúng. Các ví dụ, mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các tế bào biểu hiện GCC, bao gồm tế bào ung thư tuyến ruột kết T84 của người, các tế bào của khối u ruột kết tươi

hoặc làm đông lạnh, và các tế bào chứa axit nucleic tái tổ hợp mã hóa GCC hoặc phần của chúng.

Các phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước cho tế bào tiếp xúc với phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó, như được bộc lộ theo sáng chế, với lượng hữu hiệu, nghĩa là lượng đủ để ức chế sự dẫn truyền tín hiệu trong tế bào do GCC gây ra hoặc lượng đủ để diệt tế bào. Phương pháp này có thể được sử dụng trên các tế bào trong môi trường nuôi cấy, ví dụ, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, hoặc tại chỗ. Ví dụ, các tế bào mà biểu hiện GCC (ví dụ, các tế bào thu được bằng cách sinh thiết khối u hoặc tổn thương di căn; các tế bào từ dòng tế bào ung thư đã được xác lập; hoặc các tế bào tái tổ hợp), được nuôi cấy *in vitro* trong môi trường nuôi cấy và bước tiếp xúc có thể được thực hiện bằng cách bổ sung phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch vào môi trường nuôi cấy này. Theo các phương pháp diệt tế bào, phương pháp này bao gồm việc sử dụng phân tử của kháng thể kháng GCC trần, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC và tác nhân gây độc tế bào. Phương pháp này sẽ diệt các tế bào biểu hiện GCC, cụ thể là bao gồm các tế bào của khối u biểu hiện GCC (ví dụ, các tế bào của khối u ruột kết).

Các kháng thể đơn dòng của thỏ theo sáng chế, hoặc các phiên bản được làm giống như của người của chúng, có thể được thử nghiệm về sự nhập vào tế bào sau khi liên kết với GCC bằng cách áp dụng kỹ thuật soi kính hiển vi huỳnh quang miễn dịch đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kháng thể được xác nhận là nhập vào là hữu ích khi được liên kết với độc tố đối với tế bào gốc nhằm mục đích điều trị bệnh, hoặc với gốc để hiện ảnh tế bào. Các kháng thể không nhập vào có thể vẫn được sử dụng cho mục đích chẩn đoán hoặc các phương pháp điều trị bệnh bằng cách sử dụng kháng thể trần dùng để gây đáp ứng độc đối với tế bào qua trung gian tế bào-phụ thuộc kháng thể, hoặc có lẽ đối với các phương pháp phân phối liposom.

Các phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế liên kết với miền ngoại bào của GCC hoặc các phần của nó trong các tế bào biểu hiện kháng nguyên. Kết quả là, khi thực hiện các phương pháp theo sáng chế để diệt, ngăn chặn, hoặc phát hiện tế bào ung thư, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên sẽ liên kết với tất cả các tế bào này, mà không chỉ với các tế bào được cố định hoặc các tế bào mà miền kháng nguyên nội bào được tiếp xúc theo cách khác với môi trường ngoại bào. Do đó, liên kết của các

kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên, nằm tập trung trong các vùng mà có các tế bào biểu hiện GCC, bất kể các tế bào này được cố định hoặc không cố định, sống hoặc chết. Ngoài ra hoặc theo cách khác, các phân tử của kháng thể kháng GCC, liên kết với và nhập vào GCC khi liên kết với các tế bào biểu hiện kháng nguyên.

Phương pháp này còn có thể được thực hiện trên các tế bào có mặt ở đối tượng, là một phần của quy trình *in vivo*. Theo một phương án, đối tượng là người. Theo cách khác, đối tượng có thể là động vật có vú biểu hiện kháng nguyên GCC mà phân tử của kháng thể kháng GCC đã được bộc lộ theo sáng chế phản ứng chéo với. Phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó có thể được cho đối tượng là người dùng nhằm mục đích điều trị. Phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch này còn có thể được cho động vật có vú không phải là người dùng biểu hiện kháng nguyên như GCC mà kháng thể phản ứng chéo với (ví dụ, động vật linh trưởng, lợn hoặc chuột) cho mục đích thú y hoặc làm mô hình động vật cho các bệnh của người. Các mô hình động vật có thể là hữu dụng để đánh giá hiệu quả điều trị bệnh của các kháng thể theo sáng chế (ví dụ, kiểm tra liều lượng và thời gian sử dụng). Đối với các phương án *in vivo*, bước cho tiếp xúc được thực hiện ở đối tượng và bao gồm việc cho đối tượng sử dụng phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó trong các điều kiện hữu hiệu để cho phép cả liên kết của phân tử của kháng thể với miền ngoại bào của GCC được biểu hiện trên tế bào, và việc xử lý tế bào.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bằng cách cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị đó dùng phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC và tác nhân gây độc tế bào. Phương pháp này có thể được dùng để điều trị rối loạn ung thư bất kỳ mà bao gồm ít nhất một số tế bào mà biểu hiện kháng nguyên GCC. Thuật ngữ "ung thư" dùng trong bản mô tả này được dự định bao gồm tất cả các loại khối u gây bệnh ung thư hoặc gen gây ung thư, mô di căn hoặc tế bào ác tính đã được biến nạp, mô, hoặc cơ quan, bất kể kiểu hình thái mô hoặc giai đoạn xâm lấn. Các thuật ngữ "ung thư" và "khối u" có thể được sử dụng thay thế nhau (ví dụ, khi được dùng trong ngữ cảnh các phương pháp điều trị bệnh, "điều trị bệnh ung thư" và "điều trị khối u" có cùng ý nghĩa).

Theo các phương án, việc điều trị bệnh là đủ để làm giảm hoặc ức chế sự phát triển của khối u, làm giảm số lượng hoặc kích thước của tổn thương di căn, làm giảm tải lượng

của khối u, làm giảm tải lượng u nguyên phát, làm giảm sự xâm lấn, kéo dài thời gian sống sót, hoặc duy trì hoặc cái thiện chất lượng cuộc sống của đối tượng.

Các ví dụ về các rối loạn ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các khối u rắn, các khối u mô mềm, và tổn thương di căn. Các ví dụ về các khối u rắn bao gồm các khối u ác tính, ví dụ, sacôm, bệnh ung thư tuyến, và bệnh ung thư biểu mô, của các hệ cơ quan khác nhau, như khối u ảnh huởng đến ruột kết. Bệnh ung thư tuyến bao gồm các khối u ác tính như bệnh ung thư biểu mô không phải là tế bào nhỏ của phổi. Tổn thương di căn của các bệnh ung thư nêu trên cũng có thể được điều trị hoặc ngăn ngừa bằng cách áp dụng các phương pháp và các dược phẩm theo sáng chế.

Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GCC cần được điều trị là bệnh ung thư nguyên phát hoặc di căn dạ dày-ruột, như bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, hoặc bệnh ung thư thực quản. Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GCC cần được điều trị là bệnh ung thư tụy nguyên phát hoặc di căn. Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GCC cần được điều trị là bệnh ung thư phổi nguyên phát hoặc di căn, như bệnh ung thư biểu mô ở tế bào biểu mô có vảy, bệnh ung thư biểu mô tuyến vảy, hoặc bệnh ung thư tuyến. Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GCC cần được điều trị là sacôm, như sacôm cơ trơn hoặc sacôm cơ vân. Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GCC cần được điều trị là khối u thần kinh ngoại bì nguyên phát hoặc di căn, như u tế bào ưa crom hoặc khối u cận hạch. Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GCC là khối u thần kinh nội tiết phế quản-phổi hoặc dạ dày-ruột nguyên phát hoặc di căn.

Phương pháp này có thể được áp dụng để điều trị rối loạn thích hợp trong giai đoạn hoặc phân nhóm bất kỳ. Ví dụ, phương pháp này có thể được dùng để điều trị bệnh ung thư ruột giai đoạn sớm hoặc muộn, hoặc bệnh ung thư ruột ở giai đoạn bất kỳ trong số các giai đoạn 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, và IV.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu hiện GCC (ví dụ, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư phổi, sacôm cơ trơn, sacôm cơ vân, khối u thần kinh nội tiết, khối u thần kinh ngoại bì, v.v.) bao gồm việc cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị đó sử dụng phân tử của kháng thể kháng GCC trần được bộc lộ theo sáng chế. Theo

các phương án khác, phương pháp này bao gồm việc sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế và tác nhân gây độc tế bào như maytansanoit hoặc auristatin, hoặc các chất dẫn xuất của chúng. Các phương pháp sử dụng phân tử của kháng thể và các thể tiếp hợp miễn dịch được bộc trên đây. Liều lượng thích hợp của các phân tử được sử dụng sẽ phụ thuộc vào lứa tuổi và thể trọng của đối tượng và hợp chất cụ thể được sử dụng.

Theo một số phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch được dùng trong chu kỳ điều trị. "Chu kỳ điều trị" bao gồm giai đoạn điều trị, trong thời gian đó phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch được dùng như nêu trên, tiếp theo giai đoạn nghỉ, trong thời gian đó không có phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch nào được dùng. Chu kỳ điều trị có thể được lặp lại, nếu cần, để đạt được tác dụng mong muốn.

Các kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế (ví dụ, các phân tử của kháng thể kháng GCC trần hoặc các thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC và tác nhân điều trị bệnh) có thể được sử dụng kết hợp với phép điều trị khác. Ví dụ, phép điều trị kết hợp có thể bao gồm việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế cùng được bào chế với, và/hoặc được dùng cùng với, một hoặc nhiều tác nhân điều trị bệnh bổ sung, ví dụ, một hoặc nhiều tác nhân điều trị bệnh ung thư, ví dụ, các tác nhân gây độc tế bào hoặc các tác nhân kìm hãm tế bào, phép điều trị bằng hormon, vacxin, và/hoặc phép điều trị miễn dịch khác. Theo các phương án khác, các kháng thể kháng GCC được dùng kết hợp với phương pháp điều trị khác, kể cả phẫu thuật, chiếu xạ, phẫu thuật lạnh, và/hoặc phép trị liệu bằng nhiệt. Các phép điều trị kết hợp này có thể sử dụng liều lượng thấp các tác nhân được dùng điều trị bệnh theo cách có lợi, nhờ đó tránh được độc tính có thể có hoặc các biến chứng liên quan đến các phép điều trị riêng lẻ khác nhau.

Thuật ngữ "kết hợp" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hai (hoặc nhiều) cách điều trị khác nhau được thực hiện đối với đối tượng trong quá trình đối tượng bị ảnh hưởng bởi rối loạn, ví dụ, hai hoặc nhiều phép điều trị được thực hiện sau khi đối tượng được chẩn đoán mắc rối loạn và trước khi rối loạn này được chữa trị hoặc loại bỏ. Theo một số phương án, việc thực hiện một phép điều trị vẫn xảy ra khi bắt đầu thực hiện phép điều trị thứ hai, sao cho hai phép điều trị bị chồng chéo lên nhau. Đôi khi điều này ở đây được gọi là thực hiện "đồng thời" hoặc "cùng thời điểm". Theo các phương án khác, việc

áp dụng một phép điều trị kết thúc trước khi bắt đầu áp dụng phép điều trị khác. Theo một số phương án, việc điều trị sẽ có hiệu quả hơn do việc sử dụng kết hợp. Ví dụ, phép điều trị thứ hai sẽ hiệu quả hơn, ví dụ, quan sát thấy hiệu quả tương đương mà lượng dùng cho phép điều trị thứ hai lại ít hơn, hoặc phép điều trị thứ hai làm giảm các triệu chứng ở mức độ lớn hơn mức có thể quan sát thấy có thể nếu phép điều trị thứ hai được áp dụng khi không có phép điều trị thứ nhất, hoặc quan sát được tình huống tương tự đối với phép điều trị thứ nhất. Theo một số phương án, việc phân phối sẽ làm giảm triệu chứng, hoặc thông số khác liên quan đến rối loạn mạnh hơn cái mà có thể quan sát được khi một phép điều trị được áp dụng khi không có phép điều trị khác. Tác động của hai phép điều trị có thể là được cộng hợp một phần, cộng hợp toàn phần, hoặc cộng hợp mạnh hơn. Việc phân phối có thể là để tác động của phép điều trị đầu tiên được áp dụng vẫn có thể phát hiện khi phép điều trị thứ hai được áp dụng.

Theo một số phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó được sử dụng kết hợp với tác nhân hóa trị liệu. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về tác nhân hóa trị liệu làm hỏng ADN bao gồm các chất ức chế topoisomeraza I (ví dụ, irinotecan, topotecan, camptothexin và các chất tương tự hoặc các chất chuyển hóa của chúng, và đoxorubixin); các chất ức chế topoisomeraza II (ví dụ, etoposit, teniposit, và đaunorubixin); các tác nhân alkyl hóa (ví dụ, melphalan, clorambuxil, busulfan, thiotepa, ifosfamit, carmustin, lomustin, semustin, streptozoxin, đecarbazin, metotrexat, mitomyxin C, và xyclophosphamit); các chất xen vào ADN (ví dụ, xisplatin, oxaliplatin, và carboplatin); các chất xen vào ADN và các tác nhân tạo gốc tự do như bleomyxin; và các chất có tác động giống nucleosit (ví dụ, 5-floraxil, capecitibin, gemxitabin, fluđarabin, xytarabin, mercaptopurin, thioguanin, pentostatin, và hyđroxyurê).

Các tác nhân hóa trị liệu phá vỡ quá trình sao chép tế bào bao gồm: paclitaxel, đoxetaxel, và các chất tương tự có liên quan; vincristin, vinblastin, và các chất tương tự có liên quan; thaliđomit, lenaliđomit, và các chất tương tự có liên quan (ví dụ, CC-5013 và CC-4047); các chất ức chế protein tyrosin kinaza (ví dụ, imatinib mesylat và gefitinib); các chất ức chế proteasom (ví dụ, bortezomib); các chất ức chế NF-κB, bao gồm các chất ức chế của IκB kinaza; các kháng thể mà liên kết với các protein được biểu hiện quá mức ở các bệnh ung thư và do đó điều tiết giảm quá trình sao chép tế bào (ví dụ, trastuzumab,

rituximab, cetuximab, và bevacizumab); và các chất ức chế khác của các protein hoặc các enzym đã biết là được điều tiết tăng, biểu hiện quá mức hoặc được hoạt hóa ở các bệnh ung thư, việc ức chế chúng gây điều tiết giảm mức độ sao chép tế bào.

(Các) tác nhân điều trị bệnh chọn lọc hoặc phương thức điều trị được kết hợp với phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế sẽ phụ thuộc vào rối loạn cần được điều trị. (Các) tác nhân hoặc phương thức điều trị bổ sung có thể bao gồm, ví dụ, các phép điều trị bệnh chỉ định đã được chính thức phê chuẩn để điều trị bệnh. Ví dụ, khi phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó được dùng để điều trị bệnh ung thư ruột, nó có thể được sử dụng kết hợp với, ví dụ, việc phẫu thuật; việc điều trị phóng xạ; 5-flourixil (5-FU), capecitibin, leucovorin, irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab, panitumum, hoặc hỗn hợp của chúng (ví dụ, oxaliplatin/capecitibin (XELOX), 5-flourixil/leucovorin/-oxaliplatin (FOLFOX), 5-flourixil/leucovorin/irinotecan (FOLFIRI), FOLFOX cộng với bevacizumab, hoặc FOLFIRI cộng với bevacizumab).

Theo khía cạnh khác, sáng chế bao gồm việc sử dụng phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch như được bộc lộ theo sáng chế để sản xuất thuốc. Theo một phương án, dược chất được dùng để điều trị bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư dạ dày-ruột. Theo một số phương án, dược chất chứa phân tử của kháng thể kháng GCC có đặc tính được tóm tắt trong các bảng 1 đến 6. Theo một số phương án, dược chất chứa phân tử của kháng thể MIL-44-148-2 hoặc MIL-44-67-4, hoặc các phiên bản được làm giống như phiên bản của người của chúng.

Đánh dấu và phát hiện kháng thể

Các phân tử của kháng thể kháng GCC được dùng trong các phương pháp được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, trong việc phát hiện *in vitro* và *in vivo*, ví dụ, trong các phương pháp chẩn đoán, xác định giai đoạn, hoặc hiện ảnh, có thể được đánh dấu trực tiếp hoặc gián tiếp bằng tác nhân có thể phát hiện được để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát hiện chất liên kết hoặc không liên kết. Các chất dễ phát hiện thích hợp bao gồm enzym có hoạt tính sinh học, các phối tử, các nhóm phụ gia (prosthetic), các chất huỳnh quang, các chất phát quang, chất phát quang hóa học, chất phát quang sinh học, chất màu, chất giàu điện tử (electron dense material), chất thuận từ (ví dụ, hoạt tính cộng hưởng từ hạt nhân), và

các chất có hoạt tính phóng xạ. Theo một số phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC được liên hợp với ion phóng xạ, ví dụ, inđi (^{111}In), iot (^{131}I hoặc ^{125}I), ytri (^{90}Y), luteti (^{177}Lu), actini (^{225}Ac), bismut (^{212}Bi hoặc ^{213}Bi), lưu huỳnh (^{35}S), cacbon (^{14}C), triti (^{3}H), rođi (^{188}Rh), tecneti (^{99} mTc), prazaođymi, hoặc phospho (^{32}P); hoặc đồng vị phóng xạ phát positron, ví dụ, carbon-11 (^{11}C) kali-40 (^{40}K), nitơ-13 (^{13}N), oxy-15 (^{15}O), flo-18 (^{18}F), gali (^{68}Ga), và iot-121 (^{121}I). Các tác nhân phóng xạ khác mà có thể được tiếp hợp với các kháng thể theo sáng chế để dùng trong các phương pháp chẩn đoán/phát hiện *in vitro* hoặc *in vivo* được bộc lộ dưới đây.

Các tác nhân đánh dấu làm ví dụ bao gồm nhóm huỳnh quang như các chelat đất hiếm hoặc floresxein và các chất dẫn xuất của chúng, rođamin và các chất dẫn xuất của chúng, đansyl, umbeliferon, luceriferaza, ví dụ, luxiferaza của con đom đóm và vi khuẩn luxiferaza (patent Mỹ số 4,737,456), luxiferin, và 2,3-đihyđrophtalazinđion. Các tác nhân đánh dấu làm ví dụ khác bao gồm peroxiđaza của cây củ cải cay (HRP), phosphataza kiềm, galactosiđaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxiđaza, ví dụ, glucoza oxiđaza, galactoza oxiđaza, và glucoza 6-phosphat đehyđrogenaza, dị vòng oxiđaza như uricaza và xanthin oxiđaza, liên hợp với enzym sử dụng hyđro để oxy hóa tiền chất nhuộm màu như HRP, lactoperoxiđaza, hoặc microperoxiđaza, biotin/aviđin, tác nhân đánh dấu quay, tác nhân đánh dấu thể thực khuẩn, các gốc tự do thích hợp, và các nhóm tương tự.

Phân tử của kháng thể được đánh dấu bằng chất phát quang và nhóm mang màu có thể được điều chế từ các gốc tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vì các kháng thể và các protein khác hấp thu ánh sang có bước sóng đến 310nM, các gốc huỳnh quang nên được chọn để có mức độ hấp thụ đáng kể bước sóng cao hơn 310nM và tốt hơn nếu cao hơn 400nM. Nhiều loại hợp chất huỳnh quang và nhóm mang màu thích hợp được bộc trong tài liệu: *Stryer Science*, 162:526 (1968) và Brand, L. et al. *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868 (1972). Các kháng thể có thể được đánh dấu bằng nhóm huỳnh quang, các nhóm mang màu bằng các quy trình thông thường như quy trình đã được bộc lộ trong US 3,940,475, US 4,289,747, và US 4,376,110.

Một nhóm bao gồm chất phát huỳnh quang có nhiều đặc tính mong muốn nêu trên là chất nhuộm màu xanten, mà là floresxein thu được từ 3,6-đihyđroxy-9-henylxanthyđrol và resamin và rođamin thu được từ 3,6-điamino-9-phenylxanthyđrol và lissanim rođamin B. Các chất dẫn xuất rođamin và floresxein của 9-o-carboxyphenylxanthyđrol có nhóm

9-o-carboxyphenyl. Các hợp chất floresxein có các nhóm liên hợp phản ứng như amino và các nhóm isothioxyanat như floresxein isothioxyanat và fluorescamin có bán trên thị trường. Nhóm hợp chất huỳnh quang khác là naphtylamin, có nhóm amin ở vị trí α hoặc β.

Phân tử của kháng thể được đánh dấu có thể được sử dụng, ví dụ, để chẩn đoán và/hoặc thử nghiệm trong nhiều tình huống, bao gồm (i) để phân lập kháng nguyên định trước theo các kỹ thuật chuẩn, như sắc ký theo ái lực hoặc kết lắng miễn dịch; (ii) để phát hiện kháng nguyên định trước (ví dụ, trong dịch tan của tế bào hoặc dịch nổi tế bào) để đánh giá sự phong phú và kiểu biểu hiện của protein; (iii) để theo dõi lượng protein trong mô là một phần của quy trình thử nghiệm lâm sàng, ví dụ, để xác định hiệu quả của chế độ điều trị nhất định.

Chẩn đoán *in vitro*

Các kháng thể kháng GCC và các thể tiếp hợp miễn dịch được bộc lộ theo sáng chế có thể được dùng để phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của GCC, ví dụ, để phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của GCC trong mẫu sinh học *ex vivo* thu được từ đối tượng (nghĩa là phát hiện *in vitro*), hoặc để phát hiện sự có mặt hoặc phân phối hoặc sự vắng mặt của GCC ở đối tượng (nghĩa là phát hiện *in vivo*). Các phương pháp phát hiện này là hữu dụng để phát hiện hoặc chẩn đoán nhiều loại rối loạn, hoặc để hướng dẫn các quyết định điều trị. Thuật ngữ "phát hiện" theo sáng chế bao hàm việc phát hiện định tính hoặc định lượng. Việc phát hiện GCC hoặc protein GCC theo sáng chế chỉ là phát hiện protein GCC nguyên vẹn hoặc phát hiện một phần của protein GCC chứa epitop mà phân tử của kháng thể kháng GCC liên kết với.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế bao gồm phương pháp phát hiện sự biểu hiện GCC trong mẫu sinh học như tế bào hoặc mô, ví dụ, tế bào của khối u, hoặc khối u có một hoặc nhiều tế bào biểu hiện GCC. Phương pháp này bao gồm các bước: cho mẫu sinh học tiếp xúc phân tử của kháng thể kháng GCC được bộc lộ theo sáng chế (ví dụ, MIL-44-148-2 hoặc MIL-44-67-4), trong các điều kiện cho phép hình thành phức giữa phân tử của kháng thể kháng GCC và protein GCC; và phát hiện sự hình thành phức giữa phân tử của kháng thể kháng GCC và protein GCC, qua đó phát hiện sự có mặt của protein GCC, ví dụ, để phát hiện tế bào hoặc khối u biểu hiện GCC.

Theo một phương án, phân tử của kháng thể kháng GCC là thể tiếp hợp miễn dịch chứa chất đánh dấu dễ phát hiện. Chất đánh dấu dễ phát hiện có thể là chất phóng xạ. Theo cách khác, chất đánh dấu dễ phát hiện không phải là chất phóng xạ (ví dụ, huỳnh quang hoặc nhóm mang màu như nêu trên).

Theo các phương án nhất định, mẫu sinh học bao gồm các tế bào hoặc mô bình thường và/hoặc ung thư mà biểu hiện GCC. Các ví dụ về các tế bào hoặc mô bình thường mà biểu hiện GCC bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các tế bào hoặc mô của dạ dày-ruột, đặc biệt là các tế bào hoặc mô trực tràng ruột kết bình thường. Các ví dụ về các tế bào hoặc mô ung thư mà biểu hiện GCC bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: bệnh ung thư dạ dày-ruột, như bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non và bệnh ung thư thực quản; bệnh ung thư tụy; bệnh ung thư phổi như bệnh ung thư biểu mô ở tế bào biểu mô có vảy, bệnh ung thư biểu mô tuyến vảy và bệnh ung thư tuyến; sacôm mô mềm như sacôm cơ trơn và sacôm cơ vân; khối u thần kinh nội tiết dạ dày-ruột và phế quản-phổi; và khối u thần kinh ngoại bì. Theo các phương án cụ thể, mô tế bào bình thường và/hoặc ung thư có thể biểu hiện GCC ở mức độ cao hơn so với mô khác, ví dụ, mô khác như tế bào B và/hoặc mô liên kết tế bào B.

Phương pháp phát hiện được bộc lộ theo sáng chế, *in vitro* hoặc *in vivo*, có thể được dùng để đánh giá rối loạn ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, rối loạn là rối loạn tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư hoặc khối u, ví dụ, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày hoặc bệnh ung thư tụy.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của protein GCC trong mẫu sinh học *in vitro* (ví dụ, trong tế bào hoặc sinh thiết mô thu được từ đối tượng). Phương pháp này bao gồm các bước: (i) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng tiếp xúc với phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của chúng và (ii) phát hiện hình thành phức giữa phân tử của kháng thể kháng GCC và protein GCC. Sự hình thành phức là dấu hiệu chỉ báo về sự có mặt hoặc mức độ protein GCC trong mẫu sinh học, trong khi sự không hình thành phức là dấu hiệu chỉ báo về sự không có mặt của protein GCC trong mẫu sinh học.

Các mẫu sinh học làm ví dụ cho các phương pháp được bộc lộ theo sáng chế bao gồm mẫu tế bào, các tế bào, mô hoặc dịch thể, như dịch viêm, máu, huyết tương, dịch

ruột, phân. Theo các phương án cụ thể, mẫu sinh học chứa tế bào hoặc mô ung thư. Ví dụ, mẫu có thể là sinh thiết khối u, ví dụ, sinh thiết của khối u trực tràng ruột kết, khối u dạ dày, khối u thực quản, khối u ruột non, khối u phổi, sacôm mô mềm, khối u thần kinh nội tiết, khối u thần kinh ngoại bì, hoặc từ mẫu mô lấy ở vị trí di căn của chúng. Theo các phương án khác, mẫu sinh học có thể là máu hoặc dịch thể khác, nếu dịch thể này chứa tế bào ung thư. Mẫu sinh học có thể thu được bằng cách áp dụng phương pháp bất kỳ trong số phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, mẫu sinh học có thể được xử lý bằng chất cố định như formaldehyt và gắn vào parafin và cắt để sử dụng. Theo cách khác, mô tươi hoặc được làm đông lạnh có thể được sử dụng. Theo các phương án khác, chất dạng hình kim nhỏ có thể được sử dụng.

Theo các phương án nhất định, tế bào hoặc mô thử nghiệm được lấy từ cá thể bị nghi là mắc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện GCC. Theo các phương án nhất định, tế bào hoặc mô thử nghiệm được lấy từ cá thể bị nghi là mắc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện GCC ở vị trí mà không phải là bề mặt đỉnh của các tế bào biểu mô của ruột non (ví dụ, sự biểu hiện GCC bào chất trong các tế bào biểu mô của ruột non), hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện GCC trong các tế bào không phải là các tế bào ruột non hoặc mô của ruột non, như tụy, phổi, mô mềm, hoặc mô thần kinh nội tiết hoặc thần kinh ngoại bì. Theo các phương án nhất định, tế bào hoặc mô thử nghiệm được lấy từ cá thể bị nghi là mắc rối loạn liên quan đến sự tăng biểu hiện GCC.

Theo một phương án, nồng độ của GCC, trong mẫu lấy từ đối tượng, hoặc ở đối tượng, được so sánh với mức tham chiếu, ví dụ, nồng độ của GCC trong chất liệu đối chứng, ví dụ, tế bào bình thường có cùng nguồn gốc mô như tế bào của đối tượng hoặc tế bào có GCC ở mức độ tương đương với tế bào bình thường. Phương pháp này có thể bao gồm bước, ví dụ, tương ứng với mức độ GCC phát hiện được, đưa ra chẩn đoán, tiên lượng bệnh, đánh giá hiệu quả điều trị, hoặc phân định giai đoạn của rối loạn. Mức độ GCC trong mẫu hoặc đối tượng này cao hơn, so với chất liệu đối chứng, biểu thị sự có mặt của rối loạn liên quan đến mức tăng biểu hiện GCC. Mức độ GCC trong mẫu hoặc đối tượng này cao hơn so với chất liệu đối chứng, cũng có thể chỉ báo không có hiệu quả điều trị, tiên lượng bệnh tương đối thấp, hoặc giai đoạn muộn của bệnh. Nồng độ của GCC cũng có thể được dùng để đánh giá hoặc phép điều trị được chọn trong tương lai, ví dụ, nhu cầu về việc điều trị tích cực cao hơn hoặc thấp hơn, hoặc nhu cầu chuyển từ một

phác đồ điều trị cụ thể sang phác đồ khác. Theo một số phương án, các phương pháp còn bao gồm việc chọn phép điều trị hướng đích GCC, ví dụ, phép điều trị hướng đích GCC được bộc lộ theo sáng chế, ít nhất một phần dựa trên mức độ GCC xác định được, và tùy ý dùng phép điều trị hướng đích GCC được chọn cho đối tượng.

Việc tạo phức giữa phân tử của kháng thể kháng GCC và GCC có thể được phát hiện bằng cách đo hoặc hiển thị kháng thể (hoặc đoạn kháng thể) liên kết với kháng nguyên GCC hoặc phân tử của kháng thể không liên kết. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng biết vô số cách để phát hiện liên kết của các kháng thể kháng GCC với GCC. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thử nghiệm liên kết kháng nguyên mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phân tích thẩm tách Tây, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym), thử nghiệm miễn dịch "bánh kẹp", thử nghiệm kết lắng miễn dịch, thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch protein, và hóa mô miễn dịch (IHC).

Theo một phương án cụ thể, GCC được phát hiện hoặc đo được theo phương pháp hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể kháng GCC theo sáng chế. Các kỹ thuật hóa mô miễn dịch có thể được dùng để xác định và chủ yếu là nhuộm màu các tế bào mà biểu hiện GCC. "Việc nhuộm màu" cho phép phân tích sự di căn. Các kháng thể kháng GCC như đã được bộc lộ theo sáng chế được tiếp xúc với các tế bào được cố định và GCC có mặt trong các tế bào phản ứng với các kháng thể. Các kháng thể được đánh dấu theo cách dễ phát hiện hoặc được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai hoặc protein được đánh dấu để nhuộm màu các tế bào. Theo một phương án cụ thể, kháng thể MIL-44-148-2 được dùng trong thử nghiệm IHC để phát hiện hoặc đo mức độ biểu hiện GCC trong mẫu sinh học.

Các thử nghiệm phát hiện thông thường có thể được sử dụng, ví dụ, phân tích thẩm tách Tây, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym), thử nghiệm miễn dịch "bánh kẹp", thử nghiệm kết lắng miễn dịch, thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch protein, và hóa mô miễn dịch (IHC) hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA).

Ngoài cách đánh dấu phân tử của kháng thể kháng GCC, sự có mặt của GCC có thể được thử nghiệm trong mẫu bằng thử nghiệm miễn dịch cạnh tranh bằng cách sử dụng chất chuẩn được đánh dấu bằng tác nhân dễ phát hiện và phân tử của kháng thể kháng GCC không đánh dấu. Trong thử nghiệm này, mẫu sinh học, chất chuẩn được đánh dấu và tác nhân liên kết GCC được kết hợp và lượng chất chuẩn đánh dấu liên kết với kháng thể không đánh dấu được xác định. Lượng GCC trong mẫu này tỷ lệ nghịch với lượng chất chuẩn đánh dấu liên kết với tác nhân liên kết GCC.

Cũng có thể phát hiện một cách trực tiếp sự tạo phức giữa GCC với phân tử của kháng thể kháng GCC mà không cần xử lý hoặc đánh dấu các thành phần (GCC hoặc phân tử của kháng thể), ví dụ, bằng cách áp dụng kỹ thuật chuyển năng lượng từ nguyên tử phát huỳnh quang (FET, ví dụ, xem US 5,631,169 cấp cho Lakowicz và các đồng tác giả; US 4,868,103 cấp cho Stavrianopoulos và các đồng tác giả). Việc đánh dấu huỳnh quang trên phân tử "cho" thứ nhất được chọn sao cho, khi kích thích bằng ánh sáng đến có bước sóng thích hợp, năng lượng huỳnh quang phát ra sẽ được hấp thụ bằng cách đánh dấu huỳnh quang trên phân tử "nhận" thứ hai, mà về phần mình có khả năng phát quang do hấp thu năng lượng. Theo cách khác, phân tử protein "cho" có thể đơn thuần sử dụng năng lượng huỳnh quang tự nhiên của các gốc tryptophan. Các tác nhân đánh dấu được chọn để phát ra ánh sáng có các bước sóng khác nhau, sao cho phân tử đánh dấu "nhận" có thể là khác biệt với ánh sáng của phân tử "cho". Vì hiệu quả của việc chuyển năng lượng giữa các tác nhân đánh dấu liên quan đến khoảng cách phân cách các phân tử, sự liên quan không gian giữa các phân tử có thể được đánh giá. Trong tình huống mà có liên kết xảy ra giữa phân tử, mức độ phát xạ huỳnh quang của phân tử đánh dấu `"nhận" trong thử nghiệm này cần phải cao đến mức tối đa. Hiện tượng liên kết FET có thể đo được một cách thuận tiện thông qua việc phát hiện lượng flo trong chất chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, bằng cách sử dụng flo kế).

Theo ví dụ khác, việc xác định khả năng của phân tử của kháng thể để nhận biết GCC có thể được thực hiện mà không cần thử nghiệm đánh dấu các thành phần (GCC hoặc phân tử của kháng thể) bằng cách áp dụng công nghệ như phân tích tương tác phân tử sinh học thời gian thực (BIA) (ví dụ, xem: Sjolander, S, and Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345 và Szabo et al., 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). Theo sáng chế, "BIA" hoặc "cộng hưởng plasmon bề mặt" là công nghệ để nghiên cứu

tương tác đặc hiệu sinh học trong thời gian thực, mà không cần đánh dấu chất tương tác bất kỳ (ví dụ, BIACORE™). Các thay đổi về trọng lượng trên bề mặt liên kết (biểu thị vật liên kết) dẫn đến sự thay đổi của chỉ số khúc xạ của ánh sáng gần bề mặt (hiện tượng quang học của cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)), tạo ra tín hiệu dễ phát hiện mà có thể được dùng làm dấu hiệu chỉ báo về các phản ứng thời gian thực giữa các phân tử sinh học.

Theo một số khía cạnh, bao gồm hỗn hợp phản ứng gồm phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế (ví dụ, thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế và, ví dụ, tác nhân đánh dấu) và mẫu sinh học, ví dụ, mẫu sinh học được bộc lộ theo sáng chế. Theo các phương án khác, hỗn hợp phản ứng có thể gồm phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế (ví dụ, thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế và, ví dụ, tác nhân đánh dấu) và GCC thu được từ mẫu sinh học, ví dụ, mẫu sinh học được bộc lộ theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, phương pháp, như nêu trên, phương pháp theo sáng chế bao gồm việc phát hiện liên kết của kháng thể kháng GCC với GCC được biểu hiện trên bề mặt của tế bào hoặc trong chế phẩm màng thu được từ tế bào biểu hiện GCC trên bề mặt của nó. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm việc cho tế bào tiếp xúc với kháng thể kháng GCC trong các điều kiện cho phép liên kết kháng thể kháng GCC với GCC, và phát hiện liệu phức có được tạo ra giữa kháng thể kháng GCC và GCC trên bề mặt tế bào hay không. Thử nghiệm làm ví dụ để phát hiện liên kết của kháng thể kháng GCC với GCC được biểu hiện trên bề mặt của tế bào là thử nghiệm "FACS".

Chẩn đoán *in vivo*

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào biểu hiện GCC hoặc mô *in vivo*. Phương pháp này bao gồm (i) việc cho đối tượng (ví dụ, bệnh nhân mắc bệnh ung thư) sử dụng phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế (nghĩa là MIL-44-148-2 hoặc MIL-44-67-4), hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, tốt hơn là kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng đã được tiếp hợp với chất đánh dấu hoặc chỉ thị dễ phát hiện; (ii) cho đối tượng tiếp xúc với bộ phận để phát hiện dấu hoặc chỉ thị dễ phát hiện đối với mô hoặc tế bào biểu hiện GCC. Các phương pháp *in vivo* này có thể được dùng để đánh giá, chẩn đoán,

phân định giai đoạn và/hoặc tiên lượng bệnh của bệnh nhân mắc rối loạn như bệnh ung thư. Phương pháp này bao gồm: (i) cho đối tượng dùng phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó; và (ii) phát hiện sự hình thành phức giữa phân tử của kháng thể kháng GCC và protein GCC. Sự hình thành phức là dấu hiệu chỉ báo về sự có mặt hoặc mức độ GCC ở đối tượng còn sự không hình thành phức là dấu hiệu chỉ báo về sự không có mặt của GCC ở đối tượng.

Các cá thể này có thể được chẩn đoán là mắc bệnh ung thư biểu hiện GCC gây di căn và tế bào ung thư biểu hiện GCC gây di căn mà có thể được phát hiện bằng cách cho cá thể dùng, tốt hơn là qua đường tĩnh mạch, dược phẩm mà chứa chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng và hợp chất đã được tiếp hợp mà chứa phân tử của kháng thể kháng GCC và gốc hoạt tính, trong đó gốc hoạt tính là chất phóng xạ, và phát hiện sự có mặt của sự tích lũy hoặc kết tụ khu trú hoạt tính phóng xạ, biểu thị sự có mặt của các tế bào biểu hiện GCC. Theo một số phương án của sáng chế, dược phẩm này chứa chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng và hợp chất đã được tiếp hợp mà chứa phân tử của kháng thể kháng GCC và gốc hoạt tính, trong đó gốc hoạt tính là chất phóng xạ và phân tử của kháng thể kháng GCC là kháng thể MIL-44-148-2 được bộc lộ theo sáng chế, hoặc các đoạn hoặc các chất dẫn xuất của nó.

Theo một phương án cụ thể, các đồng vị phóng xạ được cho tiếp hợp với phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế để sử dụng làm tác nhân hiện hình trong các quy trình hiện ảnh *in vivo*. Các tác nhân hiện hình là hữu dụng cho các quy trình chẩn đoán cũng như các quy trình được dùng để xác định vị trí tế bào gây di căn. Ví dụ, cá thể có thể được chẩn đoán là mắc bệnh ung thư kết tràng gây di căn và các tế bào ung thư kết tràng gây di căn có thể được phát hiện bằng cách cho cá thể dùng, tốt hơn là qua đường tĩnh mạch, dược phẩm mà chứa chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng và hợp chất đã được tiếp hợp mà chứa phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế và gốc hoạt tính, trong đó gốc hoạt tính là chất phóng xạ, và phát hiện sự có mặt của sự tích lũy hoặc kết tụ khu trú hoạt tính phóng xạ, biểu thị sự có mặt của các tế bào biểu hiện GCC.

Việc hiện ảnh có thể được thực hiện bằng nhiều quy trình mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ và tác nhân hiện hình thích hợp hữu dụng trong các quy trình này được tiếp hợp với phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế theo các cách đã biết rõ. Các ví dụ về các tác nhân đánh dấu hữu dụng để chẩn đoán

hiện ảnh theo sáng chế là tác nhân đánh dấu đồng vị phóng xạ như ^{32}P, ^{3}H, ^{14}C, ^{188}Rh, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{113}M In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb và ^{206}Bi, và ^{213}Bi; tác nhân đánh dấu huỳnh quang như floresxein và rođamin; chất đánh dấu có hoạt tính cộng hưởng từ hạt nhân; các đồng vị positron phát xạ của oxy, nitơ, sắt, cacbon, hoặc gali (ví dụ, ^{68}Ga, ^{18}F) có thể được phát hiện bằng bộ dò chụp X quang phát xạ photon đơn theo tính toán ("SPECT") hoặc thiết bị quét cắt lớp phát xạ positron ("PET"); chất phá quang hóa học như luxiferin; và chất chỉ thị enzym như peroxiđaza hoặc phosphataza. Chất phát xạ phóng xạ phổ ngắn, như các đồng vị có thể phát hiện đầu dò phát hiện phổ ngắn, như đầu dò trực tràng, cũng có thể được sử dụng. Việc hiện ảnh cũng có thể được thực hiện, ví dụ, bằng phương pháp ghi hình phóng xạ, hiện ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (MRI) hoặc chụp cắt lớp điện toán (quét CT). Việc hiện hình bằng cách quét CT có thể sử dụng kim loại nặng như các chelat sắt. Phép quét MRI có thể sử dụng các chelat gadolini hoặc mangan.

Kháng thể có thể được đánh dấu bằng các chất phản ứng này bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, Magerstadt, M. (1991) *Antibody Conjugates And Malignant Disease*, CRC Press, Boca Raton, Fla.; và Barchel, S. W. and Rhodes, B. H., (1983) *Radioimaging and Radiotherapy*, Elsevier, NY, N.Y., từng tài liệu trong số này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, hướng dẫn sự tiếp hợp nhiều đồng vị phóng xạ điều trị và chẩn đoán với các axit amin của các kháng thể. Các phản ứng này có thể được áp dụng đối với thể tiếp hợp các đồng vị phóng xạ giữa các phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế với tác nhân chelat hóa và/hoặc nhóm liên kết thích hợp. Xem thêm: Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, N.Y., về các kỹ thuật liên quan đến việc đánh dấu đồng vị phóng xạ các kháng thể. Xem cả: D. Colcher et al. *Meth. Enzymol.* 121: 802-816 (1986).

Trong trường hợp kháng thể được đánh bằng dấu đồng vị phóng xạ, kháng thể được dùng cho bệnh nhân, được khu trú cho khối u mang kháng nguyên mà kháng thể đó phản ứng, và được phát hiện hoặc "hiện ảnh" *in vivo* bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết như quét hạt nhân phóng xạ bằng cách áp dụng, ví dụ, máy quay gama hoặc chụp cắt lớp phát xạ hoặc chụp cắt lớp điện toán. Ví dụ, A. R. Bradwell et al., "*Developments in Antibody Imaging*", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R. W. Baldwin et al., (eds.), pp 65-85 (Academic Press 1985). Theo cách khác, máy quét cắt lớp

xuyên trục phát positron, như được gọi là Pet VI ở Phòng thí nghiệm quốc gia Brookhaven, có thể được sử dụng, trong đó tác nhân đánh dấu đồng vị phóng xạ phát ra positron (ví dụ, ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O, và ^{13}N, ^{68}Ga).

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các phương pháp xác định liều, ví dụ, liều phóng xạ, mà các mô khác nhau được cho tiếp xúc với khi đối tượng, ví dụ, đối tượng là người, dùng phân tử của kháng thể kháng GCC mà được tiếp hợp với đồng vị phóng xạ. Phương pháp này bao gồm: (i) việc dùng phân tử của kháng thể kháng GCC như được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, phân tử của kháng thể kháng GCC, mà được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ cho đối tượng; (ii) đo lượng đồng vị phóng xạ nằm trong các mô khác nhau, ví dụ, khối u, hoặc máu, tại các thời điểm khác nhau đến khi một số hoặc toàn bộ đồng vị phóng xạ đã được loại trừ ra khỏi cơ thể đối tượng này; và (iii) tính toán tổng liều của phóng xạ nhận được trong mỗi mô được phân tích. Phép đo có thể được thực hiện vào các thời điểm đã được hoạch định, ví dụ, ngày 1, 2, 3, 5, 7, và 12, sau khi cho đối tượng dùng (vào ngày 0) phân tử của kháng thể kháng GCC được đánh dấu phóng xạ. Nồng độ của đồng vị phóng xạ có mặt trong mô, tích hợp sau một khoảng thời gian, và nhân với hoạt tính đặc hiệu của đồng vị phóng xạ có thể được dùng để tính liều mà mô đã nhận được. Thông tin dược lý được tạo ra bằng cách sử dụng các phân tử của kháng thể kháng GCC được đánh dấu bằng một phóng xạ đồng vị, ví dụ, tác nhân phát gama, ví dụ, ^{111}In có thể được dùng để tính liều mong muốn mà cùng một mô có thể nhận được từ một đồng vị phóng xạ khác mà không thể đo được một cách dễ dàng, ví dụ, tác nhân phát beta, ví dụ, ^{90}Y.

Chẩn đoán kèm theo cho phép điều trị hướng đích GCC

Các phương pháp chẩn đoán *in vitro* và *in vivo* được bộc lộ theo sáng chế là hữu dụng để thông báo bệnh nhân mắc bệnh tăng sinh như bệnh ung thư, hoặc rối loạn dạ dày-ruột như hội chứng viêm ruột, bệnh Crohn hoặc tình trạng táo bón, hoặc cần điều trị hoặc không cần điều trị bằng phép điều trị hướng đích GCC, lần lượt trên cơ sở có hoặc không có biểu hiện GCC trên bề mặt của hoặc bên trong các tế bào hoặc mô bệnh nhân. Bệnh nhân có một hoặc nhiều tế bào mà biểu hiện GCC trên bề mặt tế bào hoặc bên trong tế bào là ứng viên để điều trị bệnh bằng phép điều trị hướng đích GCC.

Theo một số khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp xác định độ nhạy của bệnh nhân bị nghi là mắc bệnh hoặc rối loạn biểu hiện GCC cho phép điều trị hướng

đích GCC, bao gồm các bước: (i) cho mẫu sinh học thu được từ đối tượng này tiếp xúc với phân tử của kháng thể kháng GCC theo sáng chế; (ii) phát hiện sự hình thành phức giữa phân tử của kháng thể kháng GCC và protein GCC, trong đó sự hình thành phức là dấu hiệu chỉ báo về sự có mặt hoặc lượng protein GCC có trong mẫu sinh học, trong khi sự không hình thành phức là dấu hiệu chỉ báo về sự không có mặt của protein GCC trong mẫu sinh học, nhờ đó xác định độ nhạy của bệnh nhân với phép điều trị hướng đích GCC. Theo phương án cụ thể, sự hình thành phức giữa phân tử của kháng thể kháng GCC và protein GCC trong sinh học mẫu được phát hiện thông qua hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế, ví dụ, kháng thể MIL-44-1482 được bộc lộ theo sáng chế.

Các mẫu sinh học làm ví dụ có thể chứa tế bào, tế bào, mô hoặc dịch thể, như mẫu dịch viêm, máu, huyết tương, dịch ruột, phân. Theo các phương án cụ thể, mẫu sinh học chứa tế bào hoặc mô ung thư. Ví dụ, mẫu có thể là sinh thiết khối u, ví dụ, sinh thiết của khối u trực tràng ruột kết, khối u dạ dày, khối u thực quản, khối u ruột non, khối u phổi, sacôm mô mềm, khối u thần kinh nội tiết, khối u thần kinh ngoại bì, hoặc từ mẫu mô từ vị trí di căn bất kỳ của chúng. Theo các phương án khác, mẫu sinh học có thể là máu hoặc dịch thể khác, khi dịch thể này chứa tế bào ung thư. Mẫu sinh học có thể thu được bằng cách áp dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, mẫu sinh học có thể được xử lý bằng chất cố định như formaldehyt và gắn vào parafin và cắt để sử dụng. Theo cách khác, mô tươi hoặc đông lạnh có thể được sử dụng. Theo các phương án khác, các chất dạng hình kim nhỏ có thể được sử dụng.

Bệnh/rối loạn làm ví dụ mà có thể được đánh giá (ví dụ, chẩn đoán) và được điều trị bằng cách sử dụng các phương pháp chẩn đoán kèm theo được bộc lộ theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn tăng sinh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô ở tế bào biểu mô có vảy, bệnh ung thư biểu mô tuyến vảy, bệnh ung thư tuyến), sacôm mô mềm như sacôm cơ trơn và sacôm cơ vân, các khối u thần kinh nội tiết dạ dày-ruột và phế quản-phổi, và các khối u thần kinh ngoại bì, các rối loạn dạ dày-ruột như hội chứng viêm ruột, bệnh Crohn, và tình trạng táo bón, và các rối loạn thần kinh như bệnh Parkinson.

Các phương pháp theo sáng chế định hướng cho các quyết định của bác sỹ trong việc xác định xem có nên điều trị bệnh nhân bằng phép điều trị hướng đích GCC hay

không. Các phương pháp theo sáng chế cũng cho phép tạo báo cáo điều trị cá nhân, ví dụ, báo cáo bệnh ung thư điều trị cá nhân, ví dụ, bằng phép điều trị hướng đích GCC được bộc lộ theo sáng chế.

Phép điều trị hướng đích GCC là tác nhân điều trị bệnh mà điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh biểu hiện GCC hoặc bệnh do GCC gây ra, ví dụ, bệnh biểu hiện GCC hoặc bệnh do GCC gây ra được bộc lộ theo sáng chế. Theo một số khía cạnh nhất định của sáng chế, phép điều trị hướng đích GCC sử dụng phối tử GCC như phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc phối tử peptit (ví dụ, peptit ST) đã được tiếp hợp với một tác nhân, như tác nhân điều trị bệnh. Phối tử GCC làm ví dụ đã được tiếp hợp với các tác nhân điều trị bệnh (nghĩa là các thể tiếp hợp miễn dịch) được bộc lộ, ví dụ, US 20110110936, nội dung của nó được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một phương án cụ thể, tác nhân điều trị hướng đích GCC là IgG1 kháng GCC của kháng thể đơn dòng của người đã được tiếp hợp với tác nhân gây độc tế bào, trong đó mAb chứa vùng thay đổi của chuỗi nhẹ (VL) có ba vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nhẹ (CDR1, CDR2, và CDR3) và vùng thay đổi của chuỗi nặng (VH) có ba vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nặng (CDR1, CDR2, và CDR3) được liệt kê trong bảng 7 (các trình tự axit amin) và bảng 8 (các trình tự axit nucleic tương đương) dưới đây, và vùng thay đổi của chuỗi nặng và vùng thay đổi của chuỗi nhẹ được liệt kê trong bảng 9 (các trình tự axit amin) và bảng 10 (các trình tự axit nucleic tương đương) dưới đây.

Bảng 7: Trình tự axit amin của CDR của VL và CDR của VH

VH CDR1	SEQ ID NO: 67	GYYWS
VH CDR2	SEQ ID NO: 68	EINHRGNTNDNPSLKS
VH CDR3	SEQ ID NO: 69	ERGYTYGNFDH
VL CDR1	SEQ ID NO: 70	RASQSVSRNLA
VL CDR2	SEQ ID NO: 71	GASTRAT
VL CDR3	SEQ ID NO: 72	QQYKTWPRT

Bảng 8: Trình tự axit nucleic của CDR của VL và CDR của VH

VH CDR1	SEQ ID NO: 73	GGTTACTACTGGAGC
VH CDR2	SEQ ID NO: 74	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGA CAACCCGTCCCTCAAG

VH CDR3	SEQ ID NO: 75	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCAC
VL CDR1	SEQ ID NO: 76	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAAACTTAGCC
VL CDR2	SEQ ID NO: 77	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
VL CDR3	SEQ ID NO: 78	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG

Bảng 9: Trình tự axit amin của vùng thay đổi mAb

Chuỗi nặng	SEQ ID NO: 79	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQGTLVTVSS
Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO: 80	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQQYKTWPRTFGQGTNVEIK

Bảng 10: Trình tự axit nucleic của vùng thay đổi mAb

Chuỗi nặng	SEQ ID NO: 81	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Chuỗi nhẹ	SEQ ID NO: 82	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAA

Các trình tự axit amin và axit nucleic tương đương với trình tự của chuỗi nặng hIgG1 và chuỗi nhẹ hKapa đầy đủ chứa CDR của VL và CDR của VH được nêu trong bảng 7 và bảng 8, và vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nêu trong bảng 9 và bảng 10 dưới đây:

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng hIgG1 là:

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAG
CTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGT
TGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTT
CAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGA
GTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCT
CAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCT
GAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAG
AGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA
CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT
ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA
CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG
ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC
TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA
CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAACAGGG
TAATACTAGAG (SEQ ID NO: 83)

Trình tự protein của chuỗi nặng hIgG1 là:

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYW
SWIRQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLSSVTAA
DTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 84)

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ Kapa là:

GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAAC
AGCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCT
GTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAG
TGTTAGCAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
GCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTTC
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAG
TCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGA
CGTTCGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCAT
CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC
TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAG
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACCCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTCT
AGA (SEQ ID NO: 85)

Trình tự protein của chuỗi nhẹ hKapa là:

MGWSCIILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQQ
YKTWPRTFGQGTNVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 86)

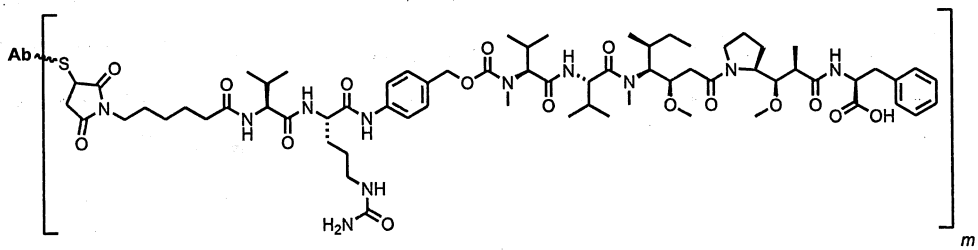
Theo một khía cạnh cụ thể của sáng chế, phép điều trị hướng đích GCC sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch có phân tử của kháng thể kháng GCC đã được tiếp hợp với phân tử auristatin. Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC chứa ba CDR của chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 67, 68 và 69, và ba vùng CDR của chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 70, 71 và 72, đã được tiếp hợp với phân tử auristatin. Theo phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng của SEQ ID NO: 79, và vùng thay đổi của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 80, đã được tiếp hợp với phân tử auristatin. Theo phương án khác nữa, thể tiếp hợp miễn dịch chứa phân tử của kháng thể kháng GCC chứa các vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lần lượt của SEQ ID NO 79 và 80, đã được tiếp hợp với phân tử auristatin.

Theo một số phương án, phân tử auristatin được liên kết với gốc xystein trên phân tử của kháng thể kháng GCC bằng nhóm liên kết chứa gốc maleimit, ví dụ, gốc maleimiđocaproyl.

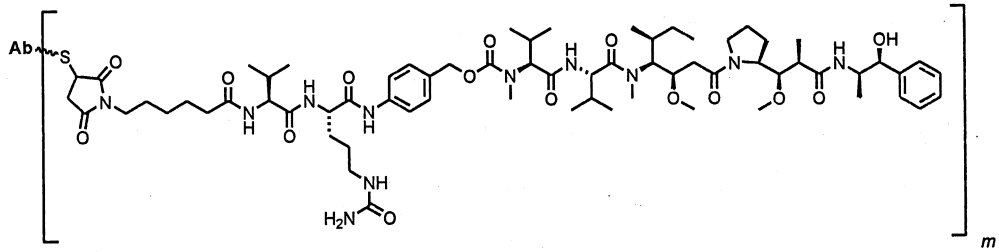
Theo một số phương án, phân tử auristatin được liên hợp với phân tử của kháng thể kháng GCC bằng cách sử dụng nhóm liên kết có hai nhóm chức khác loại mà liên kết với nhóm hyđroxyl trên phân tử auristatin. Theo các phương án này, nhóm liên kết chứa hydrazon. Theo một số phương án, nhóm liên kết là hợp chất hyđrazon được tạo ra theo phản ứng của maleimiđocaproylhyđrazit và ketoaxit carboxylic, ví dụ, axit 5-benzoylvaleric. Theo các phương án cụ thể, nhóm liên kết là axit (Z)-6-(2-(6-(2,5-đioxo-2,5-đihyđro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl)hyđrazono)-6-phenylhexanoic.

Theo một số phương án khác, phân tử auristatin được liên hợp với phân tử của kháng thể kháng GCC bằng cách sử dụng nhóm liên kết có hai nhóm chức khác loại mà liên kết với nhóm monometyl amin trên phân tử auristatin. Theo một số phương án, nhóm liên kết chứa gốc bị phân cắt, ví dụ, peptit gốc, và phần đệm *p*-aminobenzylcarbamat tự cố định. Các nhóm liên kết làm ví dụ bao gồm maleimiđocaproyl (mc), maleimiđocaproyl-L-phenylalanin-L-lysin-*p*-aminobenzylcarbamat, và maleimiđocaproyl-L-valin-L-xitrulin-*p*-aminobenzylcarbamat (vc).

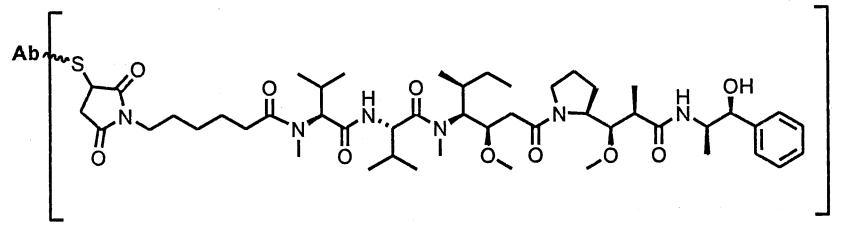
Theo các phương án nhất định, phép điều trị hướng đích GCC sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch có công thức Ab-(vc-MMAF)$_m$ (công thức (***I-4***)); Ab-(vc-MMAE)$_m$ (công thức (***I-5***)); Ab-(mc-MMAE)$_m$ (công thức (***I-6***)); hoặc Ab-(mc-MMAF)$_m$, (công thức (***I-7***)), trong đó Ab là phân tử của kháng thể kháng GCC bao gồm các dấu hiệu như đã được bộc lộ trong bảng bất kỳ trong số các bảng 7, 8, 9 hoặc 10, S là nguyên tử lưu huỳnh của kháng thể, và *m* nằm trong khoảng từ 1 đến 15. Theo các phương án nhất định, *m* là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5.



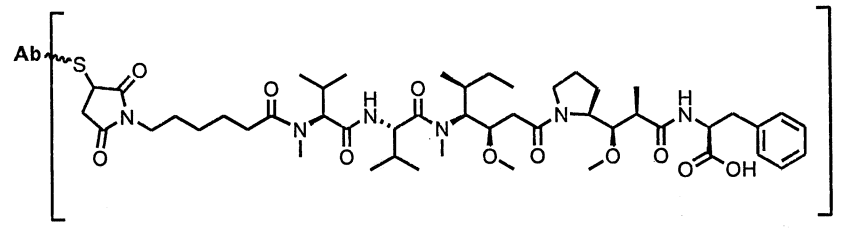
(***I-4***)



(***I-5***)



(***I-6***)



(***I-7***)

Theo một số phương án, biến *m* trong công thức (***I-4***), (***I-5***), (***I-6***), hoặc (***I-7***) nằm trong khoảng từ 2 đến 10, từ 6 đến 8, từ 4 đến 6, từ 3 đến 5, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 3.

Theo các phương án nhất định, phép điều trị hướng đích GCC là thể tiếp hợp miễn dịch có công thức (***I-4***), (***I-5***), (***I-6***), hoặc (***I-7***), trong đó Ab là phân tử của kháng thể chứa ba CDR của chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 67, 68 và 69, và ba vùng CDR của chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 70, 71 và 72, và *m* nằm trong khoảng từ 3 đến 5 (ví dụ, khoảng 4). Theo một số khía cạnh nhất định, Ab bao gồm CDR của chuỗi nặng lần lượt của SEQ ID NO: 67, 68 và 69, và ba CDR của chuỗi nhẹ lần lượt của SEQ ID NO: 70, 71 và 72, là kháng thể đơn dòng của người, tốt hơn là IgG1 của kháng thể của người.

Theo các phương án nhất định khác, phép điều trị hướng đích GCC sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch có công thức (***I-4***), (***I-5***), (***I-6***), hoặc (***I-7***), trong đó Ab là phân tử kháng thể đơn dòng chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng của SEQ ID NO: 79, và vùng thay đổi của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 80, và *m* nằm trong khoảng từ 3 đến 5 (ví dụ, khoảng 4). Theo các khía cạnh nhất định, Ab chứa các vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lần lượt của SEQ ID NO 79 và 80, là kháng thể đơn dòng của người, tốt hơn là IgG1 của kháng thể của người.

Theo các phương án khác, phép điều trị hướng đích GCC là thể tiếp hợp miễn dịch có công thức (***I-4***), (***I-5***), (***I-6***), hoặc (***I-7***), trong đó Ab là phân tử của kháng thể đơn dòng IgG của người chứa trình tự IgG1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 84, và trình tự chuỗi nhẹ Kapa của SEQ ID NO: 86, và *m* nằm trong khoảng từ 3 đến 5 (ví dụ, khoảng 4).

Theo phương án khác nữa, phép điều trị hướng đích GCC sử dụng thể tiếp hợp phối tử GCC có khả năng xuyên qua hàng rào máu-não. Ví dụ, theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phối tử GCC đã được tiếp hợp với tác nhân bảo vệ thần kinh như L-dopa, mà có khả năng xuyên qua hàng rào máu-não. Các ví dụ về các thể tiếp hợp phối tử GCC được bộc lộ trong công bố đơn PCT số WO2013/016662, nội dung của nó được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn. Theo các phương án của sáng chế, các bệnh nhân mắc hoặc bị nghi là mắc rối loạn thần kinh (ví dụ, bệnh Parkinson) mà có các tế bào thần kinh biểu hiện GCC có thể được coi là ứng viên tốt để điều trị bệnh bằng phối tử GCC đã được tiếp hợp với tác nhân bảo vệ thần kinh.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, phép điều trị hướng đích GCC sử dụng chất đối kháng GCC. Theo một phương án, phép điều trị hướng đích GCC sử dụng chất đối kháng peptit (ví dụ, peptit ST) hoặc chất ức chế phân tử nhỏ GCC.

Theo một số khía cạnh, phép điều trị hướng đích GCC sử dụng chất chủ vận GCC. Theo một phương án, chất chủ vận GCC là peptit ST. Theo phương án cụ thể, chất chủ vận GCC là peptit ST chứa trình tự axit amin: H–Cys^1–Cys^2–Glu^3–Tyr^4–Cys^5–Cys^6–Asn^7–Pro^8–Ala^9–Cys^{10}–Thr^{11}–Gly^{12}–Cys^{13}–Tyr^{14}–OH (SEQ ID NO: 87), trong đó có ba liên kết đisulfua: giữa Cys^1 và Cys^6, giữa Cys^2 và Cys^{10}, và giữa Cys^5 và Cys^{13}. Theo phương án cụ thể, chất chủ vận GCC là chất chủ vận peptit mà liên kết với GCC như Linaclotide (Ironwood Pharmaceuticals).

Theo các phương án của sáng chế, các bệnh nhân mang các tế bào của khối u biểu hiện GCC trên bề mặt của chúng có thể được coi là ứng viên tốt để điều trị bệnh bằng các phân tử của kháng thể kháng GCC đã được tiếp hợp với toxin, như thể tiếp hợp miễn dịch như được bộc lộ theo sáng chế, hoặc các kháng thể đã được tiếp hợp với toxin như đã được bộc lộ trong US 20110110936, nội dung của nó được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn. Không muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ giả thuyết nào, các bệnh nhân có các tế bào của khối u biểu hiện GCC bởi lượng ít trên bề mặt của nó có thể không phải là ứng viên tốt đối với phép điều trị này hoặc có thể là ứng viên cho việc phối hợp phép điều trị hướng đích GCC và phương pháp điều trị bệnh khác, hoặc là ứng viên cho phép điều trị bệnh bằng kháng thể trần. Ví dụ khác là liều của phép điều trị hướng đích GCC này có thể được điều chỉnh để phản ánh số lượng của các phân tử GCC biểu hiện trên bề mặt của các tế bào khối u. Ví dụ, các bệnh nhân có số lượng lớn các phân tử GCC trên bề mặt của tế bào khối u có thể được xử lý bằng phép điều trị hướng đích GCC với các liều lượng thấp hơn so với các bệnh nhân có số lượng ít phân tử GCC biểu hiện trên bề mặt của tế bào khối u. Việc phát hiện sự có mặt của các tế bào biểu hiện GCC của khối u *in vivo* có thể cho phép xác định mô là khối u biểu hiện GCC nguyên phát đã gây di căn. Việc biết mô đã di căn có thể dẫn tới việc áp dụng phép điều trị định hướng khối u.

Như nêu trên, phân tử của kháng thể được bộc lộ theo sáng chế cho phép đánh giá sự có mặt của protein GCC trong mô bình thường đối với mô của khối u, thông qua đó mà sự có mặt hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh, tiến triển bệnh và/hoặc hiệu quả của việc điều trị bệnh có thể được đánh giá. Ví dụ, phép điều trị bệnh có thể được theo dõi và đánh giá hiệu quả. Theo một ví dụ, protein GCC có thể được phát hiện và/hoặc lượng của nó được đo trong mẫu thứ nhất thu được từ đối tượng bị bệnh tăng sinh và có thể bắt đầu điều trị. Sau đó, mẫu thứ hai có thể thu được từ đối tượng và protein GCC trong mẫu này

có thể được phát hiện và/hoặc lượng của nó được đo. Việc làm giảm lượng protein GCC được phát hiện hoặc đo được trong mẫu thứ hai có thể là là dấu hiệu chỉ báo về hiệu quả điều trị bệnh.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, sự phân bố mạch có thể là cần thiết đối với phép điều trị GCC hướng đích để đánh giá khối u GCC biểu hiện, đặc biệt là trong các trường hợp, trong đó phép điều trị GCC hướng đích được dùng qua đường tĩnh mạch. Do đó, trong các phương pháp theo các phương án nhất định của sáng chế, có thể là hữu dụng nếu đánh giá hoặc đặc trưng hệ thống mạch khối u ngoài hoặc cùng với việc phát hiện protein GCC. Ví dụ, mẫu mô có thể được nhuộm bằng tác nhân mà xác định tế bào nội mạc mạch, như kháng thể kháng CD-31 hoặc phân tử của kháng thể kháng von Willebrand, và kháng thể kháng GCC theo sáng chế để xác định tính chất đồng thời hoặc cùng lúc để biểu hiện GCC và sự phân bố mạch trong mô. Theo các khía cạnh nhất định của sáng chế, việc xác định tính chất đồng thời hoặc cùng lúc của sự biểu hiện GCC và hệ thống mạch là hữu dụng làm công cụ sàng lọc bệnh nhân đối với việc điều trị hướng đích.

Theo khía cạnh khác, sự biểu hiện của GCC trên bề mặt của tế bào có thể là cần thiết đối với phép điều trị hướng đích GCC để tác động đến việc diệt tế bào biểu hiện GCC của khối u. Ví dụ, một số tế bào của khối u có thể biểu hiện GCC, nhưng không phải trên bề mặt tế bào. Nếu việc điều trị phụ thuộc vào sự biểu hiện GCC trên bề mặt của tế bào, việc điều trị này có thể không diệt được tế bào khi GCC là nội bào nguyên phát. Do đó, theo một số phương án của sáng chế, thử nghiệm chẩn đoán hoặc tiên lượng còn có thể bao gồm việc phân tích và/hoặc định lượng vị trí của tế bào có GCC, ví dụ, phương pháp mà có thể phân biệt và/hoặc định lượng sự biểu hiện trên bề mặt của tế bào từ sự biểu hiện nội bào. Không muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ giả thuyết nào, bệnh nhân có khối u nguyên phát có sự biểu hiện GCC nội bào có thể không phải là ứng viên tốt đối với phân tử của kháng thể kháng GCC liên kết với miền ngoại bào của GCC. Theo cách khác, kết quả phân tích có thể khởi động nhanh chóng việc điều trị bệnh bằng tác nhân gây ra sự biểu hiện của GCC trên bề mặt của tế bào (ví dụ, xem: số công bố PCT số WO04/071436). Sau đó, hoặc cùng với việc tạo ra GCC trên bề mặt của tế bào, phân tử của kháng thể kháng GCC mà chỉ tiếp cận với hoặc liên kết với GCC biểu hiện ngoại bào có thể được dùng.

Kit

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là kit chứa phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch như được bộc lộ theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất kit chứa dược phẩm liposom chứa phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch. Kit này có thể chứa một hoặc nhiều thành phần khác bao gồm: hướng dẫn sử dụng; các chất phản ứng khác, ví dụ, tác nhân đánh dấu, tác nhân điều trị bệnh, hoặc tác nhân hữu dụng để tạo chelat, hoặc theo cách kết hợp khác, của kháng thể với tác nhân đánh dấu hoặc tác nhân điều trị bệnh, hoặc thành phần bảo vệ khỏi bị phóng xạ; dụng cụ hoặc các chất khác để tạo ra kháng thể để sử dụng; các chất mang dược dụng; và dụng cụ hoặc các chất khác để dùng cho đối tượng. Hướng dẫn sử dụng có thể là hướng dẫn để chẩn đoán bằng phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc thể tiếp hợp miễn dịch để phát hiện GCC, *in vitro*, ví dụ, trong mẫu, ví dụ, sinh thiết hoặc các tế bào lấy từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư, hoặc *in vivo*. Các hướng dẫn này có thể là hướng dẫn đối với ứng dụng điều trị bao gồm hướng dẫn về liều lượng và/hoặc cách dùng, ví dụ, ở bệnh nhân mắc bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư dạ dày-ruột, ví dụ, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản). Các hướng dẫn khác có thể là hướng dẫn về việc kết hợp kháng thể với chất tạo chelat, tác nhân đánh dấu hoặc tác nhân điều trị bệnh, hoặc để tinh chế kháng thể đã được tiếp hợp, ví dụ, khỏi thành phần tiếp hợp không phản ứng. Như nêu trên, kit này có thể chứa tác nhân đánh dấu, ví dụ, tác nhân bất kỳ trong số các tác nhân đánh dấu được bộc lộ theo sáng chế. Như nêu trên, kit này có thể chứa tác nhân điều trị bệnh, ví dụ, tác nhân điều trị bệnh được bộc lộ theo sáng chế. Theo một số ứng dụng, kháng thể sẽ phản ứng với các thành phần khác, ví dụ, chất tạo chelat hoặc tác nhân đánh dấu hoặc tác nhân điều trị bệnh, ví dụ, đồng vị phóng xạ, ví dụ, ytri hoặc luteti. Trong các trường hợp này, kit này có thể gồm một hoặc nhiều bình phản ứng để thực hiện phản ứng hoặc một dụng cụ tách, ví dụ, cột sắc ký, dùng để tách thành phẩm ra khỏi nguyên liệu ban đầu hoặc các chất trung gian của phản ứng.

Kit này có thể còn chứa ít nhất một chất phản ứng khác, như tác nhân chẩn đoán hoặc tác nhân điều trị bệnh, ví dụ, tác nhân chẩn đoán hoặc tác nhân điều trị bệnh như được bộc lộ theo sáng chế, và/hoặc một hoặc nhiều phân tử của kháng thể kháng GCC hoặc các thể tiếp hợp miễn dịch khác, được bào chế nếu thích hợp, thành một hoặc nhiều dược phẩm riêng biệt.

Kit này có thể còn chứa chất bảo vệ chống phóng xạ. Bản chất phân giải phóng xạ của các đồng vị, ví dụ, ^{90}Ytri (^{90}Y) là đã biết. Để vượt qua việc phân giải phóng này, chất bảo vệ chống phóng xạ có thể được bao gồm, ví dụ, dung dịch phản ứng đệm, chừng nào chất bảo vệ chống phóng xạ là lành tính, có nghĩa là chúng không ức chế hoặc theo cách khác,tác động bất lợi đến phản ứng đánh dấu, ví dụ, của đồng vị, như ^{90}Y, với kháng thể. Chế phẩm là dung dịch đệm theo sáng chế có thể chứa chất bảo vệ chống phóng xạ như albumin huyết thanh người (HSA) hoặc ascorbat, mà giảm đến mức tối thiểu sự phân giải phóng xạ do ytri hoặc các đồng vị phóng xạ mạnh khác. Chất bảo vệ chống phóng xạ khác là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và cũng có thể được dùng trong dung dịch đệm chế phẩm theo sáng chế, nghĩa là tác nhân loại bỏ gốc tự do (phenol, sulfit, glutathion, xystein, axit gentisin, axit nicotinic, ascorbyl palmitat, $HOP(:O)H_2I$ glyxerol, natri formalđehyt sulfoxylat, Na_2S_2O, $Na_2S_2O_3$, và SO_2, v.v.).

Kit được đề xuất là hữu dụng để đánh dấu đồng vị phóng xạ protein hoặc peptit đã được tiếp hợp với chất tạo chelat bằng đồng vị phóng xạ dùng để điều trị bệnh cho bệnh nhân. Kit này bao gồm (i) lọ chứa kháng thể đã được tiếp hợp với chất tạo chelat, (ii) lọ chứa dung dịch đệm chế phẩm để làm ổn định và cho bệnh nhân dùng kháng thể đã đánh dấu đồng vị phóng xạ, và (iii) hướng dẫn thực hiện quy trình đánh dấu đồng vị phóng xạ. Kit này đưa kháng thể đã tiếp hợp với chất tạo chelat tiếp xúc với đồng vị phóng xạ hoặc muối của nó trong thời gian đủ trong điều kiện tốt, ví dụ, được đề xuất trong hướng dẫn. Kháng thể đã đánh dấu đồng vị phóng xạ có đủ độ tinh khiết, hoạt tính đặc hiệu và tính đặc hiệu liên kết được tạo ra. Kháng thể đã được đánh dấu đồng vị phóng xạ có thể được pha loãng đến nồng độ thích hợp, ví dụ, trong chế phẩm dung dịch đệm, và được cho bệnh nhân dùng trực tiếp kèm theo hoặc không kèm theo việc tinh chế thêm. Kháng thể đã được tiếp hợp với chất tạo chelat có thể được cung cấp ở dạng đông khô.

Các ví dụ sau nhằm để minh họa nhưng không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tạo ra protein dung hợp của miền ngoại bào GCC của người-Fc của chuột (hGCC-ECD-mFc)

Việc tạo ra protein dung hợp được tiết miền ngoại bào (ECD) guanylyl xyclaza (GCC) của người (h) (hGCC)/vùng cố định của chuỗi nặng (Fc) globulin miễn dịch (Ig)G2a của chuột với thụ thể liên kết đột biến vùng (FcRbr-mutII) (nghĩa là protein dung hợp hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mutII, ở đây còn được gọi là pLKTOK108 và MIL-44) để gây miễn dịch và sàng lọc được thực hiện như sau. Kháng nguyên GCC được tạo ra bằng cách tách dòng phụ một phần gen GCC mã hóa trình tự là trình tự GCC sau (trình tự dẫn truyền tín hiệu và miền ngoại bào) vào vectơ biểu hiện pLKTOK4:

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEP
LKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTC
EGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLS
CDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETE
DCFWYLNALEASVSYFSHELGFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCG
GPEFLYKLKGDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLS
PGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPK
FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTH
VNKTYPVDMSPTFTWKNSKL (SEQ ID NO: 46)

Trình tự axit amin GLy-Arg-Gly-Pro-Gln (SEQ ID NO: 66), từ vị trí 427 đến 430, được chọn để kết thúc đoạn GCC ngoại bào. Trong GCC, trình tự này được tiếp theo ngay bởi Pro mà thẳng hàng với Pro ở vị trí tương tự với Pro mà đã được dùng để khơi mào protein dung hợp IgG1 Fc của người.

Vùng IgG2a Fc của chuột của pLKTOK108 được thiết kế để bắt đầu với trình tự axit amin mà đóng vai trò kết thúc miền CH1 [Pro-Arg-Valin (Val)-Pro-Isoleuxin (Ile)-Threonin (Thr)-Glu-Asparagin (Asn)] (SEQ ID NO: 58). Hai vùng bị đột biến nằm trong vùng ổn định IgG2a của chuột nhắt. Ngoài các đột biến leuxin (Leu)-Leu-Gly-Gly (SEQ ID NO: 59) thành Leu-alanin (Ala)-Gly-Ala (SEQ ID NO: 60) (Lysin từ vị trí 234 đến 237 [Lys]-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 61) thành Lys-Ala-Gly-Ala (SEQ ID NO: 62), vùng thụ thể Fc thứ hai ở vị trí 318 đến 322 cũng bị đột biến như sau: axit glutamic (Glu)-Phenylalanin (Phe)-Lys-Xystein (Cys)-Lys (SEQ ID NO: 63) thành Ala-Phe-Lys-Cys-Lys (SEQ ID NO: 64) và sau đó thành Phe-Lys-Cys-Lys (SEQ ID NO: 65).

Một khi trình tự protein dung hợp hoàn chỉnh được thiết kế, các trình tự enzym giới hạn sườn bên đối với BamHI và XbaI, cũng như trình tự Kozak (CTCACC) và codon dừng đầu tận cùng được bổ sung vào protein dung hợp ADN bổ trợ đầy đủ. Các trình tự nucleotit và axit amin của protein dung hợp pLKTOK108 (hGCC/mIgG2a FcRmutII) được nêu dưới đây (vị trí cắt giới hạn BamHI và XbaI được thể hiện bằng các chữ cái in nhỏ trong SEQ ID NO: 47):

Trình tự nucleotit GCC-ECD của người/IgG2a Fc của chuột (SEQ ID NO: 47)

cgcggatccctcaccATGAAGACGTTGCTGTTGGACTTGGCTTTGTGGTCACTGCTCT
TCCAGCCCGGGTGGCTGTCCTTTAGTTCCCAGGTGAGTCAGAACTGCCACAA
TGGCAGCTATGAAATCAGCGTCCTGATGATGGGCAACTCAGCCTTTGCAGA
GCCCCTGAAAAACTTGGAAGATGCGGTGAATGAGGGGCTGGAAATAGTGA
GAGGACGTCTGCAAAATGCTGGCCTAAATGTGACTGTGAACGCTACTTTCAT
GTATTCGGATGGTCTGATTCATAACTCAGGCGACTGCCGGAGTAGCACCTGT
GAAGGCCTCGACCTACTCAGGAAAATTTCAAATGCACAACGGATGGGCTGT
GTCCTCATAGGGCCCTCATGTACATACTCCACCTTCCAGATGTACCTTGACA
CAGAATTGAGCTACCCCATGATCTCAGCTGGAAGTTTTGGATTGTCATGTGA
CTATAAAGAAACCTTAACCAGGCTGATGTCTCCAGCTAGAAAGTTGATGTA
CTTCTTGGTTAACTTTTGGAAAACCAACGATCTGCCCTTCAAAACTTATTCCT
GGAGCACTTCGTATGTTTACAAGAATGGTACAGAAACTGAGGACTGTTTCT
GGTACCTTAATGCTCTGGAGGCTAGCGTTTCCTATTTCTCCCACGAACTCGG
CTTTAAGGTGGTGTTAAGACAAGATAAGGAGTTTCAGGATATCTTAATGGA
CCACAACAGGAAAAGCAATGTGATTATTATGTGTGGTGGTCCAGAGTTCCT
CTACAAGCTGAAGGGTGACCGAGCAGTGGCTGAAGACATTGTCATTATTCT
AGTGGATCTTTTCAATGACCAGTACTTGGAGGACAATGTCACAGCCCCTGAC
TATATGAAAAATGTCCTTGTTCTGACGCTGTCTCCTGGGAATTCCCTTCTAA
ATAGCTCTTTCTCCAGGAATCTATCACCAACAAAACGAGACTTTGCTCTTGC
CTATTTGAATGGAATCCTGCTCTTTGGACATATGCTGAAGATATTTCTTGAA
AATGGAGAAAATATTACCACCCCCAAATTTGCTCATGCTTTCAGGAATCTCA
CTTTTGAAGGGTATGACGGTCCAGTGACCTTGGATGACTGGGGGGATGTTG
ACAGTACCATGGTGCTTCTGTATACCTCTGTGGACACCAAGAAATACAAGG
TTCTTTTGACCTATGATACCCACGTAAATAAGACCTATCCTGTGGATATGAG
CCCCACATTCACTTGGAAGAACTCTAAACTTCCTAATGATATTACAGGCCGG
GGCCCTCAGCCCAGAGTGCCCATAACACAGAACCCCTGTCCTCCACTCAAA

GAGTGTCCCCCATGCGCAGCTCCAGACCTCGCAGGTGCACCATCCGTCTTCA
TCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATGGT
CACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGACGTCCAGATCAG
CTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAG
AGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCA
CCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGCATTCAAATGCAAGGTCAACAACAGAG
CCCTCCCATCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAACCCAGAGGGCCAGTAA
GAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGCAGAAGAGATGACTAAGA
AAGAGTTCAGTCTGACCTGCATGATCACAGGCTTCTTACCTGCCGAAATTGC
TGTGGACTGGACCAGCAATGGGCGTACAGAGCAAAACTACAAGAACACCG
CAACAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTCAGAGT
ACAAAAGAGCACTTGGGAAAGAGGAAGTCTTTTCGCCTGCTCAGTGGTCCA
CGAGGGTCTGCACAATCACCTTACGACTAAGACCATCTCCCGGTCTCTGGGT
AAATAAtctagagca

Trình tự axit amin GCC-ECD của người/IgG2a Fc của chuột (SEQ ID NO: 48):

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKN
LEDAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLL
RKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRL
MSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALEAS
VSYFSHELGFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLKGDRAVA
EDIVIILVDLFNDQYLEDNVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRD
FALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGD
VDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKLPNDITG
RGPQPRVPITQNPCPPLKECPPCAAPDLAGAPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCV
VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM
SGKAFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPPAEEMTKKEFSLTCMI
TGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERGSL
FACSVVHEGLHNHLTTKTISRSLGK

Như nêu trên, protein tái tổ hợp pLKTOK108 kết hợp vùng ngoại bào của GCC của người dung hợp với vùng IgG2a Fc của chuột nhắt, trong đó hai vùng liên kết thụ thể Fc đột biến (FcR) bị đột biến để ngăn ngừa sự liên kết của thụ thể Fc (mIgG2a FcRmutII).

Đoạn chèn ADN tái tổ hợp đối với pLKTOK108 được tạo ra theo quy trình gồm ba bước PCR như sau:

Bước thứ nhất tạo ra các đoạn ngoại bào GCC được làm thích ứng của người và các đoạn IgG2a FcRmutII ADN của chuột đã được làm thích ứng chứa 35 nucleotit trong trình tự chồng chéo. Các phản ứng PCR này sử dụng các khuôn mẫu và đoạn mồi đã được thể hiện trong Bảng 11 và Bảng 12 cùng với quy trình đã được thể hiện trong Bảng 13 để tạo ra hai đoạn. Các đoạn ADN được phân lập ra khỏi 1% agaroza gel bằng cách sử dụng kit tinh chế gel Qiagen (Valencia, CA). Khuôn mẫu GCC của người được tạo ra nhờ vectơ biểu hiện protein chứa trình tự đối với GCC của người (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA). Khuôn mẫu đối với vùng Fc được lấy từ cấu trúc biểu hiện đối với 1228 của người dung hợp với IgG2aFc của chuột có hai bị vùng liên kết với thụ thể Fc đột biến (FcRmutII), được gọi là pLKTOK84, mà chính nó được tạo ra bằng cách sử dụng vectơ pLKTOK61 này (đã được bộc lộ trong US 7,053,202, nội dung của nó được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn) làm khuôn mẫu.

Bảng 11: Khuôn dùng trong các phản ứng chuỗi PCR ở bước thứ nhất để tạo ra ADN tái tổ hợp đối với pLKTOK108

Số	Sản phẩm	**Khuôn**	Đoạn mồi 1	Đoạn mồi 2	Kích thước
1A	Ngoại bào GCC	GCC-Vect người	pGCCFC5	pGCCFCMuA	1300 bp
1B	Chuột IgG2a-FcRmutII	pLKTOK84	pGCCFCMuB	pMICOS-4	700 bp

Bảng 12: Đoạn mồi dùng trong tất cả các phản ứng PCR để tạo ra pLKTOK108

Tên đoạn mồi	**Trình tự**	**SEQ ID NO:**
pGCCFC5	5'-CGCGGATCCCTCACCATGAAGACGTTGCTGTTGGACTTGGC-3'	49
pGCCFCMuA	5'-TGGGCACTCTGGGCTGAGGGCCCCGGCCTGTAATATCATTAG -3'	50

Tên đoạn mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
pGCCFCMuB	5'- CAGGCCGGGGCCCTCAGCCCAGAGTGCCCATAA-CACAGAACCCCTGTCC -3'	51
pMICOS-4	5'-TGCTCTAGATTATTTACCCAGAGACCGGGAGATGGTCTTA-3'	52
pSMUCH2	5'-ACCTGTGGAGCTCTTACTGG-3'	53
EF5S	5'-CATTTCAGGTGTCGTGAGGA-3'	54
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'	55
M13f	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	56
M13r	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	57

Bảng 13: Quy trình phản ứng được áp dụng trong phản ứng chuỗi PCR ở bước thứ nhất để tạo ra ADN tái tổ hợp đối với pLKTOK108

Hỗn hợp phản ứng	Cài đặt thiết bị
1uL ADN (1:100 khuôn điều chế cỡ nhỏ)	94°C- 2 phút
0,2uL Đoạn mồi 1200mM	
0,2uL Đoạn mồi 2200mM	30 vòng
10uL Chất đệm PCR 10x	94°C- 1 phút
3uL $MgCl_2$ 50mM	55°C- 30 giây
2uL hỗn hợp dNTP 10mM	72°C- 2 phút
83,5uL H_2O	
0,5uL Taq polymeraza	72°C- 10 phút

Phản ứng PCR thứ hai kết hợp khuôn mẫu theo các nồng độ nêu trong Bảng 14. Quy trình phản ứng nêu trong Bảng 15 tạo ra gen protein dung hợp tái tổ hợp duy nhất. Sản phẩm của phản ứng này đã được sử dụng trực tiếp làm khuôn mẫu trong phản ứng PCR thứ ba.

Bảng 14: Khuôn dùng trong chuỗi phản ứng PCR ở bước thứ hai để tạo ra ADN tái tổ hợp đối với pLKTOK108

Số	Khuôn mẫu 1	Khuôn mẫu 2	Nồng độ
2A	GCC ngoại bào	IgG2a-FcRmutII của chuột	10uM (2,5ul mỗi lượt)
2B	GCC ngoại bào	IgG2a-FcRmutII của chuột	30uM (7,5ul mỗi lượt)

Phản ứng PCR thứ ba sử dụng khuôn mẫu và đoạn mồi nêu trong Bảng 16 và Bảng 12 theo quy trình nêu trong Bảng 17 dưới đây để tạo ra các đoạn đầy đủ. Các đoạn ADN được phân lập ra khỏi agaroza gel 0,7% bằng cách sử dụng kit tinh chế gel Qiagen (Phụ lục F), và kit tách dòng chứa thiamin ađenosin (TA) nhô ra TOPO® TA (Phụ lục F). Các dòng duy nhất được phân lập và tinh chế ADN bằng cách sử dụng kit điều chế cỡ nhỏ ADN Qiagen (Phụ lục F). ADN được xác định trình tự bằng các đoạn mồi M13f, M13r và pSMUCH2 để xác định ADN bằng trình tự mong muốn. DòngTOPO trung gian TOK108-15 chứa trình tự ADN tái tổ hợp mong muốn.

Bảng 16: Khuôn mẫu dùng trong phản ứng chuỗi PCR ở bước thứ ba để tạo ra ADN tái tổ hợp đối với pLKTOK108

Số	Sản phẩm	Khuôn	Đoạn mồi 1	Đoạn mồi 2	Kích thước
3A	Đoạn chèn TOK108	Phản ứng 2A (5 ul)	pGCCFC5	pMICOS-4	2028 bp
3B	Đoạn chèn TOK108	Phản ứng 2B (5 ul)	pGCCFC5	pMICOS-4	2028 bp

Bảng 17: Quy trình phản ứng áp dụng trong phản ứng chuỗi PCR ở bước thứ ba để tạo ra ADN tái tổ hợp đối với pLKTOK108

Hỗn hợp phản ứng	Cài đặt thiết bị
5uL hỗn hợp phản ứng PCR 2A hoặc 2B	94°C- 2 phút
0,2uL Đoạn mồi 1200mM	
0,2uL Đoạn mồi 2200mM	30 vòng
10uL dung dịch đệm PCR 10x	94°C- 1 phút
3uL $MgCl_2$ 50mM	55°C- 30 giây
2uL hỗn hợp dNTP10mM	72°C- 2 phút
79,5uL H_2O	
0,5uL Taq polymeaza	72°C- 10 phút

Để tạo ra vectơ biểu hiện pLKTOK4, pcADN3.1™ được dùng làm vectơ khung. Vectơ này chứa gen neomyxin (NEO) để kháng lại G-418 (Geneticin®) nhằm cho phép

chọn lọc dễ dàng hơn trong điều kiện nghiên cứu. Vị trí cắt giới hạn SpeI được loại bỏ ra khỏi pcADN™3.1 bằng cách đột biến điểm định hướng. Trình tự khởi đầu EF-1α l lấy từ plasmit pcDEF3 (ban đầu là pEF-BOS[4]) được cài xen vào pcADN™3.1, nhờ đó loại bỏ trình tự khởi đầu CMV. Sơ đồ hình tròn của vectơ biểu hiện pLKTOK4 được thể hiện trên Hình 1.

Việc tách dòng được thực hiện trên các sản phẩm PCR cuối bằng cách sử dụng kit tách dòng TA TOPO®. Sau khi phân cắt bằng enzym cắt giới hạn BamHI và XbaI, đoạn mong muốn lấy từ dòng TOPO được ghép nối vào vectơ biểu hiện pLKTOK4 cũng bị phân cắt bằng BamHI và XbaI. Phản ứng kết nối được dùng để biến nạp các tế bào *E.coli* K12 cạnh tranh về mặt hóa học và sau đó, được chọn trên các đĩa thạch chứa môi trường lỏng Luria (LB)/ampixilin. Các plasmit được lấy từ các dòng *E. coli* cá thể được phân tách bằng cách sử dụng kit điều chế cỡ nhỏ ADN QIAGEN và được giải trình tự bằng các đoạn mồi SP6 (SEQ ID NO: 55), EF5S (SEQ ID NO: 54) và pSMUCH2 (SEQ ID NO: 53).

Dòng đã được xác định chứa ADN tái tổ hợp mong muốn bằng cách xác định trình tự ADN và được dùng để tạo ra lượng lớn plasmit ADN tinh khiết bằng cách sử dụng kit Maxiprep QIAGEN. ADN Maxiprep này được dùng để chuyển nhiễm vào tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc thiếu hụt đihyđrofolat ređuctaza (CHO-DG44).

Dòng tế bào CHO-DG44 được làm thích ứng với huyền phù, không chứa huyết tương, được gọi là S1-CHO-DG44, đã được dùng để phát triển dòng tế bào tạo ra pLKTOK108. Một cách vắn tắt, thực hiện chuyển nhiễm bằng cách sử dụng dụng cụ Nucleofector® của Amaxa Biosystems và kit V Nucleofection® bằng cách sử dụng ADN mạch vòng, không phải mạch thẳng hoặc plasmit ADN mạch thẳng được xử lý bằng enzym cắt giới hạn Pvu I. Các tế bào chuyển nhiễm được duy trì trong môi trường sinh trưởng IS-CHO-V-GS trong thời gian 48 giờ trước khi chuyển sang môi trường chọn lọc G-418. Các tế bào sống, đã được chuyển nhiễm, được nuôi bằng môi trường chọn lọc G-418 mới và duy trì trong môi trường nuôi cấy đến khi hợp dòng (~10 đến 14 ngày). Hiệu suất pLKTOK108 của từng bể chuyển nhiễm được đánh giá bằng cách áp dụng thử nghiệm ELISA IgG2a của chuột nhắt và các tế bào được phát triển để tạo ra ngân hàng tế bào đông lạnh. Bể chuyển nhiễm có hiệu suất cao nhất trong ELISA IgG2a của chuột được xác định để tách dòng pha loãng giới hạn khi các tế bào này được cho vào 5 đĩa nuôi

cấy mô × 96 giếng trong môi trường chọn lọc□G-418 (khoảng 1 tế bào trong mỗi giếng khác nhau). Các đĩa loại 96 giếng được ủ trong thiết bị ủ 37°C với 5% CO_2 trong 2 tuần mà không cho ăn. Năm mươi µl dịch nổi từ mỗi lỗ có khuẩn lạc đơn được chuyển trực tiếp vào đĩa thử nghiệm loại 96 giếng để thực hiện thử nghiệm ELISA IgG2a của chuột nhắt. Hai mươi ba dòng có hiệu suất cao được xác định và nhân lên lần lượt thông qua các đĩa nuôi cấy tế bào loại 24 giếng và sau đó là đĩa nuôi cấy tế bào loại 6 giếng. Chuẩn độ kháng thể dịch nổi thu được từ các dòng được đo ở 3 dung dịch khác nhau trong thử nghiệm ELISA IgG2a của chuột nhắt.

6 dòng tốt nhất trên cơ sở chuẩn độ IgG2a của chuột nhắt được nhân lên trong môi trường chọn lọc G-418 để tạo ra ngân hàng tế bào đông lạnh và được làm thích ứng với môi trường huyền phù không chứa huyết tương, Sigma #21. Mật độ và mức độ sống của tế bào được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phân tích môi trường nuôi cấy tế bào tự động Cedex, và nồng độ protein trong dịch nổi được đo bằng cách áp dụng thử nghiệm ELISA IgG2a của chuột nhắt. Khi các tế bào đạt đến pha sinh trưởng logarith, thu gom và làm đông lạnh chúng ở -80°C qua đêm và sau đó chuyển sang khoang đông lạnh chứa nitơ lỏng để bảo quản.

Để tạo ra protein dung hợp, các tế bào được rã đông và đưa lên đĩa, và sau đó nhân lên theo bậc vào bình chữ T và tiếp đó, vào bình lắc ở mật độ ban đầu là $3,0\times10^5$ tế bào/ml và ủ trong thiết bị ủ đã được tạo ẩm ở 37°C, với 5% CO_2 trong máy lắc theo quỹ đạo cài đặt ở 105 vòng/phút. Giống cấy cuối cùng được nuôi bằng 10% thể tích của môi trường nuôi đặc biệt Sigma #21 vào ngày thứ 4 và ngày thứ 7, và 5% thể tích vào ngày thứ 10. Môi trường nuôi Sigma #21 Feed là môi trường Sigma #21 có bổ sung 40g/l glucoza, 10g/l L-glutamin, 10g/l chiết xuất từ nấm men, và 10g/l pepton đậu tương. Môi trường lắc được thu gom bằng cách ly tâm. Dịch nổi chứa protein pLKTOK108 tiết ra được lọc qua bộ lọc màng polyetesulfon (PES) liên kết protein thấp cỡ 0,2µm, mà dịch lọc chứa pLKTOK108 thô là sẵn sàng để tinh chế hoặc bảo quản ở -80°C để tinh chế tiếp.

Việc tinh chế ban đầu bao gồm việc tuần hoàn dịch nổi đã được lọc chứa pLKTOK108 qua cột Protein Sepharoza ở nhiệt độ khoảng 4°C. Sau đó, nhựa này được rửa bằng PBS độ pH 7,4, và protein được rửa giải bằng dung dịch chứa glyxin 0,1M trong PBS ở độ pH 3,0 và trung hòa bằng dung dịch natri phosphat 1M ở độ pH 6,5. Dịch rửa

giải trung hòa được cô bằng cách sử dụng thiết bị cô Vivaspin có giá trị giới hạn phân tử lượng (MWCO) là 30kDa và nạp vào cột sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC) Superdex 200 (Phụ lục G) đã được cân bằng trước bằng dung dịch đệm PBS độ pH 7,4 để tách các phần kết tụ của protein này. Protein pLKTOK108 đã được tinh chế được rửa giải ở dạng đỉnh đơn, với độ tinh khiết được xác nhận bằng SDS-PAGE và nhuộm màu Coomassie. Các phân đoạn chứa homodime hGCC(ECD)/mIgG2a Fc được thu gom. Sau khi nồng độ của các chất liệu thu gom được xác định theo phương pháp hấp thụ tia cực tím ở 280nM trên quang phổ kế, NanoDrop™ ND1000 protein pLKTOK108 đã được tinh chế được phân chia thành các phần phân ước và bảo quản ở nhiệt độ –80°C.

Ví dụ 2

Tạo ra mAb của thỏ bằng cách gây miễn dịch protein

Các kháng thể đơn dòng của thỏ kháng lại protein dung hợp hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mutII (pLKTOK108) được tạo ra bằng cách sử dụng dịch vụ RabMAb® do Epitomics (Burlingame, CA) cung cấp. Nhằm mục đích tạo ra MAb, protein dung hợp hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mutII (pLKTOK108) ở đây được gọi là MIL-44.

Ba con thỏ (ML1009, ML1010 và ML1011) được gây miễn dịch bằng MIL-44 bằng cách áp dụng các kỹ thuật gây miễn dịch thông thường. Chuẩn độ huyết thanh kháng lại MIL-44 và kháng nguyên đối tác được sàng lọc không phải là GCC (hMadCAM-mFc) được đánh giá bằng cách sử dụng máu thử nghiệm. Thực hiện việc gây miễn dịch tăng cường sau lần gây miễn dịch đầu tiên. Thỏ có chuẩn độ huyết thanh cao nhất, thỏ ML1010, được chọn làm ứng viên để cắt bỏ lách và dung hợp đơn dòng bằng cách sử dụng dòng tế bào đối tác độc quyền và các phương pháp dung hợp thích hợp Epitomics.

Vào hai ngày riêng biệt (ngày 1 và ngày 2), hai trăm triệu tế bào lympho được dung hợp với 100 triệu tế bào đối tác dung hợp và lần lượt được cấy vào 20X đĩa loại 96 lỗ. Các đĩa này được giữ trong thiết bị ủ nuôi cấy mô trong các điều kiện chuẩn. Sự sinh trưởng của tế bào được kiểm tra tại thời điểm 2 đến 3 tuần sau khi dung hợp và hiệu quả dung hợp được tính trên máy tính bằng cách sử dụng số lượng của giếng mà tế bào đã sinh trưởng chia cho tổng số giếng được kiểm tra. Hiệu quả dung hợp đối với sự dung hợp vào ngày thứ 1 đo được là 72%, trong khi hiệu quả dung hợp vào ngày thứ 2 là 79%. Kiểm tra ít nhất hai đĩa đối với từng loại dung hợp như sau:

Tất cả 40 đĩa được thử nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp ELISA tiêu chuẩn với các đĩa được phủ dung dịch chứa 50ng MIL-44/lỗ. Máu chứa ML1010 ở độ pha loãng 1:10K được dùng làm đối chứng dương. 151 dòng có trị số O.D. lớn hơn 0,5 được giả định là dương tính và được nhân lên vào đĩa loại 24 giếng.

Thực hiện phép sàng lọc xác nhận tiếp theo bằng ELISA bằng cách sử dụng các đĩa được phủ dung dịch chứa 50ng MIL-44 hoặc 50ng hMadCAM-mFc/lỗ. 143 dòng được xác nhận dương tính đối với MIL-44 và trong đó 72 dòng được xác định là đặc hiệu với MIL-44, nghĩa là chúng âm tính đối với protein hMadCAM-mFc.

Sau khi đánh giá dịch nổi đa dòng, một vài đa dòng đặc hiệu với MIL-44 được tách dòng phụ: bao gồm đa dòng #148 và #67. Việc tách dòng phụ được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp pha loãng tế bào giới hạn. Một vài dịch nổi dòng phụ được thử nghiệm bằng ELISA. Các tế bào lai của dòng phụ #148-2 và #67-4 được chọn lọc để làm đông lạnh/đưa vào ngân hàng và để sàng lọc tiếp và phân tích ở dạng chất phản ứng phát hiện GCC trong thử nghiệm hóa mô miễn dịch (IHC), như được mô tả trong Ví dụ 3.

Kháng thể MIL-44-148-2 và MIL-44-67-4 cũng được tách dòng vào pcADN3.1+ neo (do Invitrogen cung cấp) để tạo ra bằng cách chuyển nhiễm thoáng qua ở tế bào của các động vật có vú và để xác định trình tự. Các trình tự axit nucleic và axit amin của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của kháng thể MIL-44-148-2 và MIL-44-67-4 được nêu dưới đây. Trình tự tín hiệu trong từng đoạn IgG được thể hiện bằng chữ in nghiêng; vùng thay đổi trong từng đoạn IgG được thể hiện bằng chữ in đậm; CDR được gạch chân.

Trình tự của axit nucleic MIL-44-148-2 H2 (SEQ ID NO: 4)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT

CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTCTTCAAGCCAACGGATACCCTGACACTCAC

CTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTCATAGAATGAACTGGGTCCGCCAGACTC

CAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGCAATCATTACTCATAATAGTATCACATACTACGCG

AGCTGGGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAGCGAGAACACGGTGACTCT

GAAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACTTATTTCTGTGCCAGAGAGGATA

GTATGGGGTATTATTTTGACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAG

CTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGA

CCTGGAACTCGGGCACCCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCC
TCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCAC
CTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGA
CATGCAGCAAGCCCACGTGCCCACCCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTCATC
TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCCGAGGTCACATGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAACAACG
AGCAGGTGCGCACCGCCCGGCCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGC
GTGGTCAGCACCCTCCCCATCGCGCACCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTG
CAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAG
GGCAGCCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGC
AGGTCGGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGA
GTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACA
GCGACGGCTCCTACTTCCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCCACGAGTGAGTGGCAGCGG
GGCGACGTCTTCACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCACAACCACTACACGCAGAA
GTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

Trình tự của axit amin MIL-44-148-2 H2 (SEQ ID NO: 42)

*METGLRWLLLVAVLKGVQC***QSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSHRMNWVRQTP**
GKGLEWIAIITHNSITYYASWAKSRSTITRNTSENTVTLKMTSLTAADTATYFCAREDS
MGYYFDLWGPGTLVTISS
GQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQS
SGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIR
VVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSS
RSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYSKLSVPTSEWQR
GDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

Trình tự của axit nucleic MIL-44-148-2 L5 (SEQ ID NO: 5)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC
*CAGATGT***GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCA**
CAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAACTGGTTAGCCTGGTATCAG
CAGAAACCAGGGCAGTCTCCCAAGCCCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGG
GGTCTCATCGCGGTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGTG

GCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAGCAGACTTATACTAATAATCAT

CTTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA

GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAAC

TGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCT

GGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGAAT

TCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAA

CAGCCACAAAGAGTACACCTGCAGGGTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCT

TCAATAGGGGTGACTGTTAG

Trình tự của axit amin MIL-44-148-2 L5 (SEQ ID NO: 43)

*MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC***AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISNWLAWYQ**

QKPGQSPKPLIYRASTLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISGVECADAATYYCQQTYTNNH

LDNGFGGGTEVVVK

GDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQN

SADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCRVTQGTTSVVQSFNRGDC

Trình tự của axit nucleic MIL-44-67-4 H2 (SEQ ID NO: 6)

*ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT***CA**

GTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCT

GCACAGCCTCTGGATCCGACATCAGTAACTATGCAATATCCTGGGTCCGCCAGGCTCCA

GGGAAGGGGCTGGAATTCATCGGATATATTAGTTATGGTAAAAGTATATACTACGCGAG

CTGGGCGAAAGGCCGGTTCGCCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGGATCTGGAAA

TCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTTTGTGCCAGAGAGGATAGTGCT

ACTTATAGTCCTAACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAG

CTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGA

CCTGGAACTCGGGCACCCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCC

TCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCAC

CTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGA

CATGCAGCAAGCCCACGTGCCCACCCCCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCTGTCTTCATC

TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCCGAGGTCACATGCGT

GGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAACAACG

AGCAGGTGCGCACCGCCCGGCCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGC
GTGGTCAGCACCCTCCCCATCGCGCACCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTG
CAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAG
GGCAGCCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGC
AGGTCGGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGA
GTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACA
GCGACGGCTCCTACTTCCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCCACGAGTGAGTGGCAGCGG
GGCGACGTCTTCACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCACAACCACTACACGCAGAA
GTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

Trình tự của axit amin MIL-44-67-4 H2 (SEQ ID NO: 44)

*METGLRWLLLVAVLKGVQC***QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGSDISNYAISWVRQAP**
GKGLEFIGYISYGKSIYYASWAKGRFAISKTSSTTVDLEITSPTTEDTATYFCAREDSA
TYSPNLWGPGTLVTVSS
GQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQS
SGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIR
VVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSS
RSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYSKLSVPTSEWQR
GDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

Trình tự của axit nucleic MIL-44-67-4 L4 (SEQ ID NO: 7)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC
*CAGATGT***GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCA**
CAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTTAGCCTGGTATCAG
CAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGG
GGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCG
GCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTTATAATAAT
CTTGATCGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCACA

GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAAC
TGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCT
GGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGAAT
TCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAA

CAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCT
TCAATAGGGGTGACTGTTAG

Trình tự của axit amin MIL-44-67-4 L4 (SEQ ID NO: 45)

*MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC***AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSINTYLAWYQ**
QKPGQRPKLLIYRASTLASGVSSRFKGSGSGTEFTLTISGVECADAATYYCQQGYSYNN
LDRAFGGGTEVVVT
GDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQN
SADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

Ví dụ 3

Hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng các kháng thể kháng GCC

Phát hiện sự biểu hiện GCC ở mô hình ghép khác loài khối u mCRC của người

Thử nghiệm IHC bằng cách sử dụng kháng thể MIL-44-148-2 được phát triển để đánh giá mức độ biểu hiện GCC trong HEK293-GCC các loại khối u ghép khác loài và một vài đoạn ghép khác loài khối u nguyên phát của người (PHTX) được lấy từ các mẫu bệnh nhân bị ung thư kết tràng di căn (mCRC) ở chuột nhắt cái SCID.

Lượng protein GCC trong mô cố định bằng Formalin, nhúng trong Parafin (FFPE) được đánh giá trên lát cắt dày 5μm và ủ bằng kháng thể MIL-44-148-2 (3,5μg/ml) trong thời gian 1 giờ trên máy nhuộm màu tự động trong hệ thống Ventana Medical Systems (Tucson, AZ) Discovery XT®. Các kháng thể được biotinyl hóa bằng kháng thể của thỏ kháng dê thứ cấp (Vector Laboratories) và được phát triển bằng hệ bản đồ cơ chất 3,3'-điaminobexiđin (DAB) (Ventana Medical Systems). Các lát cắt được nhuộm ngược lại bằng hematoxylin và hiện ảnh bằng cách sử dụng hệ quét ảnh toàn bộ lát cắt Aperio.

Các mức GCC khác nhau ở mức độ đáng kể trong các loại u với điểm số H (hệ ghi điểm được mô tả dưới đây) nằm trong khoảng từ 4+ ở kiểu ghép khác loài khối u HEK293-GCC, và từ 1+, 1-2+, 2+, 2-3+, và 4+ ở nhiều kiểu ghép khác loài khối u PHTX. Nói chung, ở các loại u có các tế bào của khối u được biệt hóa trung bình/giếng mà vẫn duy trì được cấu trúc biểu mô phân cực, GCC tập trung ở phía sáng của mô khối u.

Phát hiện sự biểu hiện GCC ở các mẫu ruột kết của người và vi mảng khối u

Kháng thể MIL-44-148-2 và MIL-44-67-4 được bộc lộ theo sáng chế cũng được thử nghiệm ở dạng chất phản ứng phát hiện GCC trong quy trình IHC nêu trên bằng cách sử dụng kiểu ghép khác loài khối u nguyên phát của người (PHTX), HT29 và viên lắng tế bào đã được chuyển nhiễm HEK293 GCC, ngoài các mẫu ruột kết ác tính và lành tính của người (FFPE và vi mảng khối u (TMA)) nêu trên.

Các phần kết viên tế bào chuyển nhiễm HT-29 và HEK293 GCC được nhuộm màu như kỳ vọng. PHTX thể hiện nhiều loại cường độ bắt màu ở các dòng MIL-44-148-2 và MIL-44-67-4. Cả hai MIL-44-148-2 và MIL-44-67-4 đều bắt màu dương tính ở caxinom ruột kết được biệt hóa tốt hoặc trung bình tại chỗ hoặc di căn. Các loại u được biệt hóa kém bắt màu ít đậm hơn. Mô ruột kết bình thường bắt màu dương tính ở đỉnh bằng cách sử dụng các kháng thể tạo ra bởi cả hai dòng phụ MIL-44-148-2 và MIL-44-67-4.

Các kháng thể lấy từ cả dòng phụ MIL-44-148-2 và MIL-44-67-4 đều bắt màu rõ ràng, đậm và đặc hiệu ở các tế bào HEK293 và các tế bào HT29 được chuyển nhiễm GCC mà không có hiện tượng không bắt màu đặc hiệu như ở dòng tế bào HEK293 và HT29 bố mẹ. Cả hai dòng cũng được nhuộm màu dương tính ở caxinom ruột kết được biệt hóa tốt hoặc trung bình tại chỗ hoặc di căn. Sự kém bắt màu được quan sát thấy ở cả hai dòng phụ ở caxinom được biệt hóa kém. Ruột kết bình thường thể hiện sự bắt màu dương tính đỉnh ở cả hai dòng, như kỳ vọng. MIL-44-148-2 thể hiện độ nhạy toàn bộ và tính đặc hiệu cao hơn so với MIL-44-67-4 ở IHC. Trong khi MIL-44-67-4 thể hiện khoảng động lực học tốt hơn so với MIL-44-148-2 trong viên lắng tế bào, MIL-44-148-2 thể hiện khoảng động lực học vượt trội so với MIL-44-67-4 trong TMA. Nói chung, dòng phụ MIL-44-148-2 thể hiện tính ưu việt so với MIL-67-4, thể hiện độ nhạy và tính đặc hiệu cao hơn trong IHC, và khoảng động lực học đầy đủ ở TMA, và độ bắt màu mạnh (điểm số IHC +2) ở ruột kết bình thường ở nồng độ thấp.

Trên cơ sở kết quả của các thử nghiệm IHC ban đầu nêu trên, dòng phụ MIL-44-148-2 được chọn để phát triển và xác nhận hiệu lực của quy trình tự động tương đương với quy trình IHC nêu trên bằng cách sử dụng thiết bị nhuộm màu tự động Tek-Mate. Thử nghiệm IHC tự động hóa là công cụ hữu ích để sàng lọc các bệnh nhân ung thư có các loại u biểu hiện GCC như một tiêu chí để tham gia vào thử nghiệm lâm sàng cho phép điều trị bệnh ung thư hướng đích GCC, và nói chung là công cụ sàng lọc để chọn lọc bệnh nhân (ví dụ, các bệnh nhân ung thư) sẽ được nhận phép điều trị hướng đích GCC.

Quy trình IHC được thể hiện trong Bảng 18 được phát triển để phát hiện các tế bào GCC và mô FFPE của người, và khoảng 53 u trực tràng ruột kết và 20 mô ruột kết bình thường, cũng như 2 TMA bệnh ung thư ruột (mua được từ US Biomax) được thử nghiệm về sự biểu hiện GCC. Các loại u có khoảng bậc khối u cũng như mô ung thư ruột kết di căn.

Bốn lát cắt cỡ micron được chuẩn bị từ các mẫu mô khác nhau. Các lát cắt được loại bỏ sáp bằng cách thay đổi xylen trong 4, 5 phút, tiếp theo là loạt rượu đã được phân loại đến nước cất. Phần thu hồi epitop do hơi nóng gây ra (SHIER) được dùng với dung dịch SHIER2 trong thời gian 20 phút trong khe mao mạch trong khoang bên trên của thiết bị tạo hơi Black và Decker.

Bảng 18A: Quy trình IHC

Các bước trong TechMate	Phát hiện bằng UltraVision (UV)
1.	Phong bế UltraVision - 15 phút
2.	Ủ với kháng thể nguyên phát – Qua đêm
3.	Chất tăng cường kháng thể nguyên phát - 25 phút
4.	Phong bế bằng hyđro peroxit - 3 x 2,5 phút mỗi lần
5.	Phát hiện Polyme - 25 phút
6.	Nhiễm sắc thể DAB - 3 x 5,0 phút mỗi lần
7.	Nhuộm màu ngược Hematoxylin - 1 phút

Bảng 18B: Bản mô tả khả năng phản ứng của kháng thể

Kháng thể	Kháng thể nội bộ GCC
Nhà cung cấp	MLNM Takeda
Số Catalog	Không có
Nguồn/Isotyp	RbIgG
Số lô cung cấp	Không xác định
Số lô QualTek	R3512
Dòng	148-2
Nồng độ	0,475µg/ml

Mức pha loãng gợi ý	1,0µg/ml
Thời gian ủ	Qua đêm
Xử lý sơ bộ	SHIER2, không có enzym
Quy trình TechMate	MIP
Hệ dò	Hệ dò UltraVision
Khu vực dưới mức độ tế bào	Bào chất và/hoặc đỉnh

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng chất tăng cường kháng thể sơ cấp có thể là kháng thể thứ cấp kháng thỏ sinh ra ở các loài mà không phải là thỏ (ví dụ, người, chuột to, dê, chuột, v.v.) có cùng isotyp như mAb MIL-44-148-2 hoặc MIL-44-67 của thỏ (IgG thỏ) hoặc chất phản ứng tương tự mà là thích hợp để khuếch đại tín hiệu MIL-44.

Quy trình nêu trên đã sử dụng cách ủ kháng thể MIL-44-148-2 ở 1,0µg/ml qua đêm kèm theo bộ dò peroxiđaza trên cơ sở không phải là biotin (kit Ultravision của Thermo/Lab Vision) và DAB làm nhiễm sắc thể. Quy trình này được tự động hóa hoàn toàn bằng cách sử dụng TechMate 500 hoặc TechMate 1000 (Roche Diagnostics). Sau khi nhuộm, các lát cắt được loại bỏ nước thông qua một loạt rượu đến etanol tuyệt đối, tiếp theo là tráng rửa bằng xylen. Các lát cắt được đậy cố định bằng nắp trượt thủy tinh và CytoSeal. Các lát cắt được kiểm tra dưới kính hiển vi để đánh giá việc nhuộm. Việc nhuộm dương tính được biểu thị bằng sự có mặt của sản phẩm phản ứng màu nâu (DAB-HRP). Phẩm màu phụ hematoxylin tạo ra vết nhuộm nhân màu xanh da trời để đánh giá tế bào và hình thái mô.

Khi đánh giá việc nhuộm GCC, xác định được rằng phương thức điểm số H có thể là phương thức tốt nhất để định lượng mức độ biểu hiện GCC. Phương thức điểm số H cung cấp một giải pháp số liệu tối ưu để xác định sự biến thiên cường độ và tỷ lệ phần trăm khối u bắt màu bên trong và trong các kiểu khối u. Phương thức này còn tạo ra công cụ tốt để xác định các ngưỡng của phép nhuộm dương tính. Theo phương pháp này, tỷ lệ phần trăm của các tế bào (0 đến 100) bên trong khối u có cường độ màu nhuộm nằm trong khoảng từ 0 đến 3+ được tạo ra. Theo phương pháp này, các điểm số kèm theo cường độ 0, 0,5, 1, 2 và 3 được cung cấp. Tùy theo chất chỉ thị, phép nhuộm 0,5 có thể là điểm số dương tính hoặc âm tính, và phản ánh việc nhuộm nhẹ nhưng có thể nhận thấy được bằng

chất chỉ thị. Để thu được điểm số H, tỷ lệ phần trăm của các tế bào của khối u được nhân với từng cường độ và được cộng vào nhau:

Điểm số H = (% khối u*1) + (% khối u*2) + (% khối u*3)

Ví dụ, nếu khối u âm tính 20% (0), 30% +1, 10% +2, 40% +3, thì có thể có điểm số H là 170.

Điểm số H tối đa là 300 (100% * +3), trên mỗi khu vực dưới tế bào (nghĩa là đỉnh hoặc bào chất), nếu 100% tế bào của khối u đánh dấu có cường độ 3+. Ban đầu, để làm đối chứng, một mình điểm số H toàn phần không được dùng để so sánh các mẫu, mà chỉ để đánh giá thêm sự sụt giảm tỷ lệ phần trăm của các tế bào ở từng cường độ. Ví dụ, điểm số 90 có thể biểu thị 90% tế bào của khối u được nhuộm với cường độ 1+ hoặc 30% tế bào được nhuộm với cường độ 3+. Các mẫu này có cùng điểm số H nhưng có sự biểu hiện GCC rất khác nhau. Tỷ lệ phần trăm của các tế bào được chấm điểm ở từng cường độ có thể thay đổi, nhưng thường thì điểm số được gia tăng đến 10%; tuy nhiên, tỷ lệ phần trăm nhỏ khi chấm điểm cho thành phần đơn có thể được ước tính ở 1% và 5% cũng như để thể hiện rằng mức độ nhuộm nhất định đã xảy ra. Đối với GCC, phép nhuộm đỉnh có thể được xem xét để đánh giá ở số gia mức thấp, như 1 và 5%.

Hai khu vực khác nhau dưới mức độ tế bào được chấm điểm đối với GCC bằng cách áp dụng phương thức điểm số H. Các phương thức này bao gồm việc nhuộm bào chất và nhuộm đỉnh kèm theo. Kiểu mẫu nhuộm bào chất thường được quan sát là khuếch tán trong toàn bộ tế bào chất của các tế bào của khối u. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, có các thay đổi của việc nhuộm bào chất, mà bao gồm việc nhuộm hình cầu hoặc đốm, việc nhuộm đốm hạt đậm. Việc nhuộm hình cầu đậm được chấm điểm là nhuộm bào chất 3+. Việc nhuộm đốm liên quan đến việc nhuộm đỉnh và không được chấm điểm riêng biệt đối với kiểu nhuộm bào chất này (n=4 mẫu đối với nhuộm đốm). Việc nhuộm đỉnh GCC được quan sát thấy khi có mặt vùng sáng. Kiểu mẫu nhuộm GCC khác quan sát thấy bao gồm nhuộm giống màng, không phải là vùng sáng (một trường hợp) và nhuộm ngoại bào có mặt trong vùng sáng của khối u. Trong mô ruột kết bình thường, việc nhuộm thường là nhuộm đỉnh cùng với nhuộm bào chất khuếch tán.

Vì điểm số H thu được đối với cả hai sự biểu hiện GCC ở bào chất và đỉnh, và vì không rõ liệu một kiểu khu vực có quan trọng hơn so với khu vực kia về hiệu quả của

phép điều trị bệnh hướng đích GCC hay không, tất cả dữ liệu được lấy và trong một số trường hợp, tổ hợp điểm số H được tạo ra bằng cách sử dụng tổng của cả sự biểu hiện GCC đỉnh và bào chất Trong các trường hợp này, điểm số H tối đa là 600 đối với điểm số cộng gộp (đỉnh 300 + bào chất 300).

Nói chung, việc nhuộm trong ruột kết các mẫu bình thường chỉ ra rằng GCC không được đặc ưu về phương tiện giải phẫu học, được biểu hiện trên bề mặt đỉnh. GCC được thể hiện trên nhiều hơn 95% các mẫu u và, trái với mô bình thường, nó được thể hiện khuếch tán trong việc nhuộm bào chất trong một số trường hợp. Việc nhuộm GCC tập trung mạnh các mẫu di căn gan CRC ở người cũng đã được quan sát thấy.

Các bảng 19A thể hiện kết quả nhuộm điểm số H bào chất và đỉnh đối với mô bình thường và mô khối u mà được sàng lọc. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 19A được chia ra theo nguồn gốc mẫu (nội bộ (được biểu thị là MLNM), TMA (được biểu thị là BIOMAX), và CRO (được biểu thị là QualTek)) và cấp độ của khối u. Dữ liệu xác thực tóm tắt được tạo ra bằng cách sử dụng các ngưỡng cường độ nhuộm là 0,5 và 1,0+. Tổng cộng 173 mẫu u được chấm điểm. Khi sử dụng ngưỡng cường độ nhuộm 0,5+ đối với cường độ nhuộm dương tính đối với phép nhuộm bào chất hoặc đỉnh, 95% các loại u được coi là dương tính. Khi sử dụng ngưỡng cường độ nhuộm 1,0+, 92% các mẫu được coi là dương tính.

Nguồn mô thể hiện sự thay đổi tỷ lệ phần trăm của các tế bào khối u dương tính cũng như điểm số H. Trong ngưỡng nhuộm xác thực1+, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 84% (mẫu MTB khối u CRO) đến 100% (các mẫu nội bộ hoặc các mẫu mô đơn CRO– lưu ý rằng số mẫu trong các nhóm này nhỏ hơn). Mô nội bộ của khối u thể hiện điểm số H đỉnh rất cao là 253 (n=9 mẫu). Cũng có các khác biệt về kết quả điểm số của 2 TMA. TMA C0992 US Biomax bắt màu mạnh hơn C0701. Không muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ giả thuyết nào, mức chênh lệch về các TMA có thể là do sự khác biệt về việc cố định với nguồn mô hoặc một khối có thể mới bị cắt so với khối kia.

Tính ổn định kháng nguyên trong lát cắt và độ tươi của các mẫu cắt được cân nhắc. Các mẫu đã được thử trong nghiên cứu theo sáng chế bao gồm các mẫu được cắt và bảo quản và các mẫu được cắt tươi, biểu thị nhu cầu cần phải nghiên cứu tiếp về tính ổn định của các mẫu mô sau một khoảng thời gian.

Một số khác biệt quan sát được ở độ xác thực GCC và mô hình của khối u (xem Bảng 19B), với mức độ nhuộm dương tính lớn hơn ở các loại u được biệt hóa tốt so với các loại u được biệt hóa kém (sáu loại u được lấy từ US Biomax không bao gồm cấp độ). Các loại u cấp độ 1 (n=20) thể hiện độ xác thực 100%; Loại u cấp độ 2 (n=95) được đánh dấu bằng các ca dương tính 98%; và loại u bậc 3 (n=44) đánh dấu độ xác thực là 88%. Các loại u được biệt hóa kém thường thiếu vùng sáng, mà có thể một phần được cho là do sự làm giảm độ nhuộm do thiếu việc nhuộm đỉnh. Phần trăm xác thực này dựa trên cơ sở ngưỡng cường độ nhuộm 0,5+. Bảy trong 7 trường hợp đáp ứng là dương tính (từ mô nội bộ và mô CRO). Các loại u di căn lấy từ TMA US Biomax được liệt kê là đáp ứng với hạch bạch huyết.

Nói chung, GCC bắt màu nhuộm với tỷ lệ phần trăm rất cao ở mô khối u ruột kết và mô ruột kết bình thường bất kể nguồn gốc của mô hoặc cấp độ khối u.

Bảng 19A: Tóm tắt về việc nhuộm ung thư ruột theo nguồn mẫu

Mẫu caxinom ruột kết	Tổng số mẫu caxinom ruột kết	Số mẫu dương tính				Điểm số H trung bình	
		0,5+ và lớn hơn		1,0+ và lớn hơn		0-300	
		Số	%	Số	%	Bào chất	Đỉnh
Mẫu MLNM	9	9	100%	9	100%	83	253
Mẫu đơn QualTek	4	4	100%	4	100%	69	98
MTBS caxinom ruột kết QualTek	43	39	91%	36	84%	66	118
Mảng BIOMAXX C0992	65	63	97%	63	97%	144	164
Mảng BIOMAXX C0701	52	49	94%	48	92%	98	118
Tổng	173	164	95%	160	92%	102	138

Bảng 19B: Tóm tắt về việc nhuộm ung thư ruột theo cấp độ của khối u

Mẫu ruột kết	Số dương tính	Tổng số mẫu	%
Bình thường	57	58	98%
Bậc 1	20	20	100%

Bậc 2	95	97	98%
Bậc 3	44	50	88%
Tổng	216	225	96%

Độ chính xác bên trong thử nghiệm của thử nghiệm GCC IHC được đánh giá trong một lần chạy mẫu bằng cách sử dụng từng 5 mẫu lặp thử nghiệm thu được từ ba viên lắng tế bào và 14 mô caxinom ruột kết khác nhau. Viên lắng tế bào được chuẩn bị trên các phiến kính riêng biệt. Các mẫu u ruột kết được đưa vào trong hai khối đa khối u khác nhau. Các mô này được chấm điểm về khả năng phản ứng GCC IHC.

Độ chính xác của vết nhuộm màu của viên lắng tế bào: Vết nhuộm gần như giống hệt nhau được quan sát thấy ở tất cả 5 mẫu lặp thử nghiệm trong khi chạy mẫu của 3 viên lắng tế bào.

Độ chính xác của vết nhuộm màu các mẫu u của ruột kết: Vết nhuộm từ rất giống đến gần như giống hệt được quan sát thấy trong 5 mẫu lặp thử nghiệm trong khi chạy mẫu của 14 mẫu u ruột kết. Các mẫu này được chấm điểm nhờ một nhà nghiên cứu bệnh học được cấp chứng chỉ bằng cách áp dụng phương thức điểm số H như nêu trên. Sai số chuẩn thể hiện rằng trong tất cả các trường hợp, phương sai là tối thiểu, nhờ đó mà thể hiện độ chính xác cao của việc nhuộm trong cùng lần chạy mẫu. Nói chung, có sự nhất quán khi chạy mẫu viên lắng tế bào nhuộm GCC IHC và các mẫu caxinom của ruột kết được thử nghiệm.

Sự biến thiên thử nghiệm giữa các lần chạy và sự biến thiên do các người vận hành khác nhau được đánh giá trong 5 lần chạy mẫu nhuộm GCC IHC riêng biệt. Bốn lần chạy mẫu được thực hiện vào các ngày khác nhau bằng cùng một người vận hành và người vận hành thứ hai sẽ thực hiện lần chạy mẫu thứ năm. Việc nhuộm này bao gồm việc kiểm tra cùng một mô để kiểm tra độ chính xác nêu trên.

Độ tin cậy của phép nhuộm viên lắng tế bào: Các vết nhuộm gần như giống hệt nhau được quan sát thấy ở toàn bộ 5 mẫu lặp thử nghiệm giữa các lần chạy mẫu của 3 viên lắng tế bào.

Độ tin cậy của phép nhuộm các mẫu u ruột kết: Vết nhuộm gần như giống hệt nhau được quan sát thấy trong 5 mẫu lặp thử nghiệm giữa các lần chạy mẫu của 14 mẫu u ruột kết. Các mẫu được chấm điểm bằng một nhà nghiên cứu bệnh học được cấp chứng chỉ

bằng cách áp dụng phương thức điểm số H như đã được mô tả. Sai số chuẩn thể hiện rằng trong tất cả các trường hợp, phương sai nhỏ đến mức tối thiểu, do đó thể hiện độ tin cậy cao của phép nhuộm theo từng ngày và với các người vận hành khác nhau. Nói chung, việc nhuộm GCC IHC các viên lắng tế bào và các mẫu caxinom ruột kết được thử nghiệm giữa các lần chạy mẫu và giữa các người vận hành là đồng nhất với nhau.

Tính đặc hiệu của thử nghiệm GCC IHC được đánh giá bằng cách kiểm tra một nhóm mô bình thường của người. Các mô bình thường người bao gồm 30 kiểu mô khác nhau: tuyến thượng thận, bàng quang, tủy xương, vú, vỏ não, cổ tử cung, ống dẫn trứng, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, thần kinh, buồng trứng, tụy, tuyến mang tai (tuyến nước bọt), tuyến yên, nhau thai, tuyến tiền liệt, cơ xương, da, dây cột sống, lá lách, dạ dày, tinh hoàn, tuyến ức, tuyến giáp, amidan, niệu quản, và tử cung. Đối với từng kiểu mô, ít nhất 3 loại đồng nhất được nhuộm màu và được đánh giá theo khả năng phản ứng miễn dịch GCC.

Nói chung, thử nghiệm GCC IHC bằng cách sử dụng kháng thể MIL-44-148-2 được thể hiện bằng thử nghiệm IHC được bộc lộ theo sáng chế là rất đặc hiệu với các mẫu u ruột kết so với mô nhuộm bình thường, đặc biệt là đối với sự nhuộm đỉnh. Sự nhuộm đỉnh chỉ được phát hiện trong 2 mẫu dạ dày; tuy nhiên, việc nhuộm này cũng quan sát được ở đối chứng âm tính. Việc nhuộm bào chất, thường là nhẹ, quan sát thấy ở vài kiểu mô, bao gồm nang buồng trứng (1 trong 3 mẫu), da (nang và chân bì, 2 trong 3 mẫu), các tế bào đỉnh dạ dày (2 trong 3 mẫu), biểu mô tuyến tiền liệt (chuỗi nhẹ trong 3 trong 3 trường hợp), tuyến yên (2 trong 3 trường hợp), biểu mô tử cung (3 trong 3 trường hợp), biểu mô ống dẫn trứng (2 trong 3 trường hợp), lá nuôi phôi nhau thai (nhẹ trong 2 trong 3 trường hợp) và phổi (nội mạc trong 3 trong 3 trường hợp và biểu mô nhánh cuống phổi trong 1 trong 3 trường hợp). Việc nhuộm bào chất mạnh nhất (2+) có mặt trong một trường hợp của ống dẫn trứng và một trường hợp của tuyến yên. Trong cả hai trường hợp, việc nhuộm ít xảy ra hơn trong cùng khoang đối với đối chứng âm tính. Các tế bào huyết tương là dương tính trong nhiều mô, bao gồm lá lách, amiđan và hạch bạch huyết. Các mô bào là dương tính trong lá lách, phổi và hạch bạch huyết. Việc nhuộm chất nền xảy ra trong tinh hoàn (2 trong 3 trường hợp), tử cung (3 trong 3 trường hợp) và buồng trứng (1 trong 3 trường hợp). Quan sát thấy việc nhuộm ngoại bào mạch máu và dường như là liên kết không đặc hiệu của huyết tương.

Thử nghiệm GCC, bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng của thỏ, MIL-44-148-2, trên giá đỡ nhuộm TechMate thể hiện sự nhuộm màu đồng nhất giữa các lần chạy mẫu và

trong khi chạy mẫu các loại u và viên lắng tế bào đối chứng. Thử nghiệm GCC dường như là có độ nhạy cao đối với caxinom ruột kết vì nó nhuộm màu phần lớn các mẫu u ruột kết được thử nghiệm. Thử nghiệm GCC cũng dường như là đặc hiệu nhiều hơn với các loại u ruột kết so với các mô bình thường. Sự biểu hiện GCC quan sát được ở nhiều khối u ruột kết mạnh hơn nhiều so với sự biểu hiện ở vết nhuộm bất kỳ quan sát được ở 30 mô bình thường bằng ít nhất 3 mẫu lặp thử nghiệm của từng kiểu mô. Việc nhuộm GCC đỉnh không đặc hiệu được phát hiện trong các mô bình thường bất kỳ, trong khi việc nhuộm đỉnh thường xảy ra ở đại đa số mẫu GCC. Chỉ quan sát thấy việc nhuộm bào chất ở một số kiểu mô bình thường và việc nhuộm này thường nhạt. Kháng thể MIL-44-148-2 dường như là chất dấu chuẩn IHC có thể tái tạo, nhạy cảm và tương đối đặc hiệu để nhuộm khối u ruột kết được nhúng parafin và cố định bằng formalin (FFPE).

Ví dụ 4

Hóa mô miễn dịch khác trong mô hình khối u không phải là trực tràng ruột kết PHTX và vi mảng khối u và mẫu lâm sàng trực tràng ruột kết và không phải là trực tràng ruột kết của người

Thử nghiệm IHC tự động hóa được bộc lộ trong ví dụ 3 được dùng để đánh giá sự biểu hiện GCC (nghĩa là sự biểu hiện GCC đỉnh, bào chất và/hoặc kết tụ) trong nhiều loại mẫu không phải là trực tràng ruột kết lấy từ các nguồn khác nhau, bao gồm ghép khác loài khối u nguyên phát của người (PHTX) thu được từ mẫu bệnh nhân ung thư dạ dày và bệnh ung thư tụy từ các con chuột nhắt cái SCID, và nhiều vi mảng (khối u TMA) mua được từ US BioMax, Pantomics và các nguồn thương mại khác) đặc hiệu với bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi và sacôm cơ trơn/sacôm cơ vân. Sự biểu hiện GCC cũng được đánh giá thông qua thử nghiệm IHC tự động hóa được bộc lộ trong ví dụ, 3 trong nhiều mẫu lâm của sàng người, bao gồm các mẫu u dạ dày, tụy và thực quản người thu được từ cơ sở dữ liệu mô chuyên ngành CRO (QualTek) để thử nghiệm IHC tự động hóa, và bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư thực quản, và bệnh ung thư ruột non thu được từ các bệnh nhân ung thư được thử nghiệm về sự biểu hiện GCC trước khi tham gia vào nghiên cứu mở đánh dấu, nhiều tâm, tăng liều, thứ nhất ở người của thể tiếp hợp kháng thể-dược chất hướng đích GCC, được gọi là MLN0264, ở các bệnh nhân là người lớn mắc có khối u ác tính dạ dày-ruột tiến triển biểu hiện Guanylyl xyclaza C (Study C26001, *ClinicalTrials.gov identifier* NCT01577758).

Kết quả của việc nhuộm IHC trong nhiều mẫu mô bình thường và mẫu mô bệnh ung thư trực tràng ruột kết và mô không phải là trực tràng ruột kết (dạ dày, tụy, ruột non, thực quản, phổi, sacôm cơ vân, sacôm cơ trơn) lấy từ các nguồn khác nhau (PHTX, các mẫu lâm sàng của người và vi mảng khối u) được thể hiện trong các bảng 20 đến 32 dưới đây. Các bảng 20 đến 32 bao gồm điểm số IHC (0, 0,5+, 1+, 2+ và 3+) và điểm số H tương đương đã được tính trên cơ sở điểm số IHC đối với cả phép nhuộm GCC đỉnh ("A") và bào chất ("C" hoặc "Bào chất") trong các mô khác nhau được thử nghiệm. Ngoài ra, Bảng 32 thể hiện sự so sánh dữ liệu GCC IHC biểu hiện ở các mẫu lâm sàng bệnh ung thư nguyên phát và di căn ở người, trong mỗi trường hợp được lấy từ cùng bệnh nhân. Như được thể hiện trong cột thứ nhất bên trái các mẫu, "A" (nghĩa là 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A 10A, v.v.), chỉ các mẫu u nguyên phát, trong khi các mẫu "B" (nghĩa là 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, 10B, v.v.) được dùng để biểu thị các mẫu u di căn thu được từ cùng bệnh nhân mà từ đó mẫu u nguyên phát tương đương (tương đương mẫu "A") được lấy. Nói cách khác, gọi là "1A" và "1B" được lần lượt dùng để chỉ các khối u nguyên phát và di căn, thu được từ cùng bệnh nhân; tên gọi "2A" và "2B" lần lượt được dùng để chỉ các khối u nguyên phát và di căn, thu được từ bệnh nhân khác, và v.v.. Đa số mẫu u được thể hiện trong Bảng 32 thu được từ các bệnh nhân bị bệnh ung thư kết tràng nguyên phát và di căn, trừ khi có quy trình khác như được thể hiện trong cột đánh dấu "Bình luận", trong trường hợp đó, kiểu cụ thể của bệnh ung thư không phải là của trực tràng ruột kết sẽ được nêu cụ thể. Như có thể thấy được trong cột "Bình luận" trong Bảng 32, một số mẫu khối u thần kinh nội tiết, caxinom tế bào thận, các khối u dạ dày, mô u đệm dạ dày ruột, các khối u tụy, và u xơ cơ trơn tử cung cũng được sử dụng để biểu hiện GCC bởi thử nghiệm IHC.

Bảng 20: Thử nghiệm IHC trong mô hình PHTX của bệnh ung thư dạ dày ở người

Mẫu số	Kiểu mẫu	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)										Điểm số H	Điểm số H
		0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh
GAF-023	Ghép khác loại caxinom dạ dày			100							100	50	300
GAF-025	Ghép khác loại caxinom dạ dày		100			90		5		5		115	0
GAF-055	Ghép khác loại caxinom dạ dày					70		30			100	130	300
GAF-074	Ghép khác loại caxinom dạ dày	100	90						10			0	20
GAF-075	Ghép khác loại caxinom dạ dày	90	100	10								5	0
GAF-087	Ghép khác loại caxinom dạ dày	100	100									0	0
GAF-114	Ghép khác loại caxinom dạ dày	100	100									0	0
GAF-152	Ghép khác loại caxinom dạ dày	100	100									0	0
GAF-318	Ghép khác loại caxinom dạ dày					60		40	20		80	140	280

Mẫu số	Kiểu mẫu	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)										Điểm số H	Điểm số H
		0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh
GAF-019	Ghép khác loại caxinom dạ dày					60		20		20	100	160	300
GAF-151	Ghép khác loại caxinom dạ dày	50	50	50					40		10	25	110
GAM-006	Ghép khác loại caxinom dạ dày		100	50		40		10				85	0
GAM-016	Ghép khác loại caxinom dạ dày	100	100									0	0
GAM-022	Ghép khác loại caxinom dạ dày		100	100								50	0
GAM-031	Ghép khác loại caxinom dạ dày	90	100	10								5	0
GAM-033	Ghép khác loại caxinom dạ dày	70	30	20		10			40		30	20	170
GAM-037	Ghép khác loại caxinom dạ dày	100	100									0	0
GAM-042	Ghép khác loại caxinom dạ dày	100	100									0	0
GAM-044	Ghép khác loại caxinom dạ dày					50		50	50		50	150	250

Mẫu số	Kiểu mẫu	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)										Điểm số H	Điểm số H
		0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh
GAM-046	Ghép khác loại caxinom dạ dày	50	100	50								25	0
GAM-060	Ghép khác loại caxinom dạ dày					20		30		50	100	230	300
GAM-080	Ghép khác loại caxinom dạ dày	80	100	20								10	0
GAM-093	Ghép khác loại caxinom dạ dày	10	20	10		20	10	30	40	30	30	175	180
GAM-095	Ghép khác loại caxinom dạ dày	80	100	10		10						15	0
GAM-098	Ghép khác loại caxinom dạ dày		10	70		30			40		50	65	230
GAM-110	Ghép khác loại caxinom dạ dày	50	100	50								25	0
GAM-119	Ghép khác loại caxinom dạ dày		100					40		60		260	0
GAM-138	Ghép khác loại caxinom dạ dày	100	100									0	0
GAM-139	Ghép khác loại caxinom dạ dày	90	90	10			10					5	10

Bảng 21: Mô hình PHTX của bệnh ung thư tụy ở người

Mẫu số	Kiểu khối u	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
117	Dạ dày		40	100	20		20		20	Dương tính	100	60	100	120
118	Tuyến tụy		100	50		40		10		Dương tính	100	0	160	0
119	Tuyến tụy		50		50	60		40		Dương tính	100	50	240	50
120	Dạ dày	30	70	70	30					Dương tính	70	30	70	30
121	Tuyến tụy	20	20	80	70		10			Dương tính	80	80	80	90
122	Tuyến tụy				50	50	50	50		Dương tính	100	100	250	150
123	Dạ dày		100			50		50		Dương tính	100	0	250	0
124	Tuyến tụy	30	80	50	10	20	10			Dương tính	70	20	90	30
125	Tuyến tụy				20	50	50	50	30	Dương tính	100	100	250	210
126	Tuyến tụy		50	80	20	20	20		10	Dương tính	100	50	120	90
127	Tuyến tụy	50		50			20		80	Dương tính	50	100	50	280
128	Tuyến tụy			20		40		40	100	Dương tính	100	100	220	300
129	Tuyến tụy	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
130	Tuyến tụy		80	80	20	20				Dương tính	100	20	120	20
131	Tuyến tụy					50		50	100	Dương tính	100	100	250	300
132	Tuyến tụy		30	20	30	40	30	40	10	Dương tính	100	70	220	120

Mẫu số	Kiểu khối u	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
133	Tuyến tụy	100	100							Âm tính	0	0	0	0
134	Tuyến tụy			40	40	40	40	20	20	Dương tính	100	100	180	180
135	Tuyến tụy		70	70	20	30	10			Dương tính	100	30	130	40
136	Tuyến tụy		30		30	100	30		10	Dương tính	100	70	200	120
137	Tuyến tụy					70	50	30	50	Dương tính	100	100	230	250
138	Tuyến tụy		0	100						Dương tính	100	0	100	0
139	Tuyến tụy			50	40	50	30		30	Dương tính	100	100	150	190
140	Tuyến tụy		50	100	50					Dương tính	100	50	100	50
141	Tuyến tụy	30	40	40	30	30	30			Dương tính	70	60	100	90
142	Tuyến tụy		100	30		70				Dương tính	100	0	170	0
143	Tuyến tụy		30		30	50	20	50	20	Dương tính	100	70	250	130
144	Tuyến tụy		20	50	20	50	20		40	Dương tính	100	80	150	180
145	Tuyến tụy			40		30		30	100	Dương tính	100	100	190	300

Bảng 22A: Nhuộm GCC IHC trong vi mảng khối u US Biomax P1921 (TMA tuyến tụy)

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A1	48	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến (viêm mô tụy mạn tính)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A2	41	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1													
A3	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100							100	Dương tính	0	100	0	300
A4	42	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A5	47	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1													
A6	54	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1													
A7	40	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2			30		70			100	Dương tính	100	100	170	300
A8	54	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A9	48	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A10	41	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến (rải rác)	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A11	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100					50		50	Dương tính	0	100	0	250
A12	42	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A13	47	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến (rải rác)	1													
A14	54	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1	50	10	50	40		40		10	Dương tính	50	90	50	150
A15	40	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1			30		70			100	Dương tính	100	100	170	300
A16	54	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B1	51	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B2	54	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	80	80	20	20					Dương tính	20	20	20	20
B3	60	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1	90	90	10	10					Dương tính	10	10	10	10
B4	47	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B5	39	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B6	54	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B7	62	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100	80		10		10			Dương tính	0	20	0	30
B8	64	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B9	51	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
B10	54	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	70	50	30					Dương tính	50	30	50	30
B11	60	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B12	47	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B13	39	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
B14	54	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B15	62	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100	80		20					Dương tính	0	20	0	20
B16	64	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến (rải rác)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C1	67	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
C2	65	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20
C3	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	50		50					Dương tính	0	50	0	50
C4	48	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		50	100	50					Dương tính	100	50	100	50

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C5	76	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		80	100	20					Dương tính	100	20	100	20
C6	43	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến (fibrofatty mô)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C7	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	70				30			Dương tính	0	30	0	60
C8	49	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1	100	80		20					Dương tính	0	20	0	20
C9	67	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	80		20					Dương tính	0	20	0	20
C10	65	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	80	50	20	50					Dương tính	20	50	20	50
C11	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20
C12	48	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20
C13	76	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	40	50	50		10			Dương tính	50	60	50	70

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C14	43	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến (mô xơ chất béo viêm mạn tính)	-	90	90	10	10					Dương tính	10	10	10	10
C15	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2													
C16	49	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D1	52	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		20	80	20		20	20	40	Dương tính	100	80	140	180
D2	72	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D3	53	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D4	55	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D5	51	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D6	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (fibrofatty mô)	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
D7	49	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D8	64	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
D9	52	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		10	100	30		30		30	Dương tính	100	90	100	180
D10	72	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D11	53	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
D12	55	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
D13	51	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D14	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (mô xơ chất	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
			béo viêm mạn tính)														
D15	49	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D16	64	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		90	100	10					Dương tính	100	10	100	10
E1	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	50	50	50					Dương tính	50	50	50	50
E2	72	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (rải rác)	-	50	90	50	10					Dương tính	50	10	50	10
E3	42	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	40	50	30		30			Dương tính	50	60	50	90
E4	55	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
E5	47	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (mô ống tụy)	-			100	100					Dương tính	100	100	100	100
E6	44	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2													

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E7	59	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E8	34	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1		50	100	30		20			Dương tính	100	50	100	70
E9	57	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20
E10	72	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	70	50	30					Dương tính	50	30	50	30
E11	42	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2													
E12	55	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E13	47	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	50	50	50					Dương tính	50	50	50	50
E14	44	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2													
E15	59	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (rải rác)	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E16	34	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1													
F1	61	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F2	39	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
F3	44	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		90	100	10					Dương tính	100	10	100	10
F4	59	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	1	80		20	70		20		10	Dương tính	20	100	20	140
F5	67	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F6	72	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	90	50	10					Dương tính	50	10	50	10
F7	41	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
F8	51	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	80		20	70		30			Dương tính	20	100	20	130
F9	61	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F10	39	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F11	44	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		70	80		20	30			Dương tính	100	30	120	60
F12	59	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2			80	30	20	30		40	Dương tính	100	100	120	210
F13	67	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F14	72	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	90	50	10					Dương tính	50	10	50	10
F15	41	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
F16	51	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	50	50	40		10			Dương tính	50	50	50	60
G1	41	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G2	58	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G3	60	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	50	50	50					Dương tính	50	50	50	50

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G4	41	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	90	50	10					Dương tính	50	10	50	10
G5	68	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
G6	52	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (rải rác) kèm theo hoại tử	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
G7	51	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2		90	100	10					Dương tính	100	10	100	10
G8	76	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2		20	80	40	20	40			Dương tính	100	80	120	120
G9	41	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G10	58	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
G11	60	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	50	50	50					Dương tính	50	50	50	50
G12	41	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		50	100	30		20			Dương tính	100	50	100	70

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G13	68	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2		80	100	20					Dương tính	100	20	100	20
G14	52	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (rải rác) kèm theo hoại tử	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
G15	51	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	50	50	50					Dương tính	50	50	50	50
G16	76	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2													
H1	62	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H2	51	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
H3	60	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H4	76	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	60	100	30		10				Dương tính	40	0	50	0
H5	78	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H6	53	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H7	48	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
H8	55	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	3	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20
H9	62	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H10	51	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
H11	60	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H12	76	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (mô xơ và mạch máu)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H13	78	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
H14	53	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2		90	100	10					Dương tính	100	10	100	10

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H15	48	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H16	55	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2		100	90		10				Dương tính	100	0	110	0
I1	59	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2--3	50	90	50	10					Dương tính	50	10	50	10
I2	62	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I3	67	Nam	Bệnh ung thư tuyến (rải rác)	-		100	50		50				Dương tính	100	0	150	0
I4	66	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
I5	49	Nam	Caxinom tuyến vảy (mô xơ và mạch máu)	-													
I6	50	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
I7	73	Nam	Caxinom không biệt hóa	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I8	65	Nam	Caxinom không biệt hóa	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
I9	59	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20
I10	62	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến (rải rác)	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I11	67	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3		100	50		50				Dương tính	100	0	150	0
I12	66	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
I13	49	Nam	Caxinom tuyến vảy	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
I14	50	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3		80	100	20					Dương tính	100	20	100	20

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
I15	73	Nam	Caxinom không biệt hóa	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
I16	65	Nam	Caxinom không biệt hóa	-													
J1	56	Nữ	Caxinom không biệt hóa	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J2	52	Nữ	U hạch	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J3	51	Nam	U hạch không điển hình	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J4	42	Nam	Caxinom thần kinh nội tiết	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J5	52	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	1	50	90	50	10					Dương tính	50	10	50	10
J6	45	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đính & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
J7	49	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2													
J8	65	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2													
J9	56	Nữ	Caxinom không biệt hóa	-	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
J10	52	Nữ	U hạch	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J11	51	Nam	U hạch không điển hình	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J12	42	Nam	Caxinom thần kinh nội tiết	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J13	52	Nữ	Bệnh ung thư tuyến (viêm mô tụy mạn tính)	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
J14	45	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	50	80	50			20			Dương tính	50	20	50	40

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
J15	49	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2													
J16	65	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2													
K1	52	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2		80	100	20					Dương tính	100	20	100	20
K2	56	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2		90	100	10					Dương tính	100	10	100	10
K3	76	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K4	45	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K5	41	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3			50		50	50		50	Dương tính	100	100	150	250
K6	62	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3													
K7	50	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K8	60	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3													

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
K9	52	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
K10	56	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20
K11	76	Nữ	Bệnh ung thư tuyến (rải rác) của gan	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K12	45	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K13	41	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3													
K14	62	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K15	50	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K16	60	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L1	56	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	3													
L2	49	Nữ	Caxinom tuyến vảy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
L3	25	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
L4	38	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	50	90	50	10					Dương tính	50	10	50	10
L5	42	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2													
L6	59	Nam	Bệnh ung thư tuyến (mô tuyến tụy)	-		100			50		50		Dương tính	100	0	250	0
L7	60	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L8	13	Nữ	Caxinom rắn giả tụy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L9	56	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L10	49	Nữ	Caxinom tuyến vảy	-	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
L11	25	Nam	Bệnh ung thư tuyến (rải rác)	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L12	38	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10

TMA Tuyến tụy USBiomax PA1921																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
L13	42	Nam	Bệnh ung thư ống tuyến	2	100	40		40		20			Dương tính	0	60	0	80
L14	59	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3		100			50		50		Dương tính	100	0	250	0
L15	60	Nữ	Bệnh ung thư ống tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L16	13	Nữ	Caxinom rắn giả tụy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

Bảng 22B: Tóm tắt về việc nhuộm GCC ở vi mảng khối u tuyến tụy US Biomax P1921 (TMA)

% Dương tính trung bình	% Dương tính trung bình	H trung bình	H trung bình	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	Dương tính	N	Dương tính
33	16	38	25	106	171	62%

Bảng 23A: Nhuộm GCC IHC ở vi mảng khối u tuyến tụy US Biomax PA1002 (TMA)

TMA tuyến tụy USBiomax PA1002																	
					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A1	65	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2													
A2	52	Nam	Bệnh ung thư tuyến	1													
A3	45	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2		80	100			10		10	Dương tính	100	20	100	50
A4	44	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2				100		100			Dương tính	0	200	0	300
A5	47	Nam	Bệnh ung thư tuyến (rải rác)	1		90	100			10			Dương tính	100	10	100	20
B1	55	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B2	57	Nam	Bệnh ung thư tuyến (rải rác) kèm theo hoại tử	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B3	34	Nam	Bệnh ung thư tuyến	1	80	80			20	20			Dương tính	20	20	40	40

TMA tuyến tụy USBiomax PA1002																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B4	56	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	1	100	80				20			Dương tính	0	20	0	40
B5	42	Nam	Bệnh ung thư tuyến	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C1	39	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C2	44	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
C3	59	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	70	80	20	10					Dương tính	20	10	20	10
C4	65	Nam	Bệnh ung thư tuyến (fibrofatty mô)	-													
C5	67	Nữ	Bệnh ung thư tuyến (viêm mô tụy mạn tính)	-	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
D1	53	Nam	Bệnh ung thư tuyến	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA tuyến tụy USBiomax PA1002																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D2	52	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	80	60	20	20		20			Dương tính	20	40	20	60
D3	72	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	1	50	90	50	10					Dương tính	50	10	50	10
D4	58	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	30	100	70						Dương tính	70	0	70	0
D5	41	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E1	51	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	90	80	10	20					Dương tính	10	20	10	20
E2	41	Nam	Bệnh ung thư tuyến (rải rác)	-													
E3	68	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
E4	41	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E5	72	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA tuyến tụy USBiomax PA1002																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F1	76	Nữ	Bệnh ung thư tuyến kèm theo hoại tử	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F2	52	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	30	100	70						Dương tính	70	0	70	0
F3	60	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
F4	76	Nam	Bệnh ung thư tuyến (rải rác)	2	80	90	20	10					Dương tính	20	10	20	10
F5	78	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G1	41	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2	70	50	30			20		30	Dương tính	30	50	30	130
G2	62	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G3	51	Nam	Bệnh ung thư tuyến (rải rác)	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G4	50	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3		100	100						Dương tính	100	0	100	0

TMA tuyến tụy USBiomax PA1002																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G5	60	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2													
H1	53	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H2	59	Nam	Bệnh ung thư tuyến	2		100	70		30				Dương tính	100	0	130	0
H3	56	Nam	Bệnh ung thư tuyến	3		100	50		50				Dương tính	100	0	150	0
H4	60	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	3													
H5	66	Nữ	Bệnh ung thư tuyến (mô xơ và mạch máu)	-													
I1	40	Nam	Mô tụy bình thường	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I2	47	Nam	Mô tụy bình thường	-										0	0	0	0
I3	25	Nam	Mô tụy bình thường	-		70	100			30			Dương tính	100	30	100	60

TMA tuyến tụy USBiomax PA1002																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
I4	35	Nữ	Mô tụy bình thường	-										0	0	0	0
I5	30	Nam	Mô tụy bình thường	-		70	100	30					Dương tính	100	30	100	30
J1	50	Nam	Mô tụy bình thường	-		100	100						Âm tính	100	0	100	0
J2	30	Nam	Mô tụy bình thường	-		100	100						Âm tính	100	0	100	0
J3	40	Nam	Mô tụy bình thường	-										0	0	0	0
J4	35	Nam	Mô tụy bình thường	-										0	0	0	0
J5	21	Nữ	Mô tụy bình thường	-										0	0	0	0

Bảng 23B: Tóm tắt về việc nhuộm GCC ở vi mảng khối u tuyến tụy US Biomax PA1002 (TMA)

% Dương tính	% Dương tính	H	H	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	Dương tính	N	Dương tính
35	12	38	21	22	33	67%

Bảng 24A: Nhuộm GCC IHC ở vi mảng khối u tuyến tụy PAC481 Pantomics – Phần 1

TMA Tuyến tụy PAC481 Pantomics -Phần 1																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A01	46	Nam	Bình thường	-										0	0	0	0
A02	48	Nam	Bình thường	-										0	0	0	0
A03	58	Nữ	Bình thường	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A04	28	Nữ	Khối u tế bào tiểu đảo	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A05	44	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
A06	64	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A07	39	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I			50		50			100	Dương tính	100	100	150	300
A08	49	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I	90	100			10				Dương tính	10	0	20	0
C01	56	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I													
C02	49	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA Tuyến tụy PAC481 Pantomics -Phần 1																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C03	52	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C04	42	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
C05	54	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C06	59	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100	30						Dương tính	30	0	30	0
C07	34	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II		100	100	20					Dương tính	100	20	100	20
C08	69	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E01	40	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100							Âm tính	0	0		
E02	79	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E03	76	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E04	52	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0

TMA Tuyến tụy PAC481 Pantomics -Phần 1																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E05	51	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
E06	42	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III													
E07	40	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
E08	64	Nam	Caxinom di căn	II													

Bảng 24B: Tóm tắt về việc nhuộm GCC ở TMA Tuyến tụy PAC481Pantomics - Phần 1

% dương tính	% dương tính	H	H	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	dương tính	N	dương tính
29	7	34	19	10	18	56%

Bảng 24C: Nhuộm GCC IHC ở Vi mảng khối u tuyến tụy PAC481Pantomics - Phần 2

TMA Tuyến tụy PAC481 Pantomics - Phần 2																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B01	46	Nam	Bình thường	-													
B02	48	Nam	Bình thường	-													
B03	58	Nữ	Bình thường	-													
B04	28	Nữ	Khối u tế bào tiểu đảo	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B05	44	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B06	64	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I	70	70	30	30					Dương tính	30	30	30	30
B07	39	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I			100					100	Dương tính	100	100	100	300
B08	49	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
D01	**56**	**Nữ**	**Bệnh ung thư tuyến**	**I**	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0
D02	**49**	**Nữ**	**Bệnh ung thư tuyến**	**II**	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0

TMA Tuyến tụy PAC481 Pantomics - Phần 2																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D03	**52**	**Nữ**	**Bệnh ung thư tuyến**	**II**	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0
D04	42	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II	90	100	10						**Dương tính**	10	0	10	0
D05	54	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0
D06	59	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	80	100	20						**Dương tính**	20	0	20	0
D07	34	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II		100	100						**Dương tính**	100	0	100	0
D08	69	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0
F01	40	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0
F02	79	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0
F03	76	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0

TMA Tuyến tụy PAC481 Pantomics - Phần 2																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính/Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F04	52	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							**Âm tính**	0	0	0	0
F05	51	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	60	100	40						**Dương tính**	40	0	40	0
F06	42	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	50	100	50						**Dương tính**	50	0	50	0
F07	40	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
F08	**64**	**Nam**	Caxinom di căn	II	100	70			30				Dương tính	30	0	60	0

Bảng 24D: Tóm tắt về việc nhuộm GCC ở TMA tuyến tụy PAC481 Pantomics - Phần 2

% dương tính	% dương tính	H	H	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	dương tính	N	dương tính
21	7	21	17	10	21	48%

Bảng 25: Nhuộm GCC IHC trong vi mảng khối u dạ dày US Biomax STC1501 - Phần 1

TMA Dạ dày USBiomax STC1501– phần 1																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A1	35	Nam	Bình thường	-													
A2	83	Nam	Bình thường	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
A3	53	Nam	Bệnh viêm dạ dày mạn tính	-		70	100					30	Dương tính	100	30	100	90
A4	54	Nam	Bệnh viêm dạ dày mạn tính	-			50		20	50	30	50	Dương tính	100	100	180	250
A5	59	Nam	Khối u mô đệm dạ dày	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A6	68	Nữ	Tế bào bệnh ung thư tuyến Signet-ring	-		100			100				Dương tính	100	0	200	0
A7	42	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III		100	100						Dương tính	100	0	100	0
A8	44	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II~III		20	50		50	30		50	Dương tính	100	80	150	210

TMA Dạ dày USBiomax STC1501– phần 1																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A9	54	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I		50			100	20		30	Dương tính	100	50	200	130
A10	51	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III		100	100						Dương tính	100	0	100	0
A11	61	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III					100	50		50	Dương tính	100	100	200	250
A12	50	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II		70			100			30	Dương tính	100	30	200	90
A13	53	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III		100	70		30				Dương tính	100	0	130	0
A14	55	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III		100			70		30		Dương tính	100	0	230	0
A15	73	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II													
C1	47	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II~III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C2	70	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III	50	50	50					50	Dương tính	50	50	50	150

TMA Dạ dày USBiomax STC1501– phần 1

					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C3	36	Nam	Bệnh ung thư tuyến	I~II	100	50						50	Dương tính	0	50	0	150
C4	65	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	60	70			20		20	30	Dương tính	40	30	100	90
C5	62	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C6	77	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
C7	45	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I~II	100	30						70	Dương tính	0	70	0	210
C8	67	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III	70	90	30			10			Dương tính	30	10	30	20
C9	62	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C10	55	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II~III	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
C11	75	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III		100	100						Dương tính	100	0	100	0

TMA Dạ dày USBiomax STC1501– phần 1

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C12	73	Nam	Caxinom không biệt hóa	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C13	41	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III	50	80	50	10		10			Dương tính	50	20	50	30
C14	58	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III	70	80	30	20					Dương tính	30	20	30	20
C15	52	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I~II		40			100	30		30	Dương tính	100	60	200	150
E1	63	Nam	Khối u mô đệm dạ dày	-	60	100	20		20				Dương tính	40	0	60	0
E2	72	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II		100	20		30		50		Dương tính	100	0	230	0
E3	57	Nam	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E4	60	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E5	66	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III													

TMA Dạ dày USBiomax STC1501– phần 1

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E6	62	Nam	Bệnh ung thư tuyến	I~II			10		60		30	10 0	Dương tính	100	100	220	300
E7	48	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	50	100	20		30				Dương tính	50	0	80	0
E8	60	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III		100	20		30		50		Dương tính	100	0	230	0
E9	56	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III		100	50				50		Dương tính	100	0	200	0
E10	54	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E11	64	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III		100	30				70		Dương tính	100	0	240	0
E12	59	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	80	100			20				Dương tính	20	0	40	0
E13	75	Nam	Caxinom không biệt hóa	-	30	100					70		Dương tính	70	0	210	0
E14	65	Nam	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-		100					10 0		Dương tính	100	0	300	0

TMA Dạ dày USBiomax STC1501 – phần 1

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E15	35	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III		100			70		30		Dương tính	100	0	230	0
G1	71	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
G2	38	Nam	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-	50	100			50				Dương tính	50	0	100	0
G3	68	Nam	Khối u mô đệm dạ dày	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G4	56	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	I~II			50		30		20	100	Dương tính	100	100	170	300
G5	45	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G6	45	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G7	74	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G8	24	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II	30	50	50		20	50			Dương tính	70	50	90	100

TMA Dạ dày USBiomax STC1501– phần 1																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G9	51	Nam	U lympho bào	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G10	53	Nam	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
G11	58	Nữ	U lympho bào	-													
G12	58	Nữ	U lympho bào	-													
G13	81	Nam	Bệnh ung thư tuyến	I~II	20	70	50	30	30				Dương tính	80	30	110	30
G14	56	Nam	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-													
G15	35	Nam	Bệnh ung thư tuyến	I~II			100			100			Dương tính	100	100	100	200
I1	61	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I2	42	Nam	Caxinom không biệt hóa	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA Dạ dày USBiomax STC1501– phần 1

					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
I3	78	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I4	65	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	III	40	80	20		40			20	Dương tính	60	20	100	60
I5	68	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I6	60	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II~III													
I7	53	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	100	50						50	Dương tính	0	50	0	150
I8	76	Nữ	Bệnh ung thư tuyến Namucinous	II		100			20		80		Dương tính	100	0	280	0
I9	50	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II													
I10	74	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA Dạ dày USBiomax STC1501– phần 1																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
I11	75	Nữ	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-		100					100		Dương tính	100	0	300	0
I12	68	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II~III		70	100					30	Dương tính	100	30	100	90
I13	56	Nữ	Bệnh ung thư tuyến	II~III													
I14	53	Nữ	U lympho bào	-													
I15	80	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II		100			100				Dương tính	100	0	200	0

Bảng 25B: Tóm tắt về việc nhuộm GCC trong TMA Dạ dày US Biomax STC1501 - Phần 1

% dương tính	% dương tính	H	H	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	dương tính	N	dương tính
57	17	100	45	47	61	77%

Bảng 25C: Nhuộm GCC IHC trên vi mảng khối u dạ dày US Biomax STC1501 - Phần 2

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B1	Nam	35	Bình thường	-	100	100								0	0	0	0
B2	Nam	83	Bình thường	-		90	100					10		100	10	100	30
B3	Nam	53	Bệnh viêm dạ dày mạn tính	-		100	100							100	0	100	0
B4	Nam	54	Bệnh viêm dạ dày mạn tính	-					50		50	100		100	100	250	300
B5	Nam	59	Khối u mô đệm dạ dày	-	100	100								0	0	0	0
B6	Nữ	68	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-	50	100			50					50	0	100	0
B7	Nam	42	Bệnh ung thư tuyến	III		100	50		50					100	0	150	0
B8	Nữ	44	Bệnh ung thư tuyến	II~III		100			50		50			100	0	250	0
B9	Nữ	54	Bệnh ung thư tuyến	I					100	30		70		100	100	200	270
B10	Nam	51	Bệnh ung thư tuyến	II~III		90	100			10				100	10	100	20

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B11	Nam	61	Bệnh ung thư tuyến	II~III					100			100		100	100	200	300
B12	Nam	50	Bệnh ung thư tuyến	II													
B13	Nữ	53	Bệnh ung thư tuyến	III		100	90				10			100	0	120	0
B14	Nam	55	Bệnh ung thư tuyến	III		100	40		30		30			100	0	190	0
B15	Nữ	73	Bệnh ung thư tuyến	II		100	100							100	0	100	0
D1	Nữ	47	Bệnh ung thư tuyến	II~III	100	100								0	0	0	0
D2	Nam	70	Bệnh ung thư tuyến	II~III		50	100					50		100	50	100	150
D3	Nam	36	Bệnh ung thư tuyến	I~II	100	50						50		0	50	0	150
D4	Nam	65	Bệnh ung thư tuyến	III		100	20		30		50			100	0	230	0
D5	Nam	62	Bệnh ung thư tuyến	III	90	90	10	10						10	10	10	10

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D6	Nam	77	Bệnh ung thư tuyến	II~III	40	100	30		30					60	0	90	0
D7	Nữ	45	Bệnh ung thư tuyến	I~II	100	50						50		0	50	0	150
D8	Nam	67	Bệnh ung thư tuyến	II~III	80	90	10		10	10				20	10	30	20
D9	Nam	62	Bệnh ung thư tuyến	II~III	100	100								0	0	0	0
D10	Nữ	55	Bệnh ung thư tuyến	II~III	100	100								0	0	0	0
D11	Nam	75	Bệnh ung thư tuyến	III	50	100			50					50	0	100	0
D12	Nam	73	Caxinom không biệt hóa	-	100	100								0	0	0	0
D13	Nam	41	Bệnh ung thư tuyến	II~III					100			100		100	100	200	300
D14	Nam	58	Bệnh ung thư tuyến	II~III	100	90				10				0	10	0	20
D15	Nữ	52	Bệnh ung thư tuyến	I~II		80			100			20		100	20	200	60

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F1	Nam	63	Khối u mô đệm dạ dày	-	80	100	20							20	0	20	0
F2	Nam	72	Bệnh ung thư tuyến	II		100	20		30		50			100	0	230	0
F3	Nam	57	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-	100	100								0	0	0	0
F4	Nam	60	Bệnh ung thư tuyến	III													
F5	Nữ	66	Bệnh ung thư tuyến	III		100	30		50		20			100	0	190	0
F6	Nam	62	Bệnh ung thư tuyến	I~II					100			100		100	100	200	300
F7	Nữ	48	Bệnh ung thư tuyến	III	50	100	50							50	0	50	0
F8	Nam	60	Bệnh ung thư tuyến	II~III	40	50			50	10	10	50		60	60	130	170
F9	Nam	56	Bệnh ung thư tuyến	III		100			100					100	0	200	0
F10	Nam	54	Bệnh ung thư tuyến	III	80	100	20							20	0	20	0

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F11	Nữ	64	Bệnh ung thư tuyến	III		100	50		20		30			100	0	180	0
F12	Nam	59	Bệnh ung thư tuyến	III	80	100			20					20	0	40	0
F13	Nam	75	Caxinom không biệt hóa	-	100	100								0	0	0	0
F14	Nam	65	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-		100					100			100	0	300	0
F15	Nữ	35	Bệnh ung thư tuyến	III		100	30		50		20			100	0	190	0
H1	Nam	71	Bệnh ung thư tuyến	III	90	100	10							10	0	10	0
H2	Nam	38	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-													
H3	Nam	68	Khối u mô đệm dạ dày	-	100	100								0	0	0	0

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H4	Nữ	56	Bệnh ung thư tuyến	I~II					100			100		100	100	200	300
H5	Nam	45	Bệnh ung thư tuyến	II		100	100							100	0	100	0
H6	Nam	45	Bệnh ung thư tuyến	III		100	100							100	0	100	0
H7	Nam	74	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100								0	0	0	0
H8	Nữ	24	Bệnh ung thư tuyến	II	80	80			20			20		20	20	40	60
H9	Nam	51	U lympho bào?	-													
H10	Nam	53	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-	70	100	30							30	0	30	0
H11	Nữ	58	U lympho bào	-													
H12	Nữ	58	U lympho bào	-													
H13	Nam	81	Bệnh ung thư tuyến	I~II		90	100	10						100	10	100	10

					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H14	Nam	56	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-													
H15	Nam	35	Bệnh ung thư tuyến	I~II		70	80		20			30		100	30	120	90
J1	Nam	61	Bệnh ung thư tuyến	II	80	100	20							20	0	20	0
J2	Nam	42	Caxinom không biệt hóa	-													
J3	Nam	78	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100								0	0	0	0
J4	Nữ	65	Bệnh ung thư tuyến	III		50	50		50			50		100	50	150	150
J5	Nam	68	Bệnh ung thư tuyến	II~III	100	80				20				0	20	0	40
J6	Nam	60	Bệnh ung thư tuyến	II~III		100			50		50			100	0	250	0
J7	Nam	53	Bệnh ung thư tuyến	II	50	80	50			10		10		50	20	50	50

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
J8	Nữ	76	Bệnh ung thư tuyến nhày	II													
J9	Nam	50	Bệnh ung thư tuyến	II		40			100	30		30		100	60	200	150
J10	Nam	74	Bệnh ung thư tuyến	III	100	100								0	0	0	0
J11	Nữ	75	Bệnh ung thư tế bào tuyến tế bào hình nhẫn	-		100					100			100	0	300	0
J12	Nữ	68	Bệnh ung thư tuyến	II~III	90	70	10			30				10	30	10	60
J13	Nữ	56	Bệnh ung thư tuyến	II~III													
J14	Nữ	53	U lympho bào	-													
J15	Nam	80	Bệnh ung thư tuyến	II		100			100					100	0	200	0

Bảng 25D: Tóm tắt về việc nhuộm GCC trên TMA Dạ dày US Biomax STC1501 - Phần 2

% dương tính	% dương tính	H	H	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	dương tính	N	dương tính
58	17	102	43	49	59	83%

30605

Bảng 26A: Nhuộm GCC IHC trên vi mảng khối u thực quản Pantomics ESC1021

TMA thực quản Pantomics ESC1021																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A01	56	Nam	Bình thường		100	100							Âm tính	0	0	0	0
A02	53	Nam	Bình thường		100	100							Âm tính	0	0	0	0
A03	53	Nam	Bình thường		100	100							Âm tính	0	0	0	0
A04	62	Nam	Bệnh viêm thực quản		100	100							Âm tính	0	0	0	0
A05	66	Nam	Bệnh viêm thực quản		100	100							Âm tính	0	0	0	0
A06	58	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	30	100			20		50		Dương tính	70	0	190	0
A07	36	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A08	72	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	50	100			50				Dương tính	50	0	100	0
A09	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A10	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	70	100			30				Dương tính	30	0	60	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021																		
					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính		H	
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	
A11	68	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	100	100							Âm tính	0	0	0	0	0
A12	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0	0
A13	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0	0
B01	60	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	100	100							Âm tính	0	0	0	0	0
B02	50	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	90	100					10		Dương tính	10	0	30	0	0
B03	44	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	70	100			30				Dương tính	30	0	60	0	0
B04	60	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	100	100							Âm tính	0	0	0	0	0
B05	64	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0	0
B06	55	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021

					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B07	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	60	100			20		20		Dương tính	40	0	100	0
B08	48	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I	80	100			20				Dương tính	20	0	40	0
B09	51	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B10	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B11	71	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B12	55	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	80	100			10		10		Dương tính	20	0	50	0
B13	58	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
C01	26	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	30	100			70				Dương tính	70	0	140	0
C02	56	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính / Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C03	65	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	30	100			70				Dương tính	70	0	140	0
C04	43	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	30	100	60		10				Dương tính	70	0	80	0
C05	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
C06	55	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
C07	59	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	70	100			30				Dương tính	30	0	60	0
C08	42	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
C09	61	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	20	100	80						Dương tính	80	0	80	0
C10	57	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
C11	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II		100	10 0						Dương tính	100	0	100	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C12	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	80	100			10		10		Dương tính	20	0	50	0
C13	55	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
D01	70	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D02	68	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
D03	55	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	90	100			10				Dương tính	10	0	20	0
D04	65	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
D05	60	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II		100	10 0						Dương tính	100	0	100	0
D06	66	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
D07	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D08	68	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D09	55	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
D10	60	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
D11	61	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D12	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D13	71	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II		100			100				Dương tính	100	0	200	0
E01	57	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
E02	64	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	50	100	20		30				Dương tính	50	0	80	0
E03	72	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính / Âm tính	% Dương tính Bào chất	% Dương tính Đỉnh	H Bào chất	H Đỉnh
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
E04	74	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E05	51	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	80	100			20				Dương tính	20	0	40	0
E06	61	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E07	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E08	63	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E09	71	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	I~II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E10	51	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II													
E11	54	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
E12	77	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	80	70	20					30	Dương tính	20	30	20	90

TMA thực quản Pantomics ESC1021

Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính / Âm tính	% Dương tính Bào chất	% Dương tính Đỉnh	H Bào chất	H Đỉnh
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
E13	64	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F01	45	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F02	52	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F03	59	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II		100	50						Dương tính	50	0	50	0
F04	68	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II		100	100						Dương tính	100	0	100	0
F05	53	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F06	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II		100			50		50		Dương tính	100	0	250	0
F07	67	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F08	54	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F09	67	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F10	56	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
F11	56	Nam	Bệnh ung thư tuyến	II	20				80			100	Dương tính	80	100	160	300
F12	57	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III	80	100			20				Dương tính	20	0	40	0
F13	53	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III	70	100			30				Dương tính	30	0	60	0
G01	57	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G02	47	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G03	66	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G04	47	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G05	53	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G06	57	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
G07	59	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G08	42	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	II~III		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G09	49	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G10	48	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G11	67	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G12	58	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H01	58	Nam	Bệnh ung thư tuyến	III		100	100						Dương tính	100	0	100	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H02	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H03	61	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
H04	72	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H05	60	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H06	49	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III		100	50		50				Dương tính	100	0	150	0
H07	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H08	53	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H09	66	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	III	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H10	65	Nam	U hạch		100	100							Âm tính	0	0	0	0
H11	55	Nam	Caxinom tuyến vảy		100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA thực quản Pantomics ESC1021																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H12	60	Nam	Caxinom không biệt hóa		100	100							Âm tính	0	0	0	0

Bảng 26B: Tóm tắt về việc nhuộm GCC trên vi mảng khối u thực quản Pantomics ESC1021

% dương tính	% dương tính	H	H	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	dương tính	N	dương tính
28	1	39	4	57	96	59%

Bảng 27A: Nhuộm GCC IHC trên vi mảng khối u thực quản US BioMax ES8010 - Phần 1

TMA thực quản USBioNamax ES8010 - Phần 1																	
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A1	69	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
A3	56	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1	50	100					50		Dương tính	50	0	150	0
A5	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	80	100			20				Dương tính	20	0	40	0
A7	58	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1		100			70		30		Dương tính	100	0	230	0
A9	46	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1	50	100			50				Dương tính	50	0	100	0
B1	43	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1	40	100	30				30		Dương tính	60	0	120	0
B3	61	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B5	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	90	100					10		Dương tính	10	0	30	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 - Phần 1																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B7	50	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1	40	100	30		30				Dương tính	60	0	90	0
B9	68	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
C1	65	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C3	50	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
C5	60	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	70	100			30				Dương tính	30	0	60	0
C7	49	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	80	100			20				Dương tính	20	0	40	0
C9	59	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
D1	43	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	80	100			20				Dương tính	20	0	40	0
D3	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	60	100	40						Dương tính	40	0	40	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 - Phần 1

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D5	62	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	90	100			10				Dương tính	10	0	20	0
D7	60	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2		100	70		30				Dương tính	100	0	130	0
D9	54	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
E1	48	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
E3	57	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E5	58	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
E7	53	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E9	56	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	30	100	70						Dương tính	70	0	70	0
F1	76	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 - Phần 1

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F3	60	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy (rải rác thực quản mô)	-	20	100	80						Dương tính	80	0	80	0
F5	53	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F7	49	Nữ	Caxinom tại chỗ	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
F9	62	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G1	48	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G3	57	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G5	45	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G7	55	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G9	53	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 - Phần 1																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H1	68	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H3	64	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	90	100			10				Dương tính	10	0	20	0
H5	55	Nam	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H7	63	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H9	54	Nữ	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0

Bảng 27B: Tóm tắt về việc nhuộm GCC trên TMA thực quản US BioMax ES8010 - Phần 1

% dương tính	% dương tính	H	H	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	dương tính	N	dương tính
25	0	38	0	24	40	60%

Bảng 27C: Nhuộm GCC IHC trên vi mảng khối u thực quản US BioMax ES8010 - Phần 2

TMA thực quản USBioNamax ES8010 (80 nhân)																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A2	69	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A4	56	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
A6	62	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
A8	58	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-													
A10	46	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	20	100	80						Dương tính	80	0	80	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 (80 nhân)																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B2	43	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
B4	61	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B6	62	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	70	100					30		Dương tính	30	0	90	0
B8	50	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	20	100	80						Dương tính	80	0	80	0
B10	68	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
C2	65	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	70		30				Dương tính	100	0	130	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 (80 nhân)

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+C	1+A	2+C	2+A	3+C	3+A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C4	50	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
C6	60	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
C8	49	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
C10	59	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	30	100	70						Dương tính	70	0	70	0
D2	43	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
D4	62	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc rải rác)	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 (80 nhân)																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D6	62	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
D8	60	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D10	54	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E2	48	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E4	57	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E6	58	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 (80 nhân)																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E8	53	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E10	56	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
F2	76	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
F4	60	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	20	100	80						Dương tính	80	0	80	0
F6	53	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
F8	49	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 (80 nhân)																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F10	62	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G2	48	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (mô cơ trơn và mô tuyến nhầy)	-	20	100	80						Dương tính	80	0	80	0
G4	57	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (mô xơ, mô mạch máu và mô cơ trơn)	-	20	100	80						Dương tính	80	0	80	0
G6	45	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (mô cơ trơn)	-													
G8	55	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0

TMA thực quản USBioNamax ES8010 (80 nhân)																
					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G10	53	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H2	68	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
H4	64	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H6	55	Nam	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H8	63	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư (niêm mạc bị viêm mạn tính)	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H10	54	Nữ	Mô thực quản bình thường liền kề với vị trí ung thư	-		100	100						Dương tính	100	0	100	0

Bảng 27D: Tóm tắt về việc nhuộm GCC trên TMA thực quản US BioMax ES8010 - Phần 2

% dương tính	% dương tính	H	H	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	dương tính	N	dương tính
76	0	78	0	34	38	89%

Bảng 28A: Nhuộm GCC IHC trên vi mảng khối u phổi US BioMax LC20813

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A1	72	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	1	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A2	63	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A3	55	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A4	50	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A5	61	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A6	63	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy (rải rác)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A7	73	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A8	53	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A9	69	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A10	66	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A11	61	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A12	64	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A13	48	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A14	59	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A15	51	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																			
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A16	70	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B1	63	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B2	55	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B3	76	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B4	68	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
B5	45	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B6	54	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B7	50	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B8	57	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B9	43	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B10	46	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B11	72	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B12	62	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B13	64	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy kèm theo hoại tử	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B14	61	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy kèm theo hoại tử	3	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
B15	54	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B16	61	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C1	35	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C2	53	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C3	76	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy (rải rác) kèm theo hoại tử	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C4	53	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C5	66	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C6	76	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy (mô phổi)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C7	70	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô	-													

TMA phổi USBiomax LC20813

						Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
				có vảy (hoại tử khối u)														
C8	64	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C9	68	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy (mô phế quản, mô xơ và mạch máu)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C10	25	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2													
C11	66	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
C12	66	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0

TMA phổi USBiomax LC20813

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C13	53	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2		100	10 0						Dương tính	100	0	100	0
C14	39	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	60	100	40						Dương tính	40	0	40	0
C15	60	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
C16	59	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy (sụn, viêm mạn tính mô xơ và mạch máu)	-													
D1	62	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D2	54	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D3	67	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D4	54	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D5	49	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D6	46	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D7	56	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	3	90	100			10				Dương tính	10	0	20	0

TMA phổi USBiomax LC20813																			
					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đinh	Bào chất	Đinh
D8	55	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D9	45	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
D10	47	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D11	72	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D12	66	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
D13	62	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D14	48	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D15	57	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D16	70	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E1	55	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E2	64	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
E3	67	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E4	75	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E5	56	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E6	77	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E7	51	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E8	64	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy (mô phổi)	-													
E9	65	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy kèm theo hoại tử	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E10	63	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E11	52	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E12	55	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E13	71	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2		100	50		30		20		Dương tính	100	0	170	0
E14	52	Nam	Phổi	Caxinom tế bào biểu mô có vảy	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E15	63	Nữ	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
E16	67	Nữ	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-		100	50		40		10		Dương tính	100	0	160	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F1	46	Nữ	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
F2	61	Nam	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F3	54	Nam	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F4	55	Nữ	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
F5	68	Nam	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-		100	50		50				Dương tính	100	0	150	0
F6	54	Nữ	Phổi	Papillary bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F7	61	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2			80		20	50		50	Dương tính	100	100	120	250
F8	60	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F9	62	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

						Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F10	38	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F11	42	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	50	80	50	20					Dương tính	50	20	50	20
F12	56	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F13	59	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F14	33	Nam	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
F15	68	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F16	49	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến kèm theo hoại tử	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G1	56	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến (viêm mô xơ và mạch máu mạn tính)	-													

TMA phổi USBiomax LC20813																		
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G2	60	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	80	100	10		10				Dương tính	20	0	30	0
G3	39	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
G4	58	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2													
G5	56	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G6	55	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G7	62	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G8	64	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G9	72	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
G10	53	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính / Âm tính	% Dương tính Bào chất	% Dương tính Đỉnh	H Bào chất	H Đỉnh
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
G11	65	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	90	100			10				Dương tính	10	0	20	0
G12	52	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G13	47	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	70	100	20		10				Dương tính	30	0	40	0
G14	71	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G15	49	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G16	58	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H1	62	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
H2	54	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H3	38	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến kèm theo hoại tử	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H4	68	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
H5	64	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H6	41	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	-	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
H7	40	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H8	58	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến kèm theo hoại tử	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H9	64	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến kèm theo hoại tử	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H10	56	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2		90	100	10					Dương tính	100	10	100	10
H11	57	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến nhú	2	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H12	62	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến kèm theo hoại tử	2		100	80		20				Dương tính	100	0	120	0
H13	60	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H14	64	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H15	82	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
H16	60	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I1	50	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
I2	46	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I3	69	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến (rải rác)	3													

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
I4	51	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I5	70	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I6	67	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3		10	60		20	30	20	60	Dương tính	100	90	160	240
I7	36	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I8	49	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I9	60	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I10	39	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I11	65	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3		100	100						Dương tính	100	0	100	0
I12	69	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3		100	70		30				Dương tính	100	0	130	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
I13	75	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I14	75	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I15	61	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3		100	100						Dương tính	100	0	100	0
I16	44	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
J1	59	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J2	68	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
J3	65	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến kèm theo hoại tử	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J4	65	Nam	Phổi	Caxinom tuyến vảy	-	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
J5	39	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
J6	74	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J7	50	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J8	36	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J9	46	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
J10	69	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
J11	30	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J12	65	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J13	52	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J14	66	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
J15	47	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
J16	52	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
K1	58	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K2	46	Nữ	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
K3	69	Nam	Phổi	Bệnh ung thư tuyến	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K4	58	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K5	51	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K6	63	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K7	63	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
K8	60	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K9	63	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K10	66	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K11	71	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K12	60	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K13	31	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K14	61	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K15	52	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
K16	69	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
L1	43	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L2	56	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L3	62	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L4	42	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L5	59	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ (mô xơ và mạch máu)	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L6	55	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L7	28	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L8	39	Nam	Phổi	Caxinom tế bào nhỏ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813

						Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
L9	61	Nam	Phổi	Caxinom tế bào lớn	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L10	72	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào lớn	-	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
L11	46	Nam	Phổi	Caxinom tế bào lớn	-	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
L12	64	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào lớn	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L13	55	Nữ	Phổi	Caxinom tiểu phế quản phế nang	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L14	52	Nam	Phổi	Caxinom tiểu phế quản phế nang	-	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
L15	55	Nam	Phổi	Caxinom tiểu phế quản phế nang	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
L16	64	Nữ	Phổi	Caxinom tiểu phế quản phế nang	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
M1	59	Nam	Phổi	Caxinom tiểu phế quản phế nang nhầy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M2	50	Nữ	Phổi	Namucinous caxinom túi phế nang (rải rác)	-													
M3	27	Nam	Phổi	Caxinom tiểu phế quản phế nang nhầy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M4	48	Nam	Phổi	Caxinom tiểu phế quản phế nang nhầy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M5	56	Nam	Phổi	Caxinom dạng biểu bì nhầy	-	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
M6	51	Nam	Phổi	Caxinom dạng biểu bì nhầy	-													

TMA phổi USBiomax LC20813

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí màng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
M7	48	Nam	Phổi	Caxinom dạng biểu bì nhầy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M8	58	Nam	Phổi	Caxinom dạng biểu bì nhầy	-	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
M9	49	Nam	Phổi	U hạch không điển hình	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M10	47	Nam	Phổi	U hạch không điển hình	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M11	67	Nam	Phổi	U hạch không điển hình	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M12	65	Nam	Phổi	Bệnh ung thư biểu mô thần kinh nội tiết tế bào lớn	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M13	43	Nam	Phổi	Bệnh ung thư biểu mô thần kinh nội tiết	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

TMA phổi USBiomax LC20813																	
						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí mảng	Độ tuổi	Giới tính	Bộ phận	Bệnh sinh	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
				tế bào lớn hỗn hợp														
M14	58	Nam	Phổi	Caxinom tế bào khổng lồ	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M15	36	Nữ	Phổi	Caxinom tế bào đáy	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
M16	66	Nam	Phổi	Caxinom đa dạng	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0

Bảng 28B: Tóm tắt về việc nhuộm GCC trên TMA phổi US BioMax LC20813

% dương tính trung bình	% dương tính trung bình	H trung bình	H trung bình	Tổng số	Tổng số	Phần trăm
Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	dương tính	N	dương tính
14	1	15	3	56	199	28%
11	0	12	0	15	74	20%
23	3	26	7	36	82	44%
0	0	0	0	0	21	0%
3	0	3	0	5	22	23%

Bảng 29A: Nhuộm GCC IHC trên vi mảng khối u sacôm cơ trơn/sacôm cơ vân

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A1	Nam	85	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính cao	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A2	Nam	85	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính cao	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A3	Nam	26	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A4	Nam	26	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A5	Nữ	56	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A6	Nữ	56	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A7	Nữ	74	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0

Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A8	Nữ	74	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A9	Nam	34	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B1	Nam	34	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA		100	100						Dương tính	100	0	100	0
B2	Nữ	20	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B3	Nữ	20	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B4	Nữ	49	Mô chất béo	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B5	Nữ	49	Mô chất béo	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	NET	100							n/a				

Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /Âm tính	% Dương tính		H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B6	Nữ	34	Mô chất béo	Sacôm cơ trơn biểu mô ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0
B7	Nữ	34	Mô chất béo	Sacôm cơ trơn biểu mô ác tính trung bình	IIB		100	100						Dương tính	100	0	100
B8	Nam	38	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0
B9	Nam	38	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	80	100	20						Dương tính	20	0	20
C1	Nữ	44	Dây chằng	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IB	100	100							Âm tính	0	0	0
C2	Nữ	44	Dây chằng	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IB	100	100							Âm tính	0	0	0
C3	Nữ	69	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0
C4	Nữ	69	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB		100	100						Dương tính	100	0	100

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C5	Nữ	88	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C6	Nữ	88	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C7	Nữ	54	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn nhiều dạng ác tính	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C8	Nữ	54	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn nhiều dạng ác tính	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C9	Nữ	58	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IIB		100	100						Dương tính	100	0	100	0
D1	Nữ	58	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D2	Nữ	57	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IB	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
D3	Nữ	57	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IB	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
D4	Nam	78	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	NE T	100							không có				

						Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D5	Nam	78	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	NE T	100							không có				
D6	Nữ	52	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D7	Nữ	52	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
D8	Nam	61	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA		100	100						Dương tính	100	0	100	0
D9	Nam	61	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình (mô xơ, mạch máu và cơ trơn)	IIA		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E1	Nữ	33	Mô xơ	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E2	Nữ	33	Mô xơ	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E3	Nam	21	Khoang sau phúc mạc	Phôi sacôm cơ vân	IIIA		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E4	Nam	21	Khoang sau phúc mạc	Phôi sacôm cơ vân	IIIA		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E5	Nữ	51	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E6	Nữ	51	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E7	Nam	16	Tinh hoàn	Tế bào sacôm cơ vân Spindle	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E8	Nam	16	Tinh hoàn	Tế bào sacôm cơ vân Spindle	IIA		100	100						Dương tính	100	0	100	0
E9	Nữ	49	Tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F1	Nữ	49	Tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F2	Nam	30	Cơ vân	Sacôm cơ vân	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F3	Nam	30	Cơ vân	Sacôm cơ vân	IIB	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
F4	Nam	18	Lưỡi	Phôi sacôm cơ vân	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F5	Nam	18	Lưỡi	Phôi sacôm cơ vân	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F6	Nam	91	Cơ vân	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB		100	100						Dương tính	100	0	100	0
F7	Nam	91	Cơ vân	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB		100	100						Dương tính	100	0	100	0
F8	Nữ	74	Bàng quang	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F9	Nữ	74	Bàng quang	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G1	Nữ	67	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G2	Nữ	67	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G3	Nữ	40	Khoang bụng	Phôi sacôm cơ vân	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G4	Nữ	40	Khoang bụng	Phôi sacôm cơ vân	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G5	Nữ	23	Khoang chậu	Phôi sacôm cơ vân	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G6	Nữ	23	Khoang chậu	Phôi sacôm cơ vân	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G7	Nam	50	Cơ vân	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G8	Nam	50	Cơ vân	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIA		100	100						Dương tính	100	0	100	0
G9	Nam	10	Cơ vân	Sacôm cơ vân phế nang	IIB		100	70		30				Dương tính	100	0	130	0
H1	Nam	10	Cơ vân	Sacôm cơ vân phế nang	IIB	50	100	50						Dương tính	50	0	50	0
H2	Nữ	32	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	70	100	30						Dương tính	30	0	30	0
H3	Nữ	32	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H4	Nam	48	Mô mềm	Sacôm cơ vân phế nang	IIB	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
H5	Nam	48	Mô mềm	Sacôm cơ vân phế nang	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H6	Nam	40	Mô mềm	Sacôm cơ vân tế bào thoi	IA	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
H7	Nam	40	Mô mềm	Sacôm cơ vân tế bào thoi	IA	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
H8	Nam	49	Tinh hoàn	Sacôm cơ vân phôi	IIB		100	100						Dương tính	100	0	100	0
H9	Nam	49	Tinh hoàn	Sacôm cơ vân phôi	IIB		100	100						Dương tính	100	0	100	0
I1	Nữ	48	Tử cung	Cơ trơn	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I2	Nữ	8	Tim	Cơ tim	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I3	Nữ	14	Tim	Cơ tim	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			Bàng quang	Bàng quang bình thường	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0

					Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính		H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
không có			1007 (GCC 293); Ghép khác loài	Ghép khác loài thận phôi người- GCC được chuyển nhiễm	không có		100					100		Dương tính	100	0	300	0
không có			Dòng tế bào thận-293 HEK-GCC#2	Dòng tế bào thận phôi người - GCC được chuyển nhiễm	không có		100					100		Dương tính	100	0	300	0
không có			Dòng tế bào thận-293 [HEK-293]	Dòng tế bào thận phôi người	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			Mô 1	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	100					10		90	Dương tính	0	100	0	290
không có			Mô 2	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	NE T								không có				

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Cơ quan/ Mô	Chẩn đoán bệnh sinh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
không có			Mô 3	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	80	60	20	10		20		10	Dương tính	20	40	20	80
không có			Mô 4	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	90	90	10	10					Dương tính	10	10	10	10
không có			Mô 5	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	NE T								không có				
không có			Mô 6	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	NE T								không có				
không có			Mô 7	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	40		40		20	50		50	Dương tính	60	100	80	250
không có			Mô 8	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	80		20	20		30		50	Dương tính	20	100	20	230

Bảng 29B: Kết quả chấm điểm Ab đối chứng âm tính ở vi mảng khối u sacôm cơ trơn/sacôm cơ vân

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A1	Nam	85	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính cao	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A2	Nam	85	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính cao	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A3	Nam	26	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A4	Nam	26	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A5	Nữ	56	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A6	Nữ	56	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A7	Nữ	74	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
A8	Nữ	74	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
A9	Nam	34	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B1	Nam	34	Mô xơ	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B2	Nữ	20	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B3	Nữ	20	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B4	Nữ	49	Mô chất béo	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B5	Nữ	49	Mô chất béo	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							không có				
B6	Nữ	34	Mô chất béo	Sacôm cơ trơn biểu mô ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
B7	Nữ	34	Mô chất béo	Sacôm cơ trơn biểu mô ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B8	Nam	38	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
B9	Nam	38	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C1	Nữ	44	Dây chằng	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C2	Nữ	44	Dây chằng	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C3	Nữ	69	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C4	Nữ	69	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C5	Nữ	88	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C6	Nữ	88	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
C7	Nữ	54	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn nhiều dạng ác tính	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C8	Nữ	54	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn nhiều dạng ác tính	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
C9	Nữ	58	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D1	Nữ	58	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D2	Nữ	57	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D3	Nữ	57	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính thấp	IB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D4	Nam	78	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							không có				
D5	Nam	78	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							không có				

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
D6	Nữ	52	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D7	Nữ	52	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D8	Nam	61	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
D9	Nam	61	Cơ trơn	Sacôm cơ trơn ác tính trung bình (mô xơ, mạch máu và cơ trơn)	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E1	Nữ	33	Mô xơ	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E2	Nữ	33	Mô xơ	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E3	Nam	21	Khoang sau phúc mạc	Sacôm cơ vân phôi	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
E4	Nam	21	Khoang sau phúc mạc	Sacôm cơ vân phôi	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E5	Nữ	51	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E6	Nữ	51	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E7	Nam	16	Tinh hoàn	Sacôm cơ vân tế bào thoi	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E8	Nam	16	Tinh hoàn	Sacôm cơ vân tế bào thoi	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
E9	Nữ	49	Tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F1	Nữ	49	Tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F2	Nam	30	Cơ vân	Sacôm cơ vân	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F3	Nam	30	Cơ vân	Sacôm cơ vân	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
F4	Nam	18	Lưỡi	Sacôm cơ vân phôi	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F5	Nam	18	Lưỡi	Sacôm cơ vân phôi	IIIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F6	Nam	91	Cơ vân	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F7	Nam	91	Cơ vân	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F8	Nữ	74	Bàng quang	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
F9	Nữ	74	Bàng quang	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G1	Nữ	67	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G2	Nữ	67	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G3	Nữ	40	Khoang bụng	Sacôm cơ vân phôi	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G4	Nữ	40	Khoang bụng	Sacôm cơ vân phôi	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
G5	Nữ	23	Khoang chậu	Sacôm cơ vân phôi	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G6	Nữ	23	Khoang chậu	Sacôm cơ vân phôi	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G7	Nam	50	Cơ vân	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G8	Nam	50	Cơ vân	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
G9	Nam	10	Cơ vân	Sacôm cơ vân phế nang	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H1	Nam	10	Cơ vân	Sacôm cơ vân phế nang	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H2	Nữ	32	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H3	Nữ	32	Cổ tử cung	Sacôm cơ vân nhiều dạng	IIIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H4	Nam	48	Mô mềm	Sacôm cơ vân phế nang	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H5	Nam	48	Mô mềm	Sacôm cơ vân phế nang	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
H6	Nam	40	Mô mềm	Sacôm cơ vân tế bào thoi	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H7	Nam	40	Mô mềm	Sacôm cơ vân tế bào thoi	IA	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H8	Nam	49	Tinh hoàn	Sacôm cơ vân phôi	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
H9	Nam	49	Tinh hoàn	Sacôm cơ vân phôi	IIB	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I1	Nữ	48	Tử cung	Cơ trơn	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I2	Nữ	8	Tim	Cơ tim	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
I3	Nữ	14	Tim	Cơ tim	-	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			Bàng quang	Bình thường bàng quang	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			1007 (GCC 293); Ghép	Ghép khác loài thận phôi người- GCC	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0

						Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
			khác loài	được chuyển nhiễm														
không có			Dòng tế bào thận-293 HEK-GCC#2	Dòng tế bào thận phôi người - GCC được chuyển nhiễm	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			Dòng tế bào thận-293 [HEK-293]	Dòng tế bào thận phôi người	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			Mô 1	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			Mô 2	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	NE T								không có				
không có			Mô 3	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0

					Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Vị trí nhân	giới tính	độ tuổi	Bộ phận/ Mô	Chẩn đoán bệnh/Mô tả mô	Kiểu	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
không có			Mô 4	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			Mô 5	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	NE T								không có				
không có			Mô 6	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	NE T								không có				
không có			Mô 7	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0
không có			Mô 8	Bệnh ung thư ruột kết MTB	không có	100	100							Âm tính	0	0	0	0

Bảng 30A: Nhuộm GCC IHC trên các mẫu lâm sàng bệnh ung thư không phải là trực tràng ruột kết người lấy từ cơ sở dữ liệu mô CRO (QualTek)

Mẫu Cơ sở dữ liệu mô QualTek															
	Phiến kính QML		Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /	% Dương tính	% Dương tính	H	H
Mẫu	số	Cấp độ	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Âm tính	Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
Caxinom tụy	MIL#7	2	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
Caxinom tụy	MIL#7	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
Caxinom tụy	MIL#7	2	60	80	30		10	10		10	Dương tính	40	20	50	50
Dạ dày tuyến	MIL#8	3	60	80	20	0	20	10	10	10	Dương tính	50	20	90	50
Dạ dày tuyến	MIL#9	3	100	100							Âm tính	0	0	0	0
Dạ dày tuyến	MIIL#10	2-3	80	100	20						Dương tính	20	0	20	0
Caxinom tế bào vảy thực quản	MIL#33	2	90	100	10						Dương tính	10	0	10	0
Caxinom tế bào vảy thực quản	MIL#12	2	30		50		20				Dương tính	70	0	90	0
Caxinom tế bào vảy thực quản	MIL#13	2	100	100							Âm tính	0	0	0	0

Bảng 30B: Các mẫu lâm sàng nhuộm GCC IHC ở người của ruột kết bình thường và bệnh ung thư kết tràng (Khối u bậc 1, 2, 2&3 hoặc 3) được lấy từ cơ sở dữ liệu mô CRO (QualTek)

Mẫu QualTek số	Mẫu MLNM số	Loại mẫu	GCC Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)										Điểm số H	Điểm số H	Mô
			0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh	Cấp độ
Q34	PRGNX000525	Ruột kết							100	30		70	200	270	Bình thường
Q35	PRGNX000526	Ruột kết			50		50					100	75	300	2
Q36	PRGNX000527	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q37	PRGNX000528	Ruột kết			50		20		30			100	105	300	2
Q38	PRGNX000529	Ruột kết			50		50			20		80	75	280	Bình thường
Q39	PRGNX000530	Ruột kết					50			50	50	50	200	250	3
Q40	PRGNX000531	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q41	PRGNX000532	Ruột kết		30	100			10		30		30	50	160	2
Q42	PRGNX000533	Ruột kết					50		50	20		80	150	280	Bình thường
Q43	PRGNX000534	Ruột kết					50		50	30		70	150	270	2
Q44	PRGNX000535	Ruột kết		80	100			20					50	20	Bình thường
Q45	PRGNX000536	Ruột kết					50		50			100	150	300	2
Q46	PRGNX000537	Ruột kết							100	30		70	200	270	Bình thường
Q47	PRGNX000538	Ruột kết			80		20					100	60	300	2
Q48	PRGNX000539	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q49	PRGNX000540	Ruột kết							100	80		20	200	220	2

Mẫu QualTek số	Mẫu MLNM số	Loại mẫu	GCC Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)										Điểm số H	Điểm số H	Mô
			0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh	Cấp độ
Q50	PRGNX000541	Ruột kết			50		50	50		50			75	150	Bình thường
Q51	PRGNX000542	Ruột kết							100			100	200	300	2
Q52	PRGNX000543	Ruột kết					70		30			100	130	300	Bình thường
Q53	PRGNX000544	Ruột kết					100					100	100	300	2
Q54	PRGNX000545	Ruột kết			50		50					100	75	300	Bình thường
Q55	PRGNX000546	Ruột kết		20	90		10			30		50	55	210	2
Q56	PRGNX000547	Ruột kết			100	50		50					50	75	Bình thường
Q57	PRGNX000548	Ruột kết			40		30		30			100	110	300	2
Q58	PRGNX000549	Ruột kết			100			30		40		30	50	200	Bình thường
Q59	PRGNX000550	Ruột kết			30		50		20			100	105	300	2
Q60	PRGNX000551	Ruột kết					80		10	50	10	50	130	250	Bình thường
Q61	PRGNX000552	Ruột kết	80	80			10		10			20	30	60	2 & 3
Q62	PRGNX000553	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q63	PRGNX000554	Ruột kết					20		80			100	180	300	2
Q64	PRGNX000555	Ruột kết					100			50		50	100	250	Bình thường
Q65	PRGNX000556	Ruột kết					90		10			100	110	300	2
Q66	PRGNX000557	Ruột kết			30		50		20	50		50	105	250	Bình thường
Q67	PRGNX000558	Ruột kết													

Mẫu QualTek số	Mẫu MLNM số	Loại mẫu	GCC Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Điểm số H	Điểm số H	Mô
			0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh	Cấp độ
Q68	PRGNX000559	Ruột kết			50		50					100	75	300	Bình thường
Q69	PRGNX000560	Ruột kết	50		50			20		30		50	25	230	2
Q70	PRGNX000561	Ruột kết			50		50	20		30		50	75	230	Bình thường
Q71	PRGNX000562	Ruột kết													
Q72	PRGNX000563	Ruột kết		40	70		30	20		20		20	65	120	Bình thường
Q73	PRGNX000564	Ruột kết			100							100	50	300	2
Q74	PRGNX000565	Ruột kết			50		50					100	75	300	Bình thường
Q75	PRGNX000566	Ruột kết			100			10		20		70	50	260	2
Q76	PRGNX000567	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q77	PRGNX000568	Ruột kết	20				70		10			100	90	300	2
Q78	PRGNX000569	Ruột kết		30	100			20		30		20	50	140	Bình thường
Q79	PRGNX000570	Ruột kết			100							100	50	300	2
Q80	PRGNX000571	Ruột kết					50		50			100	150	300	Bình thường
Q81	PRGNX000572	Ruột kết			80		20					100	60	300	2
Q82	PRGNX000573	Ruột kết			50		50					100	75	300	Bình thường
Q83	PRGNX000574	Ruột kết			50		50			20		80	75	280	2
Q84	PRGNX000575	Ruột kết					100			20		80	100	280	Bình thường
Q85	PRGNX000576	Ruột kết			50		20		30	20		80	105	280	2

Mẫu QualTek số	Mẫu MLNM số	Loại mẫu	GCC Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)										Điểm số H	Điểm số H	Mô
			0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh	Cấp độ
Q86	PRGNX000577	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q87	PRGNX000578	Ruột kết			20		60		20			100	110	300	2
Q88	PRGNX000579	Ruột kết					50		50			100	150	300	Bình thường
Q89	PRGNX000580	Ruột kết					50		50			100	150	300	3
Q90	PRGNX000581	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q91	PRGNX000582	Ruột kết			30		50		20	20		80	105	280	2
Q92	PRGNX000583	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q93	PRGNX000584	Ruột kết		20	100			30				50	50	180	2
Q94	PRGNX000585	Ruột kết			50		50			20		80	75	280	Bình thường
Q95	PRGNX000586	Ruột kết													
Q96	PRGNX000587	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q97	PRGNX000588	Ruột kết					20		80			100	180	300	2
Q98	PRGNX000589	Ruột kết			50		50					100	75	300	Bình thường
Q99	PRGNX000590	Ruột kết			50		30		20	50		50	95	250	2
Q100	PRGNX000591	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q101	PRGNX000592	Ruột kết		20	100					50		30	50	190	2
Q102	PRGNX000593	Ruột kết			50		50					100	75	300	Bình thường
Q103	PRGNX000594	Ruột kết	100	100									0	0	3

Mẫu QualTek số	Mẫu MLNM số	Loại mẫu	GCC Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)										Điểm số H	Điểm số H	Mô
			0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh	Cấp độ
Q104	PRGNX000595	Ruột kết			50		50			90		10	75	210	Bình thường
Q105	PRGNX000596	Ruột kết			60		40	20		30		50	70	230	2
Q106	PRGNX000597	Ruột kết							100			100	200	300	Bình thường
Q107	PRGNX000598	Ruột kết	10	10	10		30		30	40	20	50	155	230	2 & 3
Q108	PRGNX000599	Ruột kết							100			100	200	300	Bình thường
Q109	PRGNX000600	Ruột kết	80	100			20						20	0	2
Q110	PRGNX000601	Ruột kết			50		50					100	75	300	Bình thường
Q111	PRGNX000602	Ruột kết	10		20		60		10			100	90	300	2
Q112	PRGNX000603	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q113	PRGNX000604	Ruột kết			50		50			20		80	75	280	2
Q114	PRGNX000605	Ruột kết			50		50			50		50	75	250	Bình thường
Q115	PRGNX000606	Ruột kết			50				20		30	100	155	300	2
Q116	PRGNX000607	Ruột kết					100			50		50	100	250	Bình thường
Q117	PRGNX000608	Ruột kết		100	70		30						65	0	3
Q118	PRGNX000609	Ruột kết					100			50		50	100	250	Bình thường
Q119	PRGNX000610	Ruột kết			30		50		20			100	105	300	2
Q120	PRGNX000611	Ruột kết					100			50		50	100	250	Bình thường
Q121	PRGNX000612	Ruột kết			30		60		10	20		80	95	280	2

Mẫu QualTek số	Mẫu MLNM số	Loại mẫu	GCC Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Điểm số H	Điểm số H	Mô
			0C	0A	0,5+ C	0,5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Bào chất	Đỉnh	Cấp độ
Q122	PRGNX000613	Ruột kết					100					100	100	300	Bình thường
Q123	PRGNX000614	Ruột kết			30		50		20			100	105	300	2
Q124	PRGNX000615	Ruột kết		60			100	20				20	100	80	Bình thường
Q125	PRGNX000616	Ruột kết			100	20		20		30		30	50	180	2
Q126	PRGNX000617	Ruột kết					100			30		70	100	270	Bình thường
Q127	PRGNX000618	Ruột kết					80		20			100	120	300	2
Q128	PRGNX000619	Ruột kết			50		50	40		40		20	75	180	Bình thường
Q129	PRGNX000620	Ruột kết	100									100	0	300	2
Q130	PRGNX000621	Ruột kết					80		20			100	120	300	Bình thường
Q131	PRGNX000622	Ruột kết			20		30		50			100	140	300	2
Q132	PRGNX000623	Ruột kết					70		30			100	130	300	Bình thường
Q133	PRGNX000624	Ruột kết					70		30			100	130	300	2

Bảng 31: Các mẫu lâm sàng lấy từ nghiên cứu tăng liều pha I C260001 đối với MLN0264 điều trị hướng đích GCC

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58001 - 102**	CRC	Nam	03/09/ 2008	5 lát cắt không nhuộm màu	22/5/12	100	0	0	0	0	0	0	100	Dương tính	0	100	0	300
58001 - 103**	CRC	Nữ	17/02/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	22/5/12	100	20	0	30	0	30	0	20	Dương tính	0	80	0	150
58001 - 101**	Tuyến tụy	Nữ	15/05/ 2012	1 khối parafin	22/5/2012	0	0	0	0	0	0	100	100	Dương tính	100	100	300	300
58001 - 104	CRC	Nam	12/04/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	6/6/ 2012	10	0	50	0	20	0	20	100	Dương tính	90	100	150	300
58001 - 105	Tuyến tụy	Nam	23/08/ 2006	20 lát cắt không nhuộm màu	3/7/ 2012	90	100	10	0	0	0	0	0	Dương tính	10	0	10	0
58002 -103	Thực quản	Nam	17/08/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	3/7/ 2012	90	100	0	0	10	0	0	0	Dương tính	10	0	20	0

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58002 -101	Tuyến tụy	Nam	20/01/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	3/7/ 2012	90	100	10	0	0	0	0	0	Dương tính	10	0	10	0
58002 -102	CRC	Nam	09/08/ 2007	1 FFPE che khuất	3/7/ 2012	100	100	0	0	0	0	0	0	Âm tính	0	0	0	0
58002 -106	CRC	Nữ	22/06/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	11/7/ 2012	100	100	0	0	0	0	0	0	Âm tính	0	0	0	0
58001 - 107	CRC	Nữ	28/11/ 2008	5 lát cắt không nhuộm màu	24/7/ 2012	80	20	20	0	0	20	0	60	Dương tính	20	80	20	220
58001 - 107	CRC	Nữ	28/11/ 2008	5 lát cắt không nhuộm màu	24/7/ 2012	90	10	10	10	0	30	0	50	Dương tính	10	90	10	220
58001 - 107	CRC	Nữ	28/11/ 2008	5 lát cắt không nhuộm màu	24/7/ 2012	40	0	50	0	10	20	0	80	Dương tính	60	100	70	280
58002 -111	CRC	Nữ	23/10/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	25/7/ 2012	0	0	10 0	0	0	0	0	100	Dương tính	100	100	100	300

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58002 -112	CRC	Nữ	01/12/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	25/7/ 2012	0	0	80	0	20	20	0	80	Dương tính	100	100	120	280
58002 -107	CRC	Nữ	12/02/ 2007	5 lát cắt không nhuộm màu	26/7/ 2012	80	50	10	0	10	50	0	0	Dương tính	20	50	30	100
58002 -108	Dạ dày	Nam	27/07/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	31/7/ 2012	20	100	20	0	50	0	10	0	Dương tính	80	0	150	0
58002 -113	CRC	Nam	09/07/ 2008	5 lát cắt không nhuộm màu	31/7/ 2012	50	20	30	10	20	20	0	50	Dương tính	50	80	70	200
58001 - 108	Thực quản	Nam	12/05/ 2010	20 lát cắt không nhuộm màu	8/8/ 2012	100	100							Âm tính	0	0	0	0
58002 -114	CRC	Nữ	12/09/ 2005	5 lát cắt không nhuộm màu	10/8/ 2012	100			10		80		10	Dương tính	0	100	0	200
58002 -105	CRC	Nam	19/04/ 2010	1 khối FFPE	16/8/ 2012	10		70		20	20		80	Dương tính	90	100	110	280

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58001 - 109	Thực quản	Nam	20/09/ 2011	6 lát cắt không nhuộm màu	21/8/ 2012	100	100							Âm tính	0	0	0	0
58002 -115	CRC	Nam	24/08/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	21/8/ 2012	100			10		20		70	Dương tính	0	100	0	260
58002 -109	Tuyến tụy	Nam	08/08/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	22/8/ 2012	20	10	40	30	20	30	20	30	Dương tính	80	90	140	180
58002 -117	Tuyến tụy	Nam	28/02/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	22/8/ 2012	40	10	40	50	20	30		10	Dương tính	60	90	80	140
58002 -118	CRC	Nam	22/11/ 2010	1 khối FFPE	7/9/ 2012		10		10	70	10	30	70	Dương tính	100	90	230	240
58001 - 110	Ruột non	Nữ	31/08/ 2012	1 khối FFPE	11/9/ 2012		80			30		70	20	Dương tính	100	20	270	60
58002 -120	CRC	Nữ	12/05/ 2010	1 khối FFPE	12/9/ 2012		70	30		40		30	30	Dương tính	100	30	200	90
58002 -121	Dạ dày	Nữ	03/05/ 2012	1 khối FFPE	12/9/ 2012	40	100	10		40		10		Dương tính	60	0	120	0

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58002 -123	Tuyến tụy	Nữ	20/05/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	13/9/ 2012	100	80						20	Dương tính	0	20	0	60
51001 - 101	CRC	Nam	03/08/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	17/9/ 2012					100			100	Dương tính	100	100	200	300
58002 -119	CRC	Nam	09/11/ 2005	5 lát cắt không nhuộm màu + 2 H&E	19/9/ 2012	40	20	40	20	20	20		40	Dương tính	60	80	80	180
58002 -122	Thực quản	Nam	10/05/ 2010	1 khối FFPE và 2 H&E	19/9/ 2012	20	100	20		30		30		Dương tính	80	0	170	0
51001 - 102	CRC	Nam	23/11/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	10/10/ 2012					50		50	100	Dương tính	100	100	250	300
51001 - 103	Tuyến tụy	Nữ	05/08/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	15/10/ 2012	50	80	50			10		10	Dương tính	50	20	50	50
51001 - 104	CRC	Nữ	24/03/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	22/10/ 2012	70		30			10		90	Dương tính	30	100	30	290

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58002 -116	CRC	Nam	19/10/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	24/10/ 2012					50		50	100	Dương tính	100	100	250	300
51001 - 105	Tuyến tụy	Nam	29/12/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	24/10/ 2012	90	90	10	10					Dương tính	10	10	10	10
51001 - 106	CRC	Nữ	17/09/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	25/10/ 2012	80		20			20		80	Dương tính	20	100	20	280
58001 - 111	CRC	Nữ	05/02/ 2005	10 lát cắt không nhuộm màu	31/10/ 2012	90		10	10		10		80	Dương tính	10	100	10	270
58003 -105	CRC	Nữ	09/06/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	6/11/ 2012	70						30	100	Dương tính	30	100	90	300
51001 - 107	CRC	Nam	31/08/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	7/11/ 2012	80		20					100	Dương tính	20	100	20	300
58002 -127	Dạ dày	Nữ	03/08/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	8/11/ 2012	100	100							Âm tính	0	0	0	0

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58003 -101	CRC	Nữ	13/09/ 2010	1 khối parafin	8/11/ 2012		10	70	10	30	10		70	Dương tính	100	90	130	240
58003 -107	Tuyến tụy	Nữ	29/02/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	8/11/ 2012	100	100							Âm tính	0	0	0	0
58003 -106	CRC	Nữ	25/06/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	9/11/ 2012	100			10		10		80	Dương tính	0	100	0	270
58003 -108	CRC	Nữ	28/07/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	9/11/ 2012	100					20		80	Dương tính	0	100	0	280
51001 - 108	CRC	Nam	UK-UK-UK	5 lát cắt không nhuộm màu	9/11/ 2012			30	0	30	30	40	70	Dương tính	100	100	210	270
51001 - 109	CRC	Nam	09/10/ 2007	5 lát cắt không nhuộm màu	12/11/ 2012	70		30			30		70	Dương tính	30	100	30	270
58003 -103	Thực quản	Nam	09/03/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	13/11/ 2012	100	100							Âm tính	0	0	0	0

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58001 - 112	CRC	Nam	11/06/ 2012	20 lát cắt không nhuộm màu	13/11/ 2012	30		30		30		10	100	Dương tính	70	100	120	300
58003 -110	CRC	Nữ	30/05/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	14/11/ 2012		100			30		70		Dương tính	100	0	270	0
58003 -102	CRC	Nam	17/03/ 2010	1 khối parafin	16/11/ 2012	20		30	10	40	20	10	70	Dương tính	80	100	140	260
58002 -126	Tuyến tụy	Nữ	04/08/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	16/11/ 2012			30		70				Dương tính	100		170	
58003 -112	Thực quản	Nam	21/10/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	29/11/ 2012	40	100	50		10				Dương tính	60	0	70	0
58001 - 114	Tuyến tụy	Nam	30/11/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	29/11/ 2012	100	100							Âm tính	0	0	0	0
58003 -104	Tuyến tụy	Nam	16/03/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	3/ 2012/ 2012	20	100	40		20		20		Dương tính	80	0	140	0

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
51001 - 110	CRC	Nữ	10/02/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	3/ 2012/ 2012		20	70	10	30	20		50	Dương tính	100	80	130	200
51001 - 111	CRC	Nam	16/09/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	7/ 2012/ 2012		30	10 0	10		10		50	Dương tính	100	70	100	180
58003 -113	Dạ dày	Nữ	07/02/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	13/ 2012/ 2012	100	100							Âm tính	0	0	0	0
58001 - 113	Thực quản	Nữ	06/06/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	21/ 2012/ 2012			10 0						Dương tính	100		100	
58002 -128	Tuyến tụy	Nam	09/11/ 2011	1 khối parafin	21/ 2012/ 2012													
58002 -130	Tuyến tụy	Nam	10/12/ 2008	1 khối parafin	21/ 2012/ 2012			50		50			100	Dương tính	100	100	150	300
58002 -130	Tuyến tụy	Nam	10/12/ 2008	1 khối parafin	21/ 2012/ 2012			50		50	25		75	Dương tính	100	100	150	275

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H	
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh	
58002 -130	Tuyến tụy	Nam	10/12/ 2008	1 khối parafin	21/ 2012/ 2012			50		50			100	Dương tính	100	100	150	300	
58002 -130	Tuyến tụy	Nam	13/04/ 2011	1 khối parafin	21/ 2012/ 2012			25		75	25		75	Dương tính	100	100	175	275	
58003 -114	CRC	Nam	29/03/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	26/ 2012/ 2012	25		50	25	25	25		50	Dương tính	75	100	100	225	
58003 -117	CRC	Nữ	20/05/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	28/ 2012/ 2012		100	70		30				Dương tính	100	0	130	0	
58001 - 116	Tuyến tụy	Nam	26/01/ 2006	5 lát cắt không nhuộm màu	4/1/20 13 & 18/1/2 013**	100	100							Âm tính	0	0	0	0	
58001 - 115	Thực quản	Nam	14/12/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	9/1/20 13	50		40		10			100	Dương tính	50	100	60	300	
58003 -119	Thực quản	Nam	27/12/ 2011	9 lát cắt không nhuộm màu	14/1/2 013	70	10	30			10		80	Dương tính	30	90	30	260	

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H		H	
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất		Đỉnh	
58002 -132	Thực quản	Nam	23/11/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu & 1 khối FFPE	16/1/2 013		50	40		30	20	30	30	Dương tính	100	50	190	130		
51001 - 112	Dạ dày	Nam	26/01/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	16/1/2 013	70	70	10		20			30	Dương tính	30	30	50	90		
58003 -115	CRC	Nam	08/09/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	17/1/2 013	20		80					100	Dương tính	80	100	80	300		
58003 -120	Thực quản	Nam	15/11/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	25/1/2 013	10	10	60	10	30	10		70	Dương tính	90	90	120	240		
51001 - 113	CRC	Nam	20/07/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	28/1/2 013	50		50					100	Dương tính	50	100	50	300		
51001 - 114	Tuyến tụy	Nữ	08/11/ 2007	5 lát cắt không nhuộm màu	28/1/2 013	80	70	20	20		10			Dương tính	20	30	20	40		

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58001 - 117	Dạ dày	Nam	15/09/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	29/1/2 013		80	90		10	10		10	Dương tính	100	20	110	50
58003 -118	Dạ dày	Nam	28/05/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	4/2/20 13	100			10		40		50	Dương tính	0	100	0	240
58003 -123	CRC	Nam	01/11/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	6/2/20 13			30		70			100	Dương tính	100	100	170	300
58003 -121	Tuyến tụy	Nam	07/09/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	6/2/20 13	100	95				5			Dương tính	0	5	0	10
58003 -125	Tuyến tụy	Nam	04/09/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	11/2/2 013		100	10 0						Dương tính	100	0	100	0
58003 -127	Ruột non	Nam	11/04/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	11/2/2 013		20	10 0					80	Dương tính	100	80	100	240
58002 -135		Nữ	19/12/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	14/2/2 013	100	20		30		50			Dương tính	0	80	0	130

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58001 - 119	Dạ dày	Nam	29/10/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	15/2/2 013	100	95				5			Dương tính	0	5	0	10
58001 - 120	CRC	Nữ	22/05/ 2012	16 lát cắt không nhuộm màu	15/2/2 013	100	20				40		40	Dương tính	0	80	0	200
58003 -126	CRC	Nam	29/12/ 2010	5 lát cắt không nhuộm màu	18/2/2 013	70		30					100	Dương tính	30	100	30	300
58003 -129	Tuyến tụy	Nam	23/03/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	18/2/2 013		90	10 0	10					Dương tính	100	10	100	10
58003 -131	CRC	Nam	10/05/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	18/2/2 013	100	100							Âm tính	0	0	0	0
58002 -133	Tuyến tụy	Nam	03/03/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	20/2/2 013													
58002 -133	Tuyến tụy	Nam	03/03/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	20/2/2 013													

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58003 -122	CRC	Nam	24/03/ 2009	5 lát cắt không nhuộm màu	25/2/2 013			90		10			100	Dương tính	100	100	110	300
58003 -128	Tuyến tụy	Nam	21/12/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	25/2/2 013	100	100							Âm tính	0	0	0	0
58001 - 121	CRC	Nữ	22/06/ 2010	20 lát cắt không nhuộm màu	25/2/2 013	100	90		10					Dương tính	0	10	0	10
58001 - 115	Thực quản	Nữ	25/02/ 2011	5 lát cắt không nhuộm màu	25/2/2 013	100	55		30		10		5	Dương tính	0	45	0	65
58003 -124	Dạ dày	Nam	07/06/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	28/2/2 013		100	20		20		60		Dương tính	100	0	240	0
58002 -133	Tuyến tụy	Nam	03/03/ 2011	10 lát cắt không nhuộm màu	28/2/2 013													
58002 -129	Thực quản	Nam	20/03/ 2012	5 lát cắt không nhuộm màu	28/2/2 013			70		30			100	Dương tính	100	100	130	300

Đối tượng #	Loại ung thư	Giới tính	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu/Số lượng	Ngày nhận	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
58002-129	Thực quản	Nam	08/03/2012*	5 lát cắt không nhuộm màu	28/2/2013		70	80		20			30	Dương tính	100	30	120	90
58002-137		Nữ	03/10/2011	1 khối parafin	1/3/2013	20	100	40		30		10		Dương tính	80	0	130	0

Bảng 32: Sự biểu hiện GCC IHC trong các mẫu u trực tràng ruột kết nguyên phát và di căn

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
1A	1			20		80			100		Dương tính	100	100	180	300
1B	2			80		20			100		Dương tính	100	100	120	300
2A	3		50	100	20		20		10		Dương tính	100	50	100	90
2B	4		100	60		40					Dương tính	100	0	140	0
3A	5			20		80			100		Dương tính	100	100	180	300
3B	6			80		20			100		Dương tính	100	100	120	300
4A	7	50		50	50		20		30		Dương tính	50	100	50	180

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
4B	8		50	100	20		30				Dương tính	100	50	100	80
5A	9			80		20	20		80		Dương tính	100	100	120	280
5B	10	50	40	30	20	20	20		20		Dương tính	50	60	70	120
6A	11			80	10	20	30		60		Dương tính	100	100	120	250
6B	12			50	10	50	20		70		Dương tính	100	100	150	260
7A	13	30		50		20	20		80		Dương tính	70	100	90	280
7B	14	30		50		20	20		80		Dương tính	70	100	90	280
8A	15					100			100		Dương tính	100	100	200	300
8B	16			50		50			100		Dương tính	100	100	150	300
9A	17		100			50		50		Nhuộm bậc cao trong không bào	Dương tính	100	0	250	0
9B	18		60	100	20		20				Dương tính	100	40	100	60
10A	19			80		20			100		Dương tính	100	100	120	300
10B	20			50		50			100		Dương tính	100	100	150	300
11A	21	50	10	50	30		30		30		Dương tính	50	90	50	180
11B	22	50	60	50	20		10		10		Dương tính	50	40	50	70
12A	23			80		20	50		50		Dương tính	100	100	120	250

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
12B	24				20	10	30	90	50	Nhuộm bậc cao chủ yếu trong các không bào-có một số vùng sáng	Dương tính	100	100	290	230
13A	25	50	20	50	10		20		50		Dương tính	50	80	50	200
13B	26		80	100	10		10				Dương tính	100	20	100	30
14A	27			80		20			100	Thành phần tế bào dạng nhẫn không được chấm điểm	Dương tính	100	100	120	300
14B	28			50		50			100		Dương tính	100	100	150	300
15A	29	50	50	40	10	10	30		10		Dương tính	50	50	60	100
15B	31	50	100	50							Dương tính	50	0	50	0
16A	32	60	20	30	20	10	30		30	Mô nhầy	Dương tính	40	80	50	170
16B	33			70		30			100		Dương tính	100	100	130	300
17A	34			90		10			100		Dương tính	100	100	110	300
17B	35	50	20	50	20		20		40		Dương tính	50	80	50	180
18A	36			70	20	30	30		50		Dương tính	100	100	130	230
18B	37	10	50	80	10	10	20		20		Dương tính	90	50	100	110

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)							Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
19A	38			80		20			100		Dương tính	100	120	300
19B	39	70	70	30			20		10		Dương tính	30	30	70
20A	40	80	100	20						Thần kinh nội tiết	Dương tính	20	20	0
20B	41	50	90	20		30	10				Dương tính	50	80	20
21A	42	50		50					100		Dương tính	50	50	300
21B	43	NET								Không có bằng chứng về khối u				
22A	44	60	10	30	10	10	20		60		Dương tính	40	50	230
22B	45		10	100			10		80		Dương tính	100	100	260
23A	46	50	10	50					90		Dương tính	50	50	270
23B	47			70		30			100		Dương tính	100	130	300
24A	48		10	80		20	40		50		Dương tính	100	120	230
24B	49	80	40	10		10	30		30	Chỉ có một lượng nhỏ khối u	Dương tính	20	30	150
25A	50	50	30	50	20		20		30		Dương tính	50	50	150
25B	51			80		20			100		Dương tính	100	120	300
26A	52			80		20	50		50		Dương tính	100	120	250

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
26B	53	Net								Không có bằng chứng về khối u					
27A	54	40	70	20	10	20	10	20	10		Dương tính	60	30	120	60
27B	55			60		20	30	20	70		Dương tính	100	100	160	270
28A	56			50		50			100		Dương tính	100	100	150	300
28B	57			30		50		20	100		Dương tính	100	100	190	300
29A	58			50		50			100		Dương tính	100	100	150	300
29B	59	50		40	20	10	30		50		Dương tính	50	100	60	230
30A	61	10		70		20	20		80		Dương tính	90	100	110	280
30B	62			50		50	50		50		Dương tính	100	100	150	250
31A	63					50		50	100		Dương tính	100	100	250	300
31B	64			50		50	50		50		Dương tính	100	100	150	250
32A	65			80		20			100		Dương tính	100	100	120	300
32B	66	50	50	50					50		Dương tính	50	50	50	150
33A	67			80		20	50		50		Dương tính	100	100	120	250
33B	68			20		80			100		Dương tính	100	100	180	300
34A	69			100			30		70		Dương tính	100	100	100	270
34B	70			100	20		40		40		Dương tính	100	100	100	220
35A	71			70		20		10	100		Dương tính	100	100	140	300

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
35B	72			70		20		10	100		Dương tính	100	100	140	300
36A	73			50	40	40	50	10	10		Dương tính	100	100	160	170
36B	74			30	40	40	30	30	30		Dương tính	100	100	200	190
37A	75		20	100	10		20		50		Dương tính	100	80	100	200
37B	76	50	90	50					10		Dương tính	50	10	50	30
38A	77	30		70			50		50		Dương tính	70	100	70	250
38B	78	80		20					100		Dương tính	20	100	20	300
39A	79			100			50		50		Dương tính	100	100	100	250
39B	80			100					100		Dương tính	100	100	100	300
40A	81			40		60	20		80		Dương tính	100	100	160	280
40B	82	NET								Không có bằng chứng về khối u					
41A	83	20	60	80	20		10		10		Dương tính	80	40	80	70
41B	84	50	40	50	20		20		20		Dương tính	50	60	50	120
42A	85		10	80	10	20	40		40		Dương tính	100	90	120	210
42B	86		10	80	10	20	30		50		Dương tính	100	90	120	220
43A	87		10	30	30	50	30	20	30		Dương tính	100	90	190	180
43B	88			50		40	30	10	70		Dương tính	100	100	160	270
44A	89			80		20			100		Dương tính	100	100	120	300

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
44B	91	60	100	30		10					Dương tính	40	0	50	0
45A	92			30		50		20	100		Dương tính	100	100	190	300
45B	93			70		20		10	100	Nhuộm thể Golgi trong bào chất	Dương tính	100	100	140	300
46A	94	90	90	10	10						Dương tính	10	10	10	10
46B	95	20	80	80			10		10		Dương tính	80	20	80	50
47A	96	50	100	50						U tuyến-không khối u	Dương tính	50	0	50	0
47B	97		40	80	20	20	20		20		Dương tính	100	60	120	120
48A	98	30		70			20		80		Dương tính	70	100	70	280
48B	99	90		10			20		80		Dương tính	10	100	10	280
49A	100	30		40		30	30		70		Dương tính	70	100	100	270
49B	101	30	70	50		20			30		Dương tính	70	30	90	90
50A	102		10	90	30	10			60		Dương tính	100	90	110	210
50B	103	100	70		10				20		Dương tính	0	30	0	70
51A	104	50	80	50			20				Dương tính	50	20	50	40
51B	105	NET								Không có bằng chứng về khối u					
52A	106	50	90	50			10				Dương tính	50	10	50	20

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
52B	107	90	90	10	10						Dương tính	10	10	10	10
53A	108		40	80	20	20	20		20		Dương tính	100	60	120	120
53B	109	50	80	50	20						Dương tính	50	20	50	20
54A	110		50	70	20	30	20		10		Dương tính	100	50	130	90
54B	111		20	80		20	20		60		Dương tính	100	80	120	220
55A	112	100	100								Âm tính	0	0	0	0
55B	113	100	100								Âm tính	0	0	0	0
56A	114	50	70	50	30						Dương tính	50	30	50	30
56B	115	100	100								Âm tính	0	0	0	0
57A	116	50	70	50	10		10		10		Dương tính	50	30	50	60
57B	117		80	50		50	10		10	Lượng nhỏ khối u	Dương tính	100	20	150	50
58A	118	10		80	20	10	40		40		Dương tính	90	100	100	220
58B	119		40	100	20		20		20	Lượng nhỏ khối u	Dương tính	100	60	100	120
59A	121			70		30	30		70		Dương tính	100	100	130	270
59B	122			30		70			100		Dương tính	100	100	170	300
60A	123	50	70	50	10		10		10		Dương tính	50	30	50	60
60B	124	10	30	70	20	20	20		30		Dương tính	90	70	110	150
61A	125	50		30		20	50		50		Dương tính	50	100	70	250

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
61B	126	100			20		30		50		Dương tính	0	100	0	230
62A	127		80	100			10		10		Dương tính	100	20	100	50
62B	128		90	80		20	10				Dương tính	100	10	120	20
63A	129	10	50	80		10	20		30		Dương tính	90	50	100	130
63B	130		100	90		10					Dương tính	100	0	110	0
64A	131		90	80		20	10				Dương tính	100	10	120	20
64B	132		60	70	10	30	20		10		Dương tính	100	40	130	80
65A	133	50	90	50			10				Dương tính	50	10	50	20
65B	134	70	100	30						Khối u bậc cao	Dương tính	30	0	30	0
66A	135		30	80		20	50		20		Dương tính	100	70	120	160
66B	136		100	100						Lượng nhỏ khối u	Dương tính	100	0	100	0
67A	137	10	20	80		10			80		Dương tính	90	80	100	240
67B	138	30	20	70			40		40		Dương tính	70	80	70	200
68A	139	20	90			20		60	10	Nhuộm không bào	Dương tính	80	10	220	30
68B	140		100	70				30			Dương tính	100	0	160	0
69A	141		40	20		80	30		30		Dương tính	100	60	180	150
69B	142		20	20	20	50	30	30	30		Dương tính	100	80	210	170

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
70A	143			50		50			100		Dương tính	100	100	150	300
70B	144		10	40	30	40	30	20	30		Dương tính	100	90	180	180
71A	145									Chỉ số một vài tế bào của khối u-không thể chấm điểm					
71B	71-2	60	50	20		20	20		30		Dương tính	40	50	60	130
72A	72-1		50	50		30	20	20	30	Bậccao hơn – âm tính đỉnh	Dương tính	100	50	170	130
72B	72-2	100	100								Âm tính	0	0	0	0
73A	73-1	20	80	80					20		Dương tính	80	20	80	60
73B	73-2	40	50	40	10	10	20	10	20		Dương tính	60	50	90	110
74A	74-1							100	100	Nhuộm không bào	Dương tính	100	100	300	300
74B	74-2		20	50	10	50	30		40		Dương tính	100	80	150	190
75A	75-1			70		30	30		70		Dương tính	100	100	130	270
75B	75-2	10	50	90	10		20		20		Dương tính	90	50	90	110
76A	76-1		10	60	10	40	20		60		Dương tính	100	90	140	230
76B	76-2			50	10	50	30		60		Dương tính	100	100	150	250
77A	77-1		20	90	20	10	20		40		Dương tính	100	80	110	180

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)							Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
77B	77-2	10	20	90	10		20		50		Dương tính	80	90	200
78A	78-1			100					100		Dương tính	100	100	300
78B	78-2			100					100		Dương tính	100	100	300
79A	79-1			80		20			100		Dương tính	100	120	300
79B	79-2			50		50			100		Dương tính	100	150	300
80A	80-1	90		10					100		Dương tính	100	10	300
80B	80- 2			20		50		30	100		Dương tính	100	210	300
81A	81-1			80		20	30		70		Dương tính	100	120	270
81B	81-2		10	90	10	10	20		60		Dương tính	100	110	230
82A	82-1			50		50			100		Dương tính	100	150	300
82B	82-2	20		80					100		Dương tính	80	80	300
83A	83-1	30		70	50		20		30		Dương tính	70	70	180
83B	83-2			80		20	20		80	Nhuộm thể Golgi trong bào chất	Dương tính	100	120	280
84A	84-1	80		20					100		Dương tính	20	20	300
84B	84-2	100	60		20		10		10		Dương tính	0	0	70
85A	85-1			100					100		Dương tính	100	100	300
85B	85-2	100							100		Dương tính	0	0	300
86A	86-1	10	40	80		10			60		Dương tính	90	100	180

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đinh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
86B	86-2			50		50			100		Dương tính	100	100	150	300
87A	87-1	10	10	80	20	10	20		50		Dương tính	90	90	100	210
87B	87-2	10	10	50	30	30	30	10	30		Dương tính	90	90	140	180
88A	88-1		30	80	20	20	20		30		Dương tính	100	70	120	150
88B	88-2		100	50		50					Dương tính	100	0	150	0
89A	89-1	100	100							Tế bào thận	Âm tính	0	0	0	0
89B	89-2	100	100								Âm tính	0	0	0	0
90A	90-1	50	100	20				30		Pancreas – Thần kinh nội tiết	Dương tính	50	0	110	0
90B	90-2		100			20		80		Nhuộm không bào	Dương tính	100	0	280	0
91A	91-1	100	100							Màng bụng-Sacôm mỡ	Âm tính	0	0	0	0
91B	91-2	100	100								Âm tính	0	0	0	0
92A	92-1	100	100							U mô đệm dạ dày ruột	Âm tính	0	0	0	0
92B	92-2	100	100								Âm tính	0	0	0	0
93A	93-1	50		30		20			100	Nhuộm thể Golgi trong bào chất	Dương tính	50	100	70	300

Mẫu #	Phiến kính #	Nhuộm đỉnh & bào chất GCC (Phần trăm)								Bình luận	Dương tính /Âm tính	% Dương tính	% Dương tính	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Bào chất	Đỉnh	Bào chất	Đỉnh
93B	93-2	50		30		20			100		Dương tính	50	100	70	300
94A	94-1	50		50					100		Dương tính	50	100	50	300
94B	94-2			80		20			100		Dương tính	100	100	120	300
95A	95-1			40		50		10	100		Dương tính	100	100	170	300
95B	95-2	50		50					100		Dương tính	50	100	50	300
96A	96-1					100			100		Dương tính	100	100	200	300
96B	96-2	100	40		20		20		20		Dương tính	0	60	0	120
97A	97-1	100	100							Tuyến tụy	Âm tính	0	0	0	0
97B	97-2	100	100								Âm tính	0	0	0	0
98A	98-1		100					100		Tử cung - Sacôm cơ trơn	Dương tính	100	0	300	0
98B	98-2		100					100			Dương tính	100	0	300	0
99A	99-1	10	100					90		Tụy-Thần kinh nội tiết	Dương tính	90	0	270	0
99B	99-2	100	100								Âm tính	0	0	0	0
100A	100-1			100			50		50	Dạ dày	Dương tính	100	100	100	250
100B	100-2		20	60		40	40		40		Dương tính	100	80	140	200

Tóm tắt kết quả nhuộm GCC IHC

Kết quả nhuộm GCC IHC nêu trong Ví dụ 3 và 4 thể hiện rằng GCC được biểu hiện trong nhiều loại khối u dạ dày-ruột ác tính, bao gồm các khối u trực tràng, dạ dày, ruột non và thực quản, cũng như các khối u không phải là dạ dày-ruột bao gồm các khối u tụy và bệnh ung thư tuyến phổi, caxinom phổi ở tế bào biểu mô có vảy, sacôm cơ trơn và sacôm cơ vân. Tóm tắt phân tích vi mảng các khối u khác nhau được thể hiện trong Bảng 33 sau.

Bảng 33: Phân tích TMA cho thấy GCC được biểu hiện trong nhiều loại khối u ác tính

Kiểu khối u	N được thử nghiệm	% GCC nhuộm dương tính *		
		Đỉnh/màng	Bào chất	% dương tính
Trực tràng ruột kết	298	76	90	95
D5 dày	154	33,1	63	79
Tuyến tụy	221	15,4	43,4	63
Thực quản	138	1,4	30	30
Bệnh ung thư tuyến phổi	81	2,4	25,6	44
T4 bào vảy ở phổi	74	0	10,8	10,8
Sacôm cơ trơn	18	0	44,4	44,4
Sacôm cơ vân	18	0	55,6	55,6

*(% dương tính xác định được bởi điểm số H >10)

Các mẫu lâm sàng khối u ác tính dạ dày-ruột và liên quan đến dạ dày-ruột ở người còn được thử nghiệm dương tính khi thay đổi lượng biểu hiện GCC, như -được tóm tắt trong Bảng 34 sau.

Bảng 34: Phần trăm loại u được sàng lọc dương tính C26001

	N	% dương tính bất kỳ	% lớn hơn 400 (theo điểm số H của đỉnh kết hợp/tụ hợp và bảo chất)
Trực tràng ruột kết	46	93,5	26,1
Dạ dày	9	77,8	0
Thực quản	14	78,6	7,1
Tuyến tụy	22	81,8	22,7
Ruột non	2	100	0
Tổng số	93	86,0	

(Dương tính được xác định là điểm số H > = 10 trong đỉnh hoặc bào chất)

Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 34 là tương tự với các kết quả quan sát được trong toàn bộ phép sàng lọc đã được tóm tắt trong Bảng 33.

Phân bố điểm số H kết hợp/tụ hợp của sự biểu hiện GCC trong các kiểu khối u lấy từ phép sàng lọc tuyển chọn bệnh nhân đối với thử nghiệm C26001 được thể hiện trên các Hình 2A đến 2D.

Phân bố điểm số H kết hợp/tụ hợp của sự biểu hiện GCC lấy từ các vi mảng khối u trực tràng, dạ dày, và tụy khác nhau được thử nghiệm được thể hiện trên các Hình 3A đến 3C.

Trong khi sáng chế được thể hiện và mô tả cùng với các tài liệu được trích dẫn để tạo ra các phương án của chúng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng các thay đổi khác nhau về dạng và chi tiết có thể được thực hiện ở đây mà không vượt quá phạm vi của sáng chế nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử kháng thể kháng GCC chứa ba vùng xác định bổ trợ của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2, và HCDR3) chứa các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 21, 22 và 23; và ba vùng xác định bổ trợ của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, và LCDR3) chứa các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 27, 28 và 29.

2. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13.

3. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó phân tử kháng thể này là:

(a) kháng thể đơn dòng; và/hoặc

(b) kháng thể thỏ hoặc thu được từ thỏ, tùy ý là kháng thể đơn dòng của thỏ hoặc kháng thể đơn dòng của thỏ được làm tương thích với người.

4. Phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phân tử kháng thể này được liên hợp với nhãn phát hiện được, trong đó nhãn phát hiện được này được chọn từ enzym có hoạt tính sinh học, phối tử, nhóm phụ gia, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất phát quang hóa học, chất phát quang sinh học, chất mang màu, chất giàu điện tử, chất thuận từ và chất phóng xạ.

5. Trình tự axit nucleic phân lập mã hóa phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

6. Vectơ chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc chứa trình tự axit nucleic phân lập theo điểm 5.

7. Phương pháp tạo ra phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chứa trình tự axit nucleic phân lập theo điểm 5 hoặc vectơ theo điểm 6 trong các điều kiện cho phép tạo ra phân tử kháng thể này, nhờ đó tạo ra được phân tử kháng thể này.

8. Phương pháp phát hiện phân tử GCC trong mẫu sinh học, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 và xác định xem phân tử kháng thể này có liên kết với phân tử GCC hay không.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó bước phát hiện phân tử GCC bao gồm thử nghiệm hóa mô miễn dịch.

10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc điểm 9, trong đó mẫu sinh học là mẫu sinh thiết khối u thu được từ bệnh nhân nghi mắc bệnh ung thư biểu hiện GCC, trong đó bệnh ung thư tùy ý được chọn từ bệnh ung thư đại trực tràng, ung thư dạ dày, ung thư ruột non, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư phổi, sarcom mô mềm, khối u ngoại bì thần kinh và khối u thần kinh nội tiết.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước định lượng mức biểu hiện GCC đỉnh và/hoặc bào tương trong mẫu sinh học này.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó việc định lượng bao gồm phương pháp tính điểm H.

13. Kit chứa phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và phần hướng dẫn sử dụng.

14. Phương pháp xác định độ nhạy của các tế bào ung thư với liệu pháp hướng đích GCC, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

i) cho mẫu tế bào ung thư thu được từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư tiếp xúc với phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4; và

ii) phát hiện sự tạo thành phức giữa phân tử kháng thể này và protein GCC trong mẫu, nhờ đó xác định độ nhạy của tế bào ung thư với liệu pháp hướng đích GCC.

15. Hỗn hợp phản ứng chứa mẫu sinh học và phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

16. Phương pháp tạo ra báo cáo về việc điều trị bệnh ung thư cá nhân hóa bằng cách sử dụng phân tử kháng thể kháng GCC theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

i) cho mẫu sinh học chứa một hoặc nhiều tế bào ung thư thu được từ bệnh nhân ung thư nghi mắc bệnh ung thư biểu hiện GCC tiếp xúc với phân tử kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4;

ii) phát hiện sự tạo thành phức giữa phân tử kháng thể này và protein GCC trong mẫu sinh học;

iii) định lượng mức biểu hiện GCC trong mẫu sinh học từ phức này;

iv) so sánh mức biểu hiện GCC với dữ liệu của liệu pháp hướng đích GCC; và

v) chọn liệu pháp hướng đích GCC và, tùy ý, định ra chế độ liều dựa trên mức biểu hiện GCC được xác định trong mẫu.

17. Phương pháp theo điểm 14 hoặc điểm 16, trong đó bệnh ung thư được chọn từ ung thư đại trực tràng, ung thư dạ dày, ung thư ruột non, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư phổi, sarcom mô mềm, khối u ngoại bì thần kinh, và khối u thần kinh nội tiết.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> PHÂN TỬ KHÁNG THỂ KHÁNG GCC, VECTƠ VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PHÂN TỬ KHÁNG THỂ NÀY

<130> MPI12-018P1RNWOM

<140> US 61/639,376

<141> 2012-04-27

<160> 89

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 2

<211> 3360

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 2

gaccagagag aagcgtgggg aagagtgggc tgagggactc cactagaggc tgtccatctg 60

gattccctgc ctccctagga gcccaacaga gcaaagcaag tgggcacaag gagtatggtt 120

ctaacgtgat tggggtcatg aagacgttgc tgttggactt ggctttgtgg tcactgctct 180

tccagcccgg gtggctgtcc tttagttccc aggtgagtca gaactgccac aatggcagct 240

atgaaatcag cgtcctgatg atgggcaact cagcctttgc agagcccctg aaaaacttgg 300

aagatgcggt gaatgagggg ctggaaatag tgagaggacg tctgcaaaat gctggcctaa 360

atgtgactgt gaacgctact ttcatgtatt cggatggtct gattcataac tcaggcgact 420

gccggagtag cacctgtgaa ggcctcgacc tactcaggaa aatttcaaat gcacaacgga 480

tgggctgtgt cctcataggg ccctcatgta catactccac cttccagatg taccttgaca 540

cagaattgag ctaccccatg atctcagctg gaagttttgg attgtcatgt gactataaag 600

aaaccttaac caggctgatg tctccagcta gaaagttgat gtacttcttg gttaactttt 660

ggaaaaccaa cgatctgccc ttcaaaactt attcctggag cacttcgtat gtttacaaga 720

atggtacaga aactgaggac tgtttctggt accttaatgc tctggaggct agcgtttcct 780

atttctccca cgaactcggc tttaaggtgg tgttaagaca agataaggag tttcaggata 840
tcttaatgga ccacaacagg aaaagcaatg tgattattat gtgtggtggt ccagagttcc 900
tctacaagct gaagggtgac cgagcagtgg ctgaagacat tgtcattatt ctagtggatc 960
ttttcaatga ccagtacttt gaggacaatg tcacagcccc tgactatatg aaaaatgtcc 1020
ttgttctgac gctgtctcct gggaattccc ttctaaatag ctctttctcc aggaatctat 1080
caccaacaaa acgagacttt gctcttgcct atttgaatgg aatcctgctc tttggacata 1140
tgctgaagat atttcttgaa aatggagaaa atattaccac ccccaaattt gctcatgctt 1200
tcaggaatct cacttttgaa gggtatgacg gtccagtgac cttggatgac tgggggggatg 1260
ttgacagtac catggtgctt ctgtatacct ctgtggacac caagaaatac aaggttcttt 1320
tgacctatga tacccacgta aataagacct atcctgtgga tatgagcccc acattcactt 1380
ggaagaactc taaacttcct aatgatatta caggccgggg ccctcagatc ctgatgattg 1440
cagtcttcac cctcactgga gctgtggtgc tgctcctgct cgtcgctctc ctgatgctca 1500
gaaaatatag aaaagattat gaacttcgtc agaaaaaatg gtcccacatt cctcctgaaa 1560
atatctttcc tctggagacc aatgagacca atcatgttag cctcaagatc gatgatgaca 1620
aaagacgaga tacaatccag agactacgac agtgcaaata cgacaaaaag cgagtgattc 1680
tcaaagatct caagcacaat gatggtaatt tcactgaaaa acagaagata gaattgaaca 1740
agttgcttca gattgactat tacaacctga ccaagttcta cggcacagtg aaacttgata 1800
ccatgatctt cggggtgata gaatactgtg agagaggatc cctccgggaa gttttaaatg 1860
acacaatttc ctaccctgat ggcacattca tggattggga gtttaagatc tctgtcttgt 1920
atgacattgc taagggaatg tcatatctgc actccagtaa gacagaagtc catggtcgtc 1980
tgaaatctac caactgcgta gtggacagta gaatggtggt gaagatcact gattttggct 2040
gcaattccat tttacctcca aaaaaggacc tgtggacagc tccagagcac ctccgccaag 2100
ccaacatctc tcagaaagga gatgtgtaca gctatgggat catcgcacag gagatcatcc 2160
tgcggaaaga aaccttctac actttgagct gtcgggaccg gaatgagaag attttcagag 2220
tggaaaattc caatggaatg aaacccttcc gcccagattt attcttggaa acagcagagg 2280
aaaaagagct agaagtgtac ctacttgtaa aaaactgttg ggaggaagat ccagaaaaga 2340
gaccagattt caaaaaaatt gagactacac ttgccaagat atttggactt tttcatgacc 2400
aaaaaaatga aagctatatg gataccttga tccgacgtct acagctatat tctcgaaacc 2460
tggaacatct ggtagaggaa aggacacagc tgtacaaggc agagagggac agggctgaca 2520
gacttaactt tatgttgctt ccaaggctag tggtaaagtc tctgaaggag aaaggctttg 2580
tggagccgga actatatgag gaagttacaa tctacttcag tgacattgta ggtttcacta 2640
ctatctgcaa atacagcacc cccatggaag tggtggacat gcttaatgac atctataaga 2700
gttttgacca cattgttgat catcatgatg tctacaaggt ggaaaccatc ggtgatgcgt 2760
acatggtggc tagtggtttg cctaagagaa atggcaatcg gcatgcaata gacattgcca 2820
agatggcctt ggaaatcctc agcttcatgg ggacctttga gctggagcat cttcctggcc 2880
tcccaatatg gattcgcatt ggagttcact ctggtccctg tgctgctgga gttgtgggaa 2940
tcaagatgcc tcgttattgt ctatttggag atacggtcaa cacagcctct aggatggaat 3000
ccactggcct ccctttgaga attcacgtga gtggctccac catagccatc ctgaagagaa 3060
ctgagtgcca gttcctttat gaagtgagag gagaaacata cttaaaggga agaggaaatg 3120
agactaccta ctggctgact gggatgaagg accagaaatt caacctgcca acccctccta 3180

ctgtggagaa tcaacagcgt ttgcaagcag aattttcaga catgattgcc aactctttac 3240
agaaaagaca ggcagcaggg ataagaagcc aaaaacccag acgggtagcc agctataaaa 3300
aaggcactct ggaatacttg cagctgaata ccacagacaa ggagagcacc tatttttaaa 3360

<210> 3
<211> 1073
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 3

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
1 5 10 15
Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
20 25 30
Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
35 40 45
Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
50 55 60
Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
65 70 75 80
Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
85 90 95
Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
100 105 110
Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
115 120 125
Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
130 135 140
Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
145 150 155 160
Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
165 170 175
Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
180 185 190
Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
195 200 205
Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
210 215 220
Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
225 230 235 240

Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
245 250 255
Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
260 265 270
Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
275 280 285
Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
290 295 300
Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
305 310 315 320
Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
325 330 335
Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
340 345 350
His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
355 360 365
Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
370 375 380
Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400
Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415
Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
420 425 430
Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
435 440 445
Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg
450 455 460
Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
465 470 475 480
Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
485 490 495
Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Asp Lys Lys Arg
500 505 510
Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys
515 520 525
Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Asn Leu
530 535 540
Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
545 550 555 560

Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
565 570 575
Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser
580 585 590
Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
595 600 605
Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser
610 615 620
Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro
625 630 635 640
Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn
645 650 655
Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu
660 665 670
Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg
675 680 685
Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe
690 695 700
Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val
705 710 715 720
Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro
725 730 735
Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe
740 745 750
His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu
755 760 765
Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln
770 775 780
Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu
785 790 795 800
Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu
805 810 815
Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly
820 825 830
Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met
835 840 845
Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp
850 855 860
Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly
865 870 875 880

Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met
885 890 895
Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu
900 905 910
Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys
915 920 925
Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly
930 935 940
Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu
945 950 955 960
Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu
965 970 975
Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
980 985 990
Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe
995 1000 1005
Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln
1010 1015 1020
Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln
1025 1030 1035
Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
1040 1045 1050
Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
1055 1060 1065
Glu Ser Thr Tyr Phe
1070

<210> 4
<211> 1380
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 4
atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
tcagtgaagg agtccggggg aggcctcttc aagccaacgg ataccctgac actcacctgc 120
accgtctctg gattctccct cagtagtcat agaatgaact gggtccgcca gactccaggg 180
aaggggctgg aatggatcgc aatcattact cataatagta tcacatacta cgcgagctgg 240
gcgaaaagcc gatccaccat caccagaaac accagcgaga acacggtgac tctgaaaatg 300

accagtctga cagccgcgga cacggccact tatttctgtg ccagagagga tagtatgggg 360
tattattttg acttgtgggg cccaggcacc ctggtcacca tctcctcagg gcaacctaag 420
gctccatcag tcttcccact ggccccctgc tgcggggaca cacccagctc cacggtgacc 480
ctgggctgcc tggtcaaagg gtacctcccg gagccagtga ccgtgacctg gaactcgggc 540
accctcacca atggggtacg caccttcccg tccgtccggc agtcctcagg cctctactcg 600
ctgagcagcg tggtgagcgt gacctcaagc agccagcccg tcacctgcaa cgtggcccac 660
ccagccacca acaccaaagt ggacaagacc gttgcgccct cgacatgcag caagcccacg 720
tgcccacccc ctgaactcct gggggggaccg tctgtcttca tcttcccccc aaaacccaag 780
gacaccctca tgatctcacg caccccgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccag 840
gatgaccccg aggtgcagtt cacatggtac ataaacaacg agcaggtgcg caccgcccgg 900
ccgccgctac gggagcagca gttcaacagc acgatccgcg tggtcagcac cctccccatc 960
gcgcaccagg actggctgag gggcaaggag ttcaagtgca aagtccacaa caaggcactc 1020
ccggccccca tcgagaaaac catctccaaa gccagagggc agcccctgga gccgaaggtc 1080
tacaccatgg gccctccccg ggaggagctg agcagcaggt cggtcagcct gacctgcatg 1140
atcaacggct tctacccttc cgacatctcg gtggagtggg agaagaacgg gaaggcagag 1200
gacaactaca agaccacgcc ggccgtgctg gacagcgacg gctcctactt cctctacagc 1260
aagctctcag tgcccacgag tgagtggcag cggggcgacg tcttcacctg ctccgtgatg 1320
cacgaggcct tgcacaacca ctacacgcag aagtccatct cccgctctcc gggtaaatga 1380

<210> 5
<211> 711
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 5
atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
gtcaccatca agtgccaggc cagtcagagc attagtaact ggttagcctg gtatcagcag 180
aaaccagggc agtctcccaa gcccctgatc tacagggcat ccactctggc atctggggtc 240
tcatcgcggt tcagaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagtggcgtg 300
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt cagcagactt atactaataa tcatcttgat 360
aatggtttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcaaaggtg atccagttgc acctactgtc 420
ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcaccat cgtgtgtgtg 480
gcgaataaat actttcccga tgtcaccgtc acctgggagg tggatggcac cacccaaaca 540
actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 600
agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcagggtg 660
acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgtta g 711

<210> 6
<211> 1377
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 6
atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
tcggtggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga cacccctgac actcacctgc 120
acagcctctg gatccgacat cagtaactat gcaatatcct gggtccgcca ggctccaggg 180
aaggggctgg aattcatcgg atatattagt tatggtaaaa gtatatacta cgcgagctgg 240
gcgaaaggcc ggttcgccat ctccaaaacc tcgtcgacca cggtggatct ggaaatcacc 300
agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttttgtgcca gagaggatag tgctacttat 360
agtcctaact tgtggggccc aggcaccctg gtcaccgtct cctcagggca acctaaggct 420
ccatcagtct tcccactggc cccctgctgc ggggacacac ccagctccac ggtgaccctg 480
ggctgcctgg tcaaagggta cctcccggag ccagtgaccg tgacctggaa ctcgggcacc 540
ctcaccaatg gggtacgcac cttcccgtcc gtccggcagt cctcaggcct ctactcgctg 600
agcagcgtgg tgagcgtgac ctcaagcagc cagcccgtca cctgcaacgt ggcccaccca 660
gccaccaaca ccaaagtgga caagaccgtt gcgccctcga catgcagcaa gcccacgtgc 720
ccacccccctg aactcctggg gggaccgtct gtcttcatct tcccccccaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcacgcac ccccgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccaggat 840
gaccccgagg tgcagttcac atggtacata aacaacgagc aggtgcgcac cgcccggccg 900
ccgctacggg agcagcagtt caacagcacg atccgcgtgg tcagcaccct ccccatcgcg 960
caccaggact ggctgagggg caaggagttc aagtgcaaag tccacaacaa ggcactcccg 1020
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc agagggcagc ccctggagcc gaaggtctac 1080
accatgggcc ctccccggga ggagctgagc agcaggtcgg tcagcctgac ctgcatgatc 1140
aacggcttct acccttccga catctcggtg gagtgggaga agaacgggaa ggcagaggac 1200
aactacaaga ccacgccggc cgtgctggac agcgacggct cctacttcct ctacagcaag 1260
ctctcagtgc ccacgagtga gtggcagcgg ggcgacgtct tcacctgctc cgtgatgcac 1320
gaggccttgc acaaccacta cacgcagaag tccatctccc gctctccggg taaatga 1377

<210> 7
<211> 711
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 7

atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
gtcaccatca agtgccaggc cagtcagagt attaacacct acttagcctg gtatcagcag 180
aaaccagggc agcgtcccaa gctcctgatc tacagggcat ccactctggc atctggggtc 240
tcatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat cagcggcgtg 300
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagggtt atagttataa taatcttgat 360
cgtgctttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcacaggtg atccagttgc acctactgtc 420
ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcaccat cgtgtgtgtg 480
gcgaataaat actttcccga tgtcaccgtc acctgggagg tggatggcac cacccaaaca 540
actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 600
agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcaaggtg 660
acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgtta g 711

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 8
Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr
1 5 10 15
Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 9
Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro
1 5 10 15
Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
20 25

<210> 10
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 10
cagtcagtga aggagtccgg gggaggcctc ttcaagccaa cggataccct gacactcacc 60
tgcaccgtct ctggattctc cctcagtagt catagaatga actgggtccg ccagactcca 120
gggaaggggc tggaatggat cgcaatcatt actcataata gtatcacata ctacgcgagc 180
tgggcgaaaa gccgatccac catcaccaga aacaccagcg agaacacggt gactctgaaa 240
atgaccagtc tgacagccgc ggacacggcc acttatttct gtgccagaga ggatagtatg 300
gggtattatt ttgacttgtg gggcccaggc accctggtca ccatctcctc a 351

<210> 11
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 11
Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Gly Leu Phe Lys Pro Thr Asp Thr
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Arg
20 25 30
Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala
35 40 45
Ile Ile Thr His Asn Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60
Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Ser Glu Asn Thr Val Thr Leu Lys
65 70 75 80
Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95
Glu Asp Ser Met Gly Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Ile Ser Ser
115

<210> 12
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 12
gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60
atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt aactggttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggcagtctc ccaagcccct gatctacagg gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180
cggttcagag gcagtggatc tgggacacag ttcactctca ccatcagtgg cgtggagtgt 240
gccgatgctg ccacttacta ctgtcagcag acttatacta ataatcatct tgataatggt 300
ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa 330

<210> 13
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 13
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Asn Asn His
85 90 95
Leu Asp Asn Gly Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 14

cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60
tgcacagcct ctggatccga catcagtaac tatgcaatat cctgggtccg ccaggctcca 120
gggaaggggc tggaattcat cggatatatt agttatggta aaagtatata ctacgcgagc 180
tgggcgaaag gccggttcgc catctccaaa acctcgtcga ccacggtgga tctggaaatc 240
accagtccga caaccgagga cacggccacc tatttttgtg ccagagagga tagtgctact 300
tatagtccta acttgtgggg cccaggcacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 15
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 15

Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Pro
1				5				10						15	
Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Ser	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Ala
			20					25					30		
Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Ile	Gly
		35					40					45			
Tyr	Ile	Ser	Tyr	Gly	Lys	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	Gly
	50					55					60				
Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Leu	Glu	Ile
65					70					75					80
Thr	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Glu
				85					90					95	
Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Ser	Pro	Asn	Leu	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser												
		115													

<210> 16
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 16

gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60
atcaagtgcc aggccagtca gagtattaac acctacttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggcagcgtc ccaagctcct gatctacagg gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180
cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cgtggagtgt 240
gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag ggttatagtt ataataatct tgatcgtgct 300
ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaca 330

<210> 17
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 17

Ala	Tyr	Asp	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	Val	Glu	Val	Ala	Val	Gly
1				5				10					15		
Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Asn	Thr	Tyr
			20					25				30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Arg	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Cys
65					70					75					80
Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Asn
				85					90					95	
Leu	Asp	Arg	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Val	Val	Val	Thr		
			100					105					110		

<210> 18
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 18
agtcatagaa tgaac 15

<210> 19
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp
<400> 19
atcattactc ataatagtat cacatactac gcgagctggg cgaaaagc 48

<210> 20
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 20
gaggatagta tggggtatta ttttgacttg 30

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 21
Ser His Arg Met Asn
1 5

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 22
Ile Ile Thr His Asn Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser

1 5 10 15

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 23
Glu Asp Ser Met Gly Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 24
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 24
caggccagtc agagcattag taactggtta gcc 33

<210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 25
agggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 26
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 26
cagcagactt atactaataa tcatcttgat aatggt 36

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 27
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 28
Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 29
Gln Gln Thr Tyr Thr Asn Asn His Leu Asp Asn Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 15
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 30
aactatgcaa tatcc 15

<210> 31
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 31
tatattagtt atggtaaaag tatatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

<210> 32
<211> 12
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 32
agtcctaact tg 12

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 33
Asn Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 34
<211> 16

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 34
Tyr Ile Ser Tyr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 35
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Ser Pro Asn Leu
1 5 10

<210> 36
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 36
caggccagtc agagtattaa cacctactta gcc 33

<210> 37
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 37
agggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 38
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 38
caacagggtt atagttataa taatcttgat cgtgct 36

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 39
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 40
Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 41

Gln Gln Gly Tyr Ser Tyr Asn Asn Leu Asp Arg Ala
1 5 10

<210> 42
<211> 459
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 42
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Gly Leu Phe Lys Pro
20 25 30
Thr Asp Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser His Arg Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Ala Ile Ile Thr His Asn Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
65 70 75 80
Ala Lys Ser Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Ser Glu Asn Thr Val
85 90 95
Thr Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
100 105 110
Cys Ala Arg Glu Asp Ser Met Gly Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro
115 120 125
Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val
130 135 140
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr
145 150 155 160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
165 170 175
Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val
180 185 190
Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr
195 200 205
Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn
210 215 220
Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr

225 230 235 240
Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
245 250 255
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr
275 280 285
Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg
290 295 300
Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile
305 310 315 320
Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His
325 330 335
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg
340 345 350
Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu
355 360 365
Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe
370 375 380
Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu
385 390 395 400
Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
405 410 415
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly
420 425 430
Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445
Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 43
<211> 236
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 43
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30
Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45
Gln Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60
Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80
Ser Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Thr Tyr Thr Asn Asn His Leu Asp Asn Gly Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125
Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val
145 150 155 160
Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly
165 170 175
Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser
180 185 190
Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr
195 200 205
Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Arg Val Thr Gln Gly Thr
210 215 220
Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
225 230 235

<210> 44
<211> 458
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 44
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro

```
            20                  25                  30
Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser Asp Ile Ser
        35                  40                  45
Asn Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
    50                  55                  60
Phe Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ala Ser Trp
65                  70                  75                  80
Ala Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp
                85                  90                  95
Leu Glu Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
            100                 105                 110
Ala Arg Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Ser Pro Asn Leu Trp Gly Pro Gly
        115                 120                 125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe
    130                 135                 140
Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu
145                 150                 155                 160
Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
                165                 170                 175
Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg
            180                 185                 190
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser
        195                 200                 205
Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr
    210                 215                 220
Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys
225                 230                 235                 240
Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
                245                 250                 255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270
Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp
        275                 280                 285
Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu
    290                 295                 300
Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala
305                 310                 315                 320
His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn
                325                 330                 335
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly
```

340 345 350

Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu
355 360 365

Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
405 410 415

Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp
420 425 430

Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 45
<211> 236
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 45

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Tyr Ser Tyr Asn Asn Leu Asp Arg Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Thr Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val
145 150 155 160
Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly
165 170 175
Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser
180 185 190
Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr
195 200 205
Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr
210 215 220
Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
225 230 235

<210> 46
<211> 420
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 46
Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
1 5 10 15
Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
20 25 30
Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
35 40 45
Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
50 55 60
Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
65 70 75 80
Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
85 90 95
Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
100 105 110
Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
115 120 125
Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
130 135 140
Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
145 150 155 160

Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
165 170 175
Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
180 185 190
Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
195 200 205
Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
210 215 220
Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
225 230 235 240
Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
245 250 255
Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
260 265 270
Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
275 280 285
Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
290 295 300
Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
305 310 315 320
Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
325 330 335
Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
340 345 350
His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
355 360 365
Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
370 375 380
Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400
Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415
Asn Ser Lys Leu
420

<210> 47
<211> 2028
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

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

<400> 47

cgcggatccc tcaccatgaa gacgttgctg ttggacttgg ctttgtggtc actgctcttc 60
cagcccgggt ggctgtcctt tagttcccag gtgagtcaga actgccacaa tggcagctat 120
gaaatcagcg tcctgatgat gggcaactca gcctttgcag agcccctgaa aaacttggaa 180
gatgcggtga atgaggggct ggaaatagtg agaggacgtc tgcaaaatgc tggcctaaat 240
gtgactgtga acgctacttt catgtattcg gatggtctga ttcataactc aggcgactgc 300
cggagtagca cctgtgaagg cctcgaccta ctcaggaaaa tttcaaatgc acaacggatg 360
ggctgtgtcc tcatagggcc ctcatgtaca tactccacct tccagatgta ccttgacaca 420
gaattgagct accccatgat ctcagctgga agttttggat tgtcatgtga ctataaagaa 480
accttaacca ggctgatgtc tccagctaga aagttgatgt acttcttggt taacttttgg 540
aaaaccaacg atctgccctt caaaacttat tcctggagca cttcgtatgt ttacaagaat 600
ggtacagaaa ctgaggactg tttctggtac cttaatgctc tggaggctag cgtttcctat 660
ttctcccacg aactcggctt taaggtggtg ttaagacaag ataaggagtt tcaggatatc 720
ttaatggacc acaacaggaa aagcaatgtg attattatgt gtggtggtcc agagttcctc 780
tacaagctga agggtgaccg agcagtggct gaagacattg tcattattct agtggatctt 840
ttcaatgacc agtacttgga ggacaatgtc acagcccctg actatatgaa aaatgtcctt 900
gttctgacgc tgtctcctgg gaattccctt ctaaatagct ctttctccag gaatctatca 960
ccaacaaaac gagactttgc tcttgcctat ttgaatggaa tcctgctctt tggacatatg 1020
ctgaagatat ttcttgaaaa tggagaaaat attaccaccc ccaaatttgc tcatgctttc 1080
aggaatctca cttttgaagg gtatgacggt ccagtgacct tggatgactg gggggatgtt 1140
gacagtacca tggtgcttct gtatacctct gtggacacca agaaatacaa ggttcttttg 1200
acctatgata cccacgtaaa taagacctat cctgtggata tgagccccac attcacttgg 1260
aagaactcta aacttcctaa tgatattaca ggccggggcc ctcagcccag agtgcccata 1320
acacagaacc cctgtcctcc actcaaagag tgtcccccat gcgcagctcc agacctcgca 1380
ggtgcaccat ccgtcttcat cttccctcca aagatcaagg atgtactcat gatctccctg 1440
agccccatgg tcacatgtgt ggtggtggat gtgagcgagg atgacccaga cgtccagatc 1500
agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac acagctcaga cacaaaccca tagagaggat 1560
tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt 1620
ggcaaggcat tcaaatgcaa ggtcaacaac agagccctcc catcccccat cgagaaaacc 1680
atctcaaaac ccagagggcc agtaagagct ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagca 1740
gaagagatga ctaagaaaga gttcagtctg acctgcatga tcacaggctt cttacctgcc 1800
gaaattgctg tggactggac cagcaatggg cgtacagagc aaaactacaa gaacaccgca 1860
acagtcctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctcagagt acaaaagagc 1920
acttgggaaa gaggaagtct tttcgcctgc tcagtggtcc acgagggtct gcacaatcac 1980
cttacgacta agaccatctc ccggtctctg ggtaaataat ctagagca 2028

<210> 48

<211> 667

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 48

Met	Lys	Thr	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Trp	Ser	Leu	Leu	Phe	Gln
1				5				10						15	
Pro	Gly	Trp	Leu	Ser	Phe	Ser	Ser	Gln	Val	Ser	Gln	Asn	Cys	His	Asn
			20					25					30		
Gly	Ser	Tyr	Glu	Ile	Ser	Val	Leu	Met	Met	Gly	Asn	Ser	Ala	Phe	Ala
		35					40					45			
Glu	Pro	Leu	Lys	Asn	Leu	Glu	Asp	Ala	Val	Asn	Glu	Gly	Leu	Glu	Ile
	50					55					60				
Val	Arg	Gly	Arg	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Thr	Val	Asn	Ala
65					70					75					80
Thr	Phe	Met	Tyr	Ser	Asp	Gly	Leu	Ile	His	Asn	Ser	Gly	Asp	Cys	Arg
				85					90					95	
Ser	Ser	Thr	Cys	Glu	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile	Ser	Asn	Ala
			100					105					110		
Gln	Arg	Met	Gly	Cys	Val	Leu	Ile	Gly	Pro	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Thr
		115					120					125			
Phe	Gln	Met	Tyr	Leu	Asp	Thr	Glu	Leu	Ser	Tyr	Pro	Met	Ile	Ser	Ala
	130					135					140				
Gly	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Cys	Asp	Tyr	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu
145					150					155					160
Met	Ser	Pro	Ala	Arg	Lys	Leu	Met	Tyr	Phe	Leu	Val	Asn	Phe	Trp	Lys
				165					170					175	
Thr	Asn	Asp	Leu	Pro	Phe	Lys	Thr	Tyr	Ser	Trp	Ser	Thr	Ser	Tyr	Val
			180					185					190		
Tyr	Lys	Asn	Gly	Thr	Glu	Thr	Glu	Asp	Cys	Phe	Trp	Tyr	Leu	Asn	Ala
		195					200					205			
Leu	Glu	Ala	Ser	Val	Ser	Tyr	Phe	Ser	His	Glu	Leu	Gly	Phe	Lys	Val
	210					215					220				
Val	Leu	Arg	Gln	Asp	Lys	Glu	Phe	Gln	Asp	Ile	Leu	Met	Asp	His	Asn
225					230					235					240
Arg	Lys	Ser	Asn	Val	Ile	Ile	Met	Cys	Gly	Gly	Pro	Glu	Phe	Leu	Tyr
				245					250					255	
Lys	Leu	Lys	Gly	Asp	Arg	Ala	Val	Ala	Glu	Asp	Ile	Val	Ile	Ile	Leu
			260					265					270		

Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
275 280 285
Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
290 295 300
Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
305 310 315 320
Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
325 330 335
Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
340 345 350
His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
355 360 365
Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
370 375 380
Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400
Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415
Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Pro Arg
420 425 430
Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro
435 440 445
Cys Ala Ala Pro Asp Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
450 455 460
Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr
465 470 475 480
Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser
485 490 495
Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His
500 505 510
Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile
515 520 525
Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Ala Phe Lys Cys Lys Val Asn
530 535 540
Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg
545 550 555 560
Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu
565 570 575
Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe
580 585 590

Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu
595 600 605
Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
610 615 620
Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly
625 630 635 640
Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu
645 650 655
Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys
660 665

<210> 49
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 49
cgcggatccc tcaccatgaa gacgttgctg ttggacttgg c 41

<210> 50
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 50
tgggcactct gggctgaggg ccccggcctg taatatcatt ag 42

<210> 51
<211> 49
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 51
caggccgggg ccctcagccc agagtgccca taacacagaa cccctgtcc 49

<210> 52
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 52
tgctctagat tatttaccca gagaccggga gatggtctta 40

<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 53
acctgtggag ctcttactgg 20

<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 54
catttcaggt gtcgtgagga 20

<210> 55
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 55
atttaggtga cactatag 18

<210> 56
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 56
gttttcccag tcacgac 17

<210> 57
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mồi tổng hợp

<400> 57
aacagctatg accatg 16

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 58
Pro Arg Val Pro Ile Thr Glu Asn
1 5

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 59
Leu Leu Gly Gly
1

<210> 60
<211> 4
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 60
Leu Ala Gly Ala
1

<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 61
Lys Lys Gly Gly
1

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 62
Lys Ala Gly Ala
1

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 63
Glu Phe Lys Cys Lys
1   5

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 64
Ala Phe Lys Cys Lys
1 5

<210> 65
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 65
Phe Lys Cys Lys
1

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 66
Gly Arg Gly Pro Gln
1 5

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 67
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 68
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 68
Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 69
Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His
1 5 10

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 70
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 71
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 72
Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 73
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 73
ggttactact ggagc 15

<210> 74
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp
<400> 74
gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aacccgtccc tcaag 45

<210> 75
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 75
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac 33

<210> 76
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 76
agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcc 33

<210> 77
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 77
ggtgcatcca ccagggccac t 21

<210> 78
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 78
cagcagtata aaacctggcc tcggacg 27

<210> 79
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 79
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 80
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 357

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 81
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caacgacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccctg 240
aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgcgag agaacgtgga 300
tacacctatg gtaactttga ccactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 82
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 82
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agaaacttag cctggtatca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg aatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcggcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataaaacct ggcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaacg tggaaatcaa a 321

<210> 83
<211> 1444
<212> ADN
<213> Người hiện đại
<400> 83
gaattcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac agctacaggt 60
gtccactccc aggtgcagct acagcagtgg ggcgcaggac tgttgaagcc ttcggagacc 120
ctgtccctca cctgcgctgt ctttggtggg tctttcagtg gttactactg gagctggatc 180
cgccagcccc cagggaaggg gctggagtgg attggggaaa tcaatcatcg tggaaacacc 240
aacgacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag 300
ttcgccctga agctgagttc tgtgaccgcc gcggacacgg ctgtttatta ctgtgcgaga 360
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 420

agctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 780
gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 840
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1080
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1140
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataat agggataaca gggtaatact 1440
agag 1444

<210> 84
<211> 468
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 84

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Phe
35 40 45
Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ala Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp
115 120 125

```
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
    130                 135                 140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145                 150                 155                 160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                165                 170                 175
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
            180                 185                 190
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
        195                 200                 205
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
    210                 215                 220
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225                 230                 235                 240
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
                245                 250                 255
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            260                 265                 270
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        275                 280                 285
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    290                 295                 300
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305                 310                 315                 320
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                325                 330                 335
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            340                 345                 350
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        355                 360                 365
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    370                 375                 380
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385                 390                 395                 400
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                405                 410                 415
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            420                 425                 430
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        435                 440                 445
```

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460
Ser Pro Gly Lys
465

<210> 85
<211> 722
<212> ADN
<213> Người hiện đại
<400> 85
gcggccgcct caccatggga tggagctgta tcatcctctt cttggtagca acagctacag 60
gtgtccactc cgaaatagtg atgacgcagt ctccagccac cctgtctgtg tctccagggg 120
aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcctggtatc 180
agcagaaacc tggccaggct cccaggctcc tcatctatgg tgcatccacc agggccactg 240
gaatcccagc caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga gttcactctc accatcggca 300
gcctgcagtc tgaagatttt gcagtttatt actgtcagca gtataaaacc tggcctcgga 360
cgttcggcca agggaccaac gtggaaatca aacgtacggt ggctgcacca tctgtcttca 420
tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga 480
ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg 540
gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca 600
gcaccctgac cctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca 660
cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttagtcta 720
ga 722

<210> 86
<211> 233
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 86
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val
20 25 30
Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45
Ser Arg Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60
Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser

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

<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<220>
<223> H đầu N
<220>
<221> dấu hiệu khác
<222> (1)..(6)
<223> Liên kết đisulfua giữa các gốc
<220>
<221> dấu hiệu khác
<222> (2)..(10)
<223> Liên kết đisulfua giữa các gốc
<220>
<221> dấu hiệu khác
<222> (5)..(13)

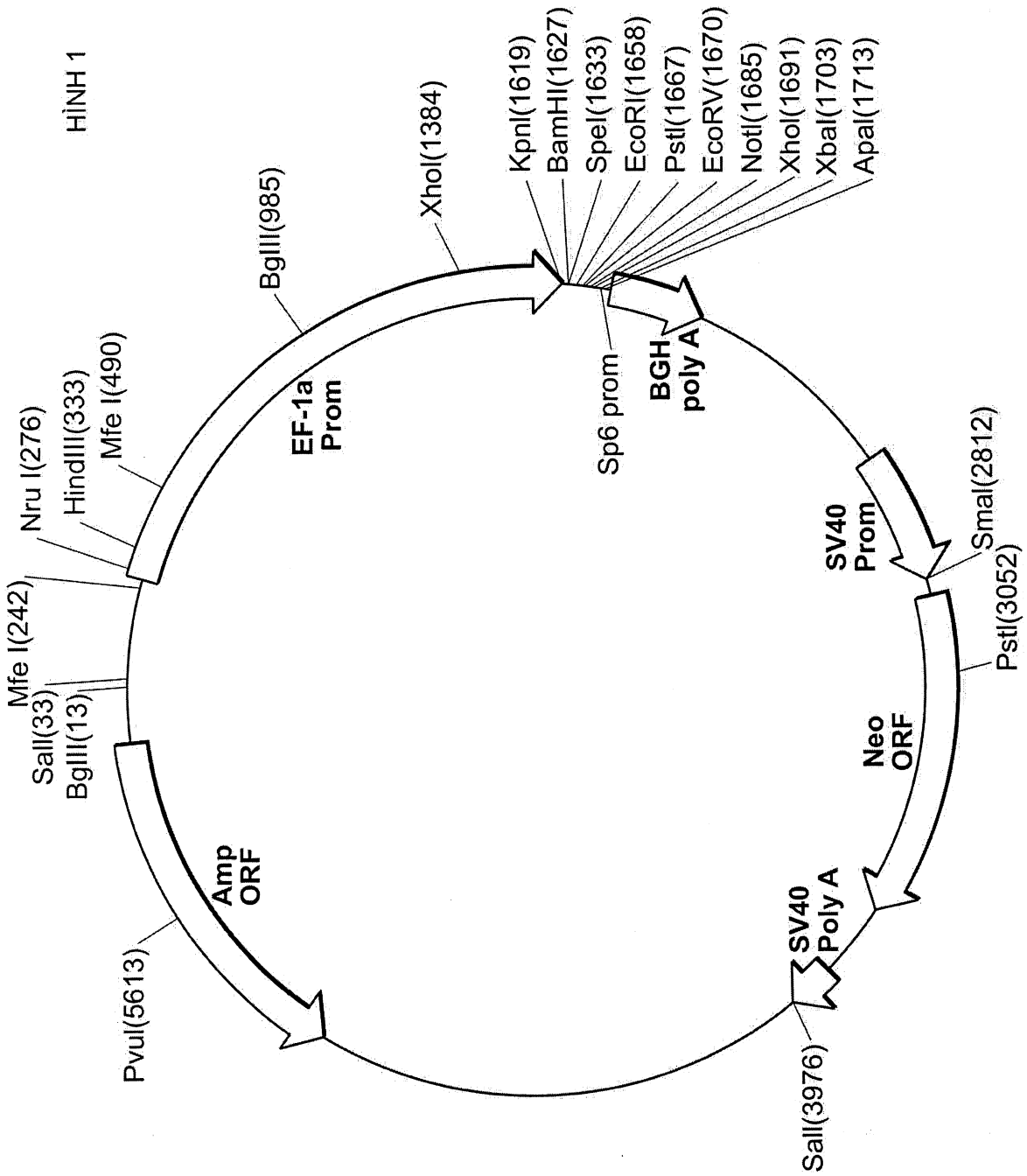
<223> Liên kết đisulfua giữa các gốc
<220>
<223> OH đầu C
<400> 87
Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10

<210> 88
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đuôi Hfis tổng hợp

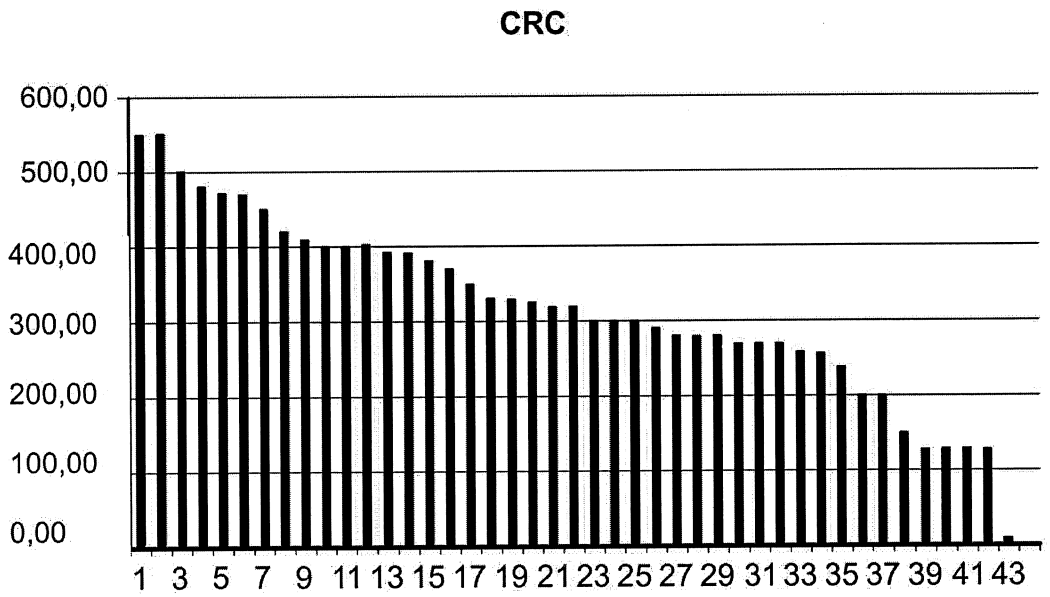
<220>
<221> dấu hiệu khác
<222> (1)..(6)
<223> Trình tự này có thể bao gồm 2, 3, 4, 5, hoặc 6 gốc
<400> 88
His His His His His His
1 5

<210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

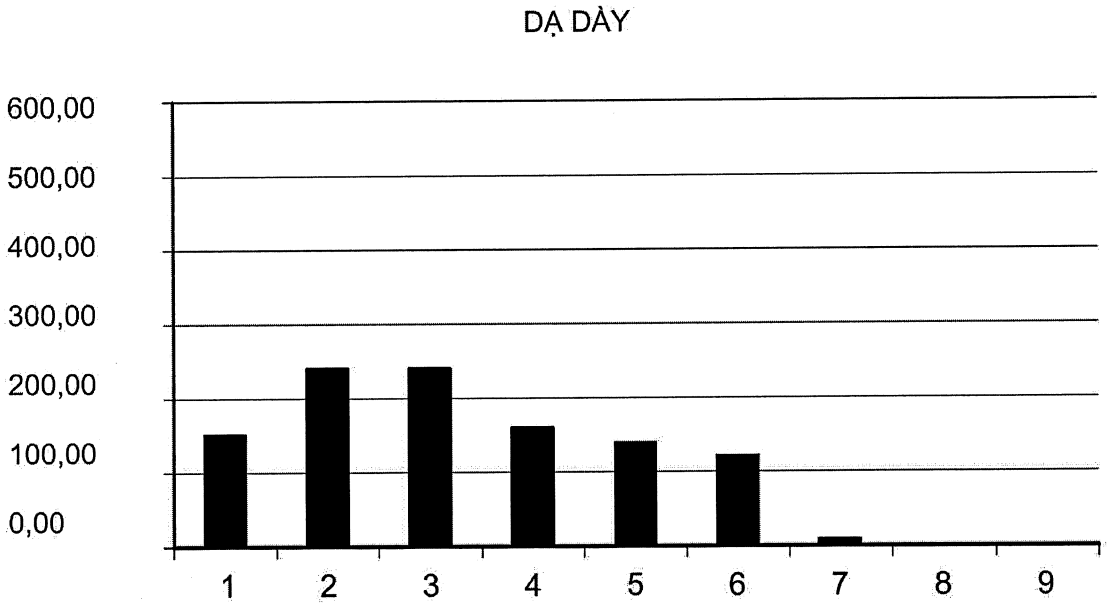
<400> 89
Gly Phe Leu Gly
1


HINH 1
BglII(985)
XhoI(1384)
KpnI(1619)
BamHI(1627)
SpeI(1633)
EcoRI(1658)
PstI(1667)
EcoRV(1670)
NotI(1685)
XhoI(1691)
XbaI(1703)
ApaI(1713)
Nru I(276)
HindIII(333)
Mfe I(490)
EF-1a Prom
Sp6 prom
BGH poly A
SV40 Prom
SmaI(2812)
Mfe I(242)
SalI(33)
BglII(13)
PstI(3052)
Amp ORF
Neo ORF
PvuI(5613)
SV40 Poly A
SalI(3976)

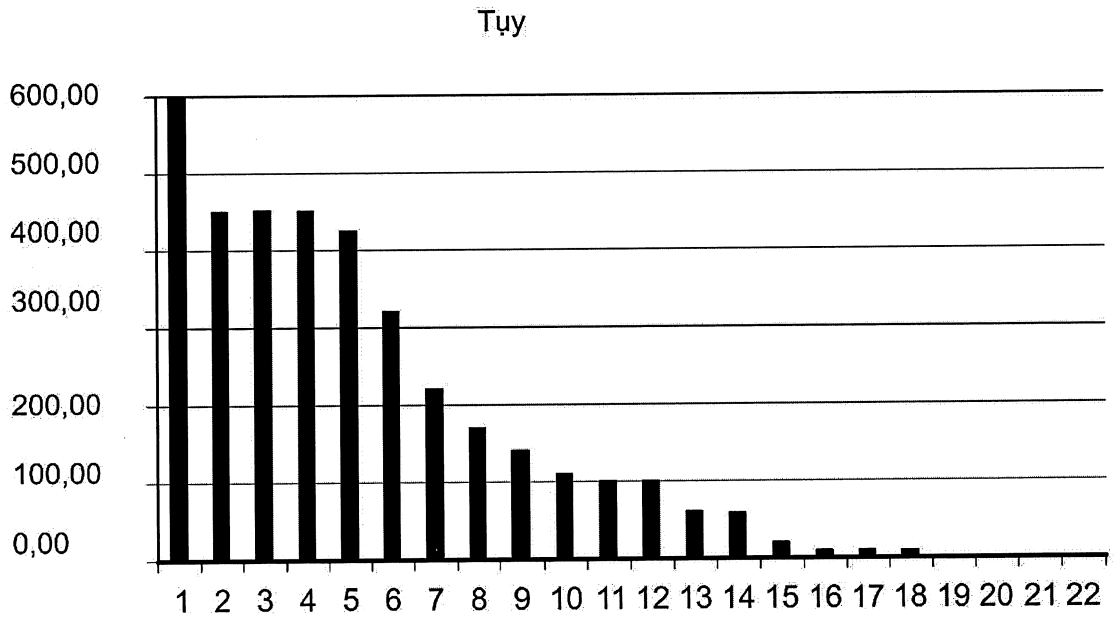
HÌNH 2A



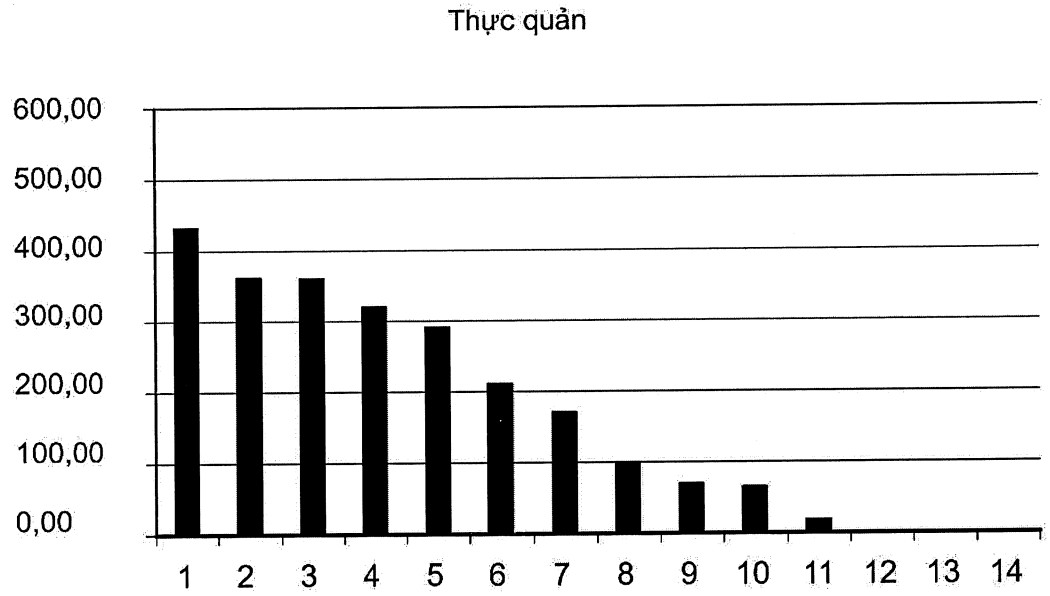
HÌNH 2B

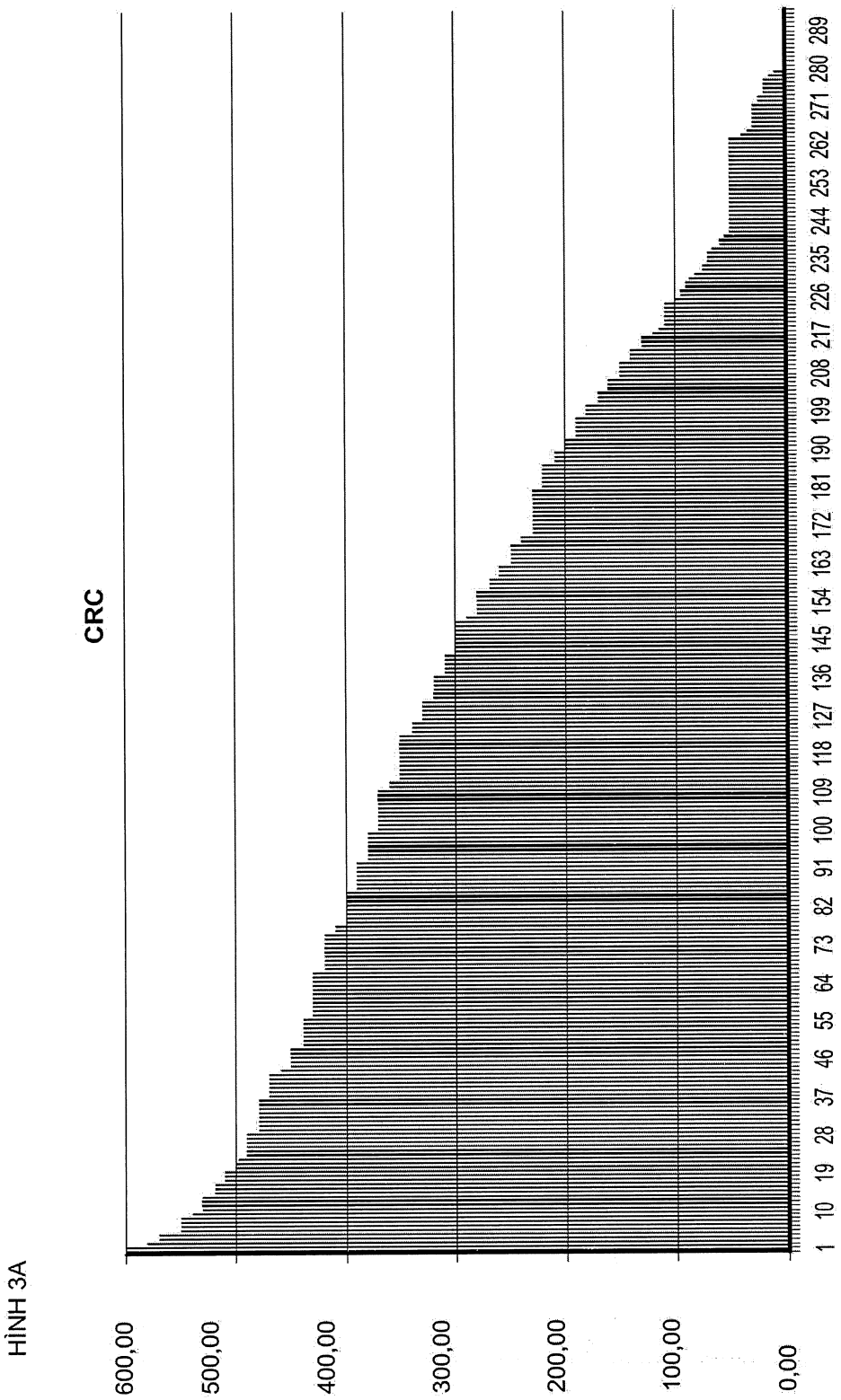


HÌNH 2C



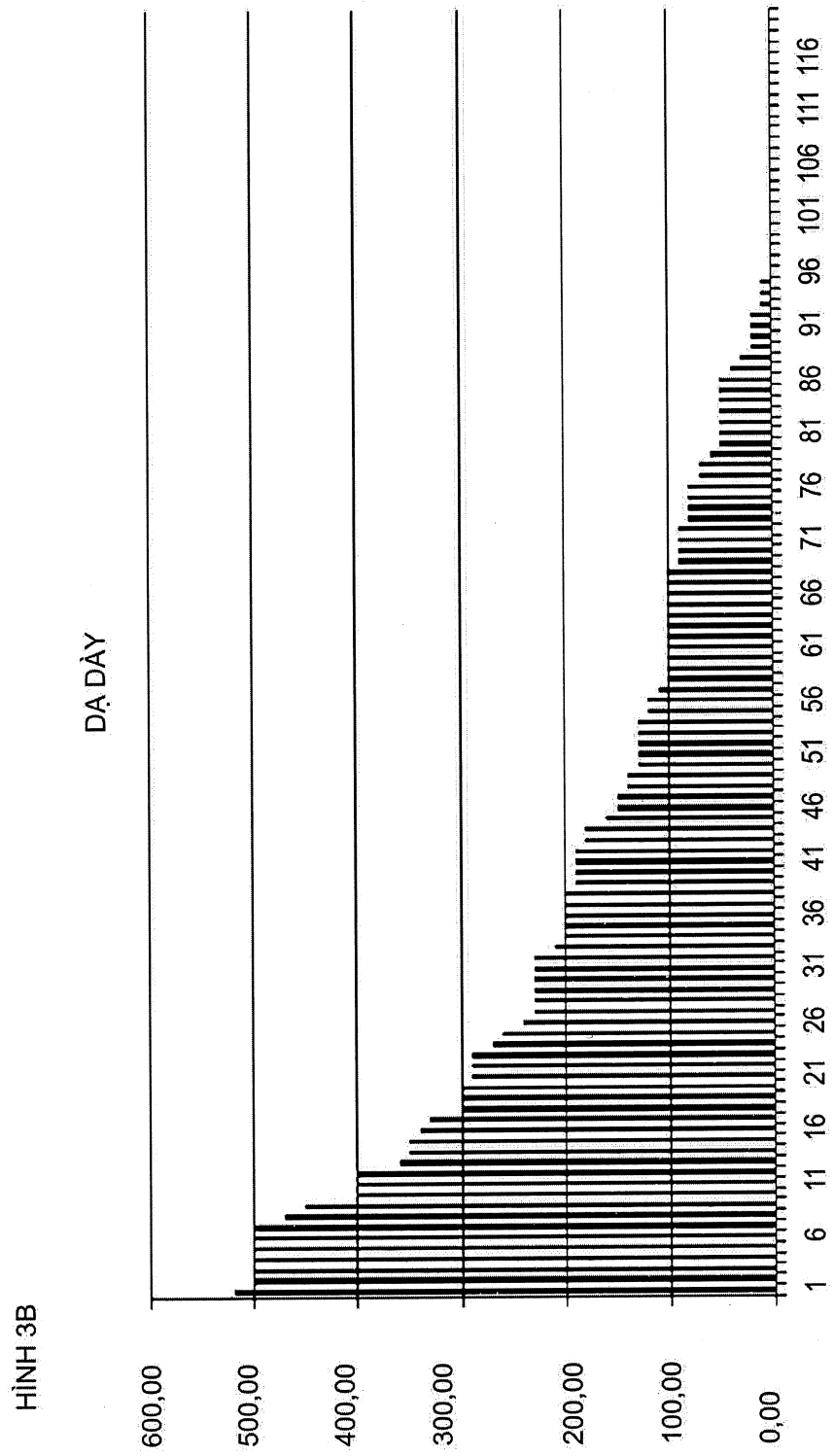
HÌNH 2D



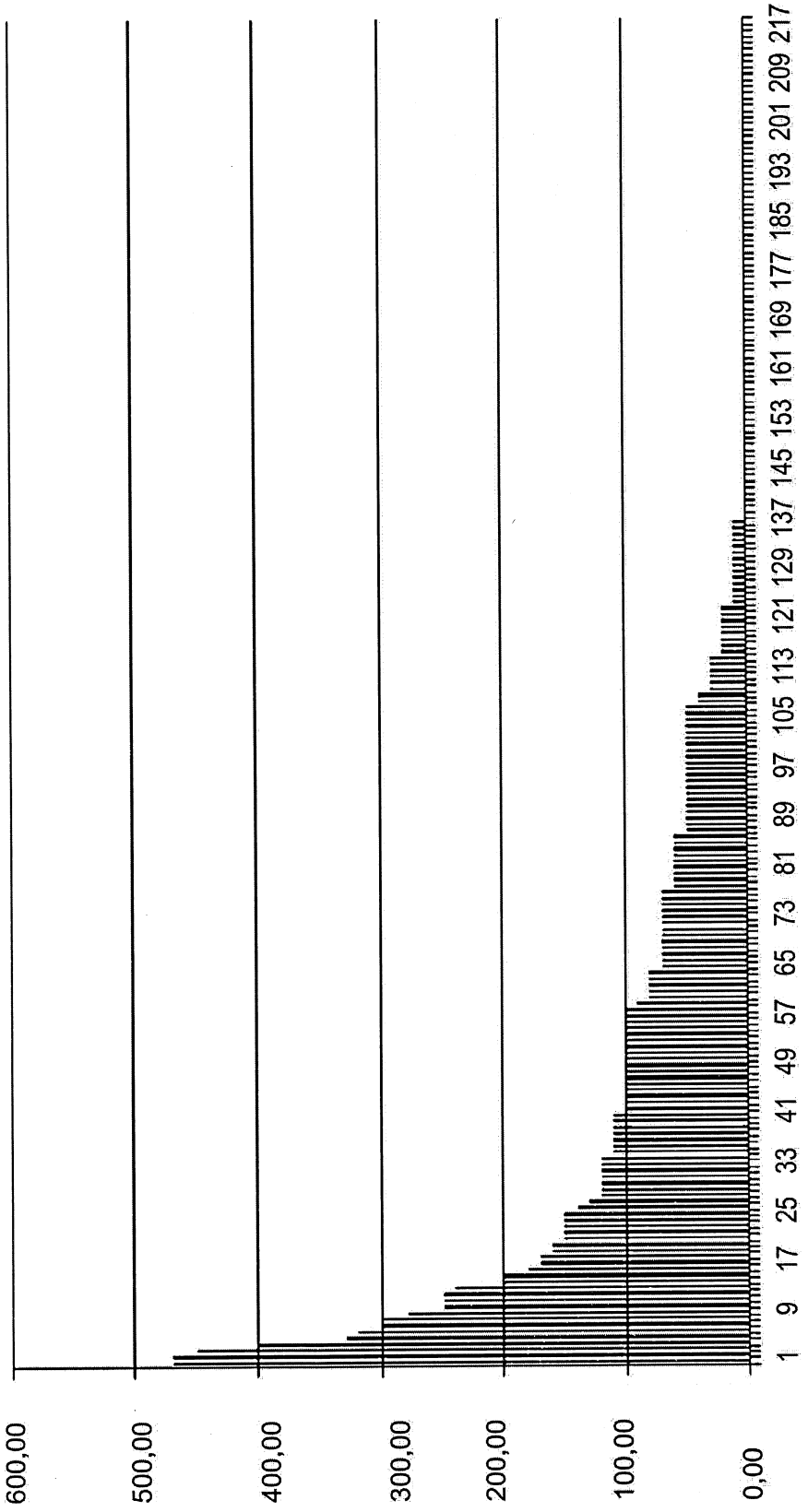

CRC
600,00
500,00
400,00
300,00
200,00
100,00
0,00
1 10 19 28 37 46 55 64 73 82 91 100 109 118 127 136 145 154 163 172 181 190 199 208 217 226 235 244 253 262 271 280 289

HÌNH 3A

HÌNH 3B


DẠ DÀY
600,00
500,00
400,00
300,00
200,00
100,00
0,00
1 6 11 16 21 26 31 36 41 46 51 56 61 66 71 76 81 86 91 96 101 106 111 116

HÌNH 3C


Tụy
600,00
500,00
400,00
300,00
200,00
100,00
0,00
1 9 17 25 33 41 49 57 65 73 81 89 97 105 113 121 129 137 145 153 161 169 177 185 193 201 209 217