



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0032313

(51)⁸ C07K 14/725; C12N 5/0783; C07K
14/74; A61K 39/00

(13) B

-
- (21) 1-2018-04581 (22) 16/03/2017
(86) PCT/EP2017/056289 16/03/2017 (87) WO 2017/158116 A1 21/09/2017
(30) 62/308,970 16/03/2016 US; 1604494.3 16/03/2016 GB
(45) 25/06/2022 411 (43) 25/02/2019 371A
(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)
Paul-Ehrlich-Straße 15, 72076 Tübingen, Germany
(72) MAURER, Dominik (DE); ALTEN, Leonie (DE); BUNK, Sebastian (DE).
(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)
-

(54) THỤ THỂ TẾ BÀO T, AXIT NUCLEIC, VECTƠ BIỂU HIỆN, TẾ BÀO CHỦ, VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG ĐỂ SỬ DỤNG TRONG LIỆU PHÁP MIỄN DỊCH
KHÁNG BỆNH UNG THƯ

(57) Sáng chế đề cập đến thụ thể tế bào T (TCR) gắn kết với các kháng nguyên liên quan đến khối u (TAA) để hướng đích các tế bào ung thư, các tế bào T biểu hiện thụ thể này, phương pháp tạo ra chúng, và mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng thụ thể này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các thụ thể TCR và biến thể của chúng gắn kết với các phân tử kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA) nhóm I hoặc nhóm II bằng peptit, như IGF2BP3-001 có trình tự axit amin KIQEILTQV (SEQ ID NO:1). Sáng chế còn đề cập đến peptit, protein, axit nucleic và tế bào để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch. Cụ thể, sáng chế đề cập liệu pháp miễn dịch đối với bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến epitop peptit của tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác để có thể dùng làm, ví dụ, thành phần dược chất có hoạt tính của chế phẩm vaccin để kích thích các đáp ứng miễn dịch kháng u, hoặc kích thích các tế bào T *ex vivo* và cấy vào bệnh nhân. Các peptit gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC), hoặc các peptit này cũng có thể là đích của kháng thể, thụ thể tế bào T hòa tan, và các phân tử gắn kết khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thụ thể tế bào T (T-cell receptor: TCR) gắn kết với các kháng nguyên liên quan đến khối u (tumor associated antigen: TAA) để hướng đích các tế bào ung thư, các tế bào T biểu hiện thụ thể này, phương pháp tạo ra chúng, và mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng thụ thể này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các thụ thể TCR và biến thể của chúng gắn kết với các phân tử kháng nguyên bạch cầu ở người (human leukocyte antigen: HLA) nhóm I hoặc nhóm II bằng peptit, như IGF2BP3-001 có trình tự axit amin KIQEILTQV (SEQ ID NO:1). Sáng chế còn đề cập đến peptit, protein, axit nucleic và tế bào để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch. Cụ thể, sáng chế đề cập liệu pháp miễn dịch đối với bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến epitop peptit của tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác để có thể dùng làm, ví dụ, thành phần dược chất có hoạt tính của chế phẩm vacxin để kích thích các đáp ứng miễn dịch kháng u, hoặc kích thích các tế bào T *ex vivo* và cấy vào bệnh nhân. Các peptit gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex: MHC), hoặc các peptit này cũng có thể là đích của kháng thể, thụ thể tế bào T hòa tan, và các phân tử gắn kết khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Liệu pháp miễn dịch trên cơ sở tế bào T hướng đích là các epitop peptit có nguồn gốc từ các protein liên quan đến khối u hoặc đặc hiệu khối u, được biểu hiện bởi các phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC). Các kháng nguyên liên quan đến khối u (TAA) này có thể là peptit có nguồn gốc từ tất cả các nhóm protein, như các enzym, thụ thể, yếu tố phiên mã, v.v. được biểu hiện và so sánh với các tế bào không bị thay đổi có cùng nguồn gốc, thường là được điều hòa tăng ở các tế bào của khối u tương ứng.

Các yếu tố đặc hiệu của đáp ứng miễn dịch tế bào có khả năng nhận biết đặc

hiệu và phá hủy các tế bào khối u. Sự phân lập tế bào T ra khỏi quần thể tế bào thâm nhiễm khối u hoặc ra khỏi máu ngoại vi gợi ý rằng các tế bào này đóng vai trò quan trọng trong hàng rào miễn dịch tự nhiên đối với bệnh ung thư. Cụ thể, các tế bào T dương tính với CD8, nhận biết các phân tử nhóm I của phức hợp tương thích mô chính (MHC)-mang các peptit thường có từ 8 đến 10 gốc axit amin có nguồn gốc từ protein hoặc sản phẩm khiếm khuyết ribosom (defect ribosomal product: DRIP) nằm ở phần bào tan, đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng này. Các phân tử MHC của người còn được gọi là kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA).

IGF2BP3 là thành viên của họ protein gắn kết ARN thông tin của yếu tố sinh trưởng tương tự insulin-II, liên quan đến sự khu trú ARN thông tin, sự tuần hoàn và kiểm soát dịch mã. Sự có mặt của nồng độ sản phẩm phiên mã của IGF2BP3 ở mức cao trong nhiều mô ung thư so với các mô đối chứng cho thấy rằng protein IGF2BP3 có thể đóng vai trò chức năng trong quá trình tăng sinh các tế bào đã biến nạp. Sự biểu hiện IGF2BP3 đã được thông báo trong nhiều loại bệnh ung thư, bao gồm caxinom tế bào thận (renal cell carcinoma: RCC) thể tế bào sáng; u melanin ác tính; caxinom tế bào vảy ở thực quản; caxinom tuyến tụy; và các khối u đường tiết niệu. Do đó, các epitop có nguồn gốc từ IGF2BP3 có thể hữu ích để hướng đích liệu pháp kháng ung thư đối với các bệnh ung thư biểu hiện IGF2BP3.

Có hai nhóm phân tử của MHC là MHC nhóm I và MHC nhóm II. Các phức hợp của peptit và MHC nhóm I được nhận biết bởi các tế bào T dương tính với CD8 mang thụ thể tế bào T (TCR) thích hợp, trong khi các phức hợp của peptit và phân tử MHC nhóm II được nhận biết bởi các tế bào T hỗ trợ dương tính với CD4 mang thụ thể TCR thích hợp. Do cả hai loại đáp ứng phụ thuộc CD8 và CD4 cùng góp phần và có tác dụng hiệp đồng với hiệu quả kháng u, việc nhận biết và xác định tính chất của các kháng nguyên liên quan đến khối u và các thụ thể tế bào T tương ứng là quan trọng trong việc phát triển các liệu pháp miễn dịch đối với bệnh ung thư như các vaccin và liệu pháp tế bào.

Trong phản ứng miễn dịch phụ thuộc MHC nhóm I, các peptit không chỉ cần phải có khả năng gắn kết với một số phân tử MHC nhóm I nhất định được biểu hiện bởi các tế bào khối u, mà sau đó chúng còn phải được nhận biết bởi các tế bào T mang các thụ thể tế bào T (TCR) đặc hiệu. Do đó, các kháng nguyên TAA là điểm

xuất phát của sự phát triển liệu pháp trên cơ sở tế bào T bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vacxin khối u và liệu pháp tế bào.

Trong khi đã có nhiều tiến bộ trong việc phát triển các dược chất hướng đích phân tử cho liệu pháp điều trị ung thư, vẫn cần phát triển trong lĩnh vực này các chất kháng bệnh ung thư mới để hướng đích đặc hiệu các phân tử có độ đặc hiệu cao với các tế bào ung thư. Sáng chế đáp ứng được nhu cầu này bằng cách đề xuất các thụ thể TCR mới, các axit nucleic, vectơ và tế bào chủ gắn kết đặc hiệu với epitop của IGF2BP3 như peptit có trình tự KIQEILTQV (IGF2BP3-001; SEQ ID NO:1) và các biến thể của nó; và phương pháp sử dụng các phân tử này trong việc điều trị bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các thụ thể tế bào T (TCR) bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta (“thụ thể TCR alpha/beta”). Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến các thụ thể TCR bao gồm chuỗi gama và chuỗi delta (“thụ thể TCR gama/delta”).

Sáng chế còn đề cập đến các thụ thể TCR, cấu trúc dưới phân tử của thụ thể TCR riêng biệt (một mình hoặc kết hợp), và các miền phụ của chúng, thụ thể TCR hòa tan (soluble TCR: sTCR), ví dụ, các thụ thể TCR dime alpha/beta hòa tan có ít nhất một liên kết disulfua giữa các chuỗi của các gốc của miền ổn định không có mặt trong các thụ thể TCR nguyên thủy, và các thụ thể TCR được tách dòng, các thụ thể TCR nêu trên được thiết kế thành các tế bào T hoặc tiền thân của tế bào T tự thân hoặc khác alen cùng loài, và phương pháp tạo ra chúng, cũng như các tế bào khác mang thụ thể TCR nêu trên.

Sáng chế còn đề cập đến thụ thể TCR gắn kết đặc hiệu với phức hợp peptit IGF2BP3-001-phân tử HLA, trong đó peptit IGF2BP3-001 này chứa, hoặc theo cách khác bao gồm, trình tự KIQEILTQV (SEQ ID NO:1). Theo một phương án, phân tử HLA là HLA-A*02.

Sáng chế còn đề cập đến thụ thể TCR gắn kết đặc hiệu với phức hợp peptit IGF2BP3-001-phân tử HLA, trong đó peptit IGF2BP3-001 này chứa, hoặc theo cách khác bao gồm, biến thể của IGF2BP3-001 có mức độ tương đồng ít nhất 66%, tốt hơn là ít nhất 77%, và tốt hơn nữa là ít nhất 88% (tốt hơn là có mức độ giống ít

nhất 77% hoặc ít nhất 88%) với trình tự SEQ ID NO:1, trong đó biến thể này gắn kết với phân tử HLA nhóm I hoặc nhóm II và/hoặc gây ra phản ứng chéo của các tế bào T với peptit nêu trên, hoặc muối được dụng của nó, trong đó peptit này không là polypeptit cơ sở có chiều dài đầy đủ.

Sáng chế còn đề cập đến peptit theo sáng chế chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1 hoặc biến thể của nó, có mức độ tương đồng ít nhất 66%, tốt hơn là ít nhất 77%, và tốt hơn nữa là ít nhất 88% (tốt hơn là có mức độ giống ít nhất 77% hoặc ít nhất 88%) với trình tự SEQ ID NO:1, trong đó peptit này hoặc biến thể của nó có từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là có từ 8 đến 30 axit amin, và tốt nhất là có từ 8 đến 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch.

Sáng chế còn đề cập đến thụ thể TCR chứa miền biến đổi alpha của thụ thể TCR có mức độ giống về trình tự ít nhất 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là 90%, với miền biến đổi alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1; và miền biến đổi beta của thụ thể TCR có mức độ giống về trình tự ít nhất 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là 90%, với miền biến đổi beta của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1.

Theo một phương án, thụ thể tế bào TCR) bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta, trong đó chuỗi alpha chứa miền biến đổi alpha của thụ thể TCR bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ CDR1, CDR2, và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:2 hoặc các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 có một, hai hoặc ba sự thay thế axit amin so với các trình tự vùng CDR tương ứng của trình tự SEQ ID NO:2, và chuỗi beta chứa miền biến đổi beta của thụ thể TCR bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ CDR1, CDR2, và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:10 hoặc các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 có một, hai hoặc ba sự thay thế axit amin so với các trình tự vùng CDR tương ứng của trình tự SEQ ID NO:10, và trong đó thụ thể TCR gắn kết đặc hiệu với phức hợp peptit IGF2BP3-001-phân tử MHC, trong đó peptit IGF2BP3-001 gồm trình tự SEQ ID NO:1, và trong đó thụ thể TCR gắn kết với các vị trí 1 và từ 3 đến 7 của peptit IGF2BP3-001 nêu trên.

Theo một phương án, miền biến đổi alpha của thụ thể TCR có ít nhất một đột biến so với miền alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1; và/hoặc miền biến đổi beta của thụ thể TCR có ít nhất một đột biến so với miền alpha của

thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1. Theo một phương án, thụ thể TCR chứa ít nhất một đột biến trong miền biến đổi alpha của thụ thể TCR và/hoặc miền biến đổi beta của thụ thể TCR có ái lực gắn kết với, và/hoặc chu kỳ bán hủy gắn kết với, phức hợp peptit IGF2BP3-001-phân tử HLA, ít nhất là gấp đôi so với của thụ thể TCR chứa miền alpha của thụ thể TCR không được đột biến và/hoặc miền biến đổi beta của thụ thể TCR không được đột biến.

Các chuỗi alpha của thụ thể TCR theo sáng chế có thể còn chứa miền ổn định alpha của thụ thể TCR có mức độ giống về trình tự ít nhất 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99% với miền ổn định alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1. Các chuỗi beta của thụ thể TCR theo sáng chế có thể còn chứa miền ổn định beta của thụ thể TCR có mức độ giống về trình tự ít nhất 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 99% với miền ổn định beta của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1.

Các chuỗi alpha của thụ thể TCR theo sáng chế có thể còn chứa miền xuyên màng alpha của thụ thể TCR và/hoặc miền nội bào alpha của thụ thể TCR. Các chuỗi beta của thụ thể TCR theo sáng chế có thể còn chứa miền xuyên màng beta của thụ thể TCR và/hoặc miền nội bào beta của thụ thể TCR.

Sáng chế còn đề cập các chuỗi alpha của thụ thể TCR chứa một hoặc nhiều vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR) của chuỗi alpha được bộc lộ trong Bảng 1, và các biến thể của nó có một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế so với các vùng CDR được thể hiện trong Bảng 1. Được mô tả thêm là các chuỗi alpha của thụ thể TCR chứa ít nhất một vùng CDR được chọn từ các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 được thể hiện trong Bảng 1. Được mô tả thêm là các chuỗi alpha của thụ thể TCR chứa vùng CDR3 của chuỗi alpha được thể hiện trong Bảng 1.

Sáng chế còn đề cập đến các chuỗi beta của thụ thể TCR chứa một hoặc nhiều vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi beta được bộc lộ trong Bảng 1, và các biến thể của nó có một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế so với các vùng CDR được thể hiện trong Bảng 1. Được mô tả thêm là các chuỗi beta của thụ thể TCR chứa ít nhất một vùng CDR được chọn từ các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi beta được thể hiện trong Bảng 1. Được mô tả thêm là các chuỗi beta của thụ

thể TCR chứa vùng CDR3 của chuỗi beta được thể hiện trong Bảng 1.

Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic tái tổ hợp hoặc được phân lập chứa trình tự nucleotit mã hóa thụ thể TCR của sáng chế. Theo một phương án, các axit nucleic của sáng chế mã hóa chuỗi alpha của thụ thể TCR và/hoặc chuỗi beta của thụ thể TCR như được thể hiện trong Bảng 1.

Sáng chế còn đề cập đến vector biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic mã hóa chuỗi alpha, chuỗi beta của thụ thể TCR, hoặc cả hai chuỗi này, như được mô tả ở đây.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ được phân lập chứa vector biểu hiện tái tổ hợp biểu hiện axit nucleic mã hóa chuỗi alpha, chuỗi beta của thụ thể TCR, hoặc cả hai chuỗi này, như được mô tả ở đây.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ được phân lập chứa vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế, tốt hơn là trong đó tế bào này là tế bào của người, tốt hơn nếu là tế bào lymphô máu ngoại vi (peripheral blood lymphocyte: PBL), tốt hơn nữa nếu là tế bào lymphô T CD4+ hoặc CD8+.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào PBL được phân lập chứa vector biểu hiện tái tổ hợp của sáng chế, trong đó tế bào PBL là tế bào T CD8+ hoặc tế bào T CD4+.

Sáng chế còn đề cập đến quần thể tế bào chứa ít nhất một tế bào chủ được mô tả ở đây.

Sáng chế còn đề cập các thụ thể TCR và tế bào chủ theo sáng chế để sử dụng trong điều trị các bệnh tăng sinh, như bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào xốp, u nguyên bào thần kinh), bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư vú, caxinom tế bào Merkel, u melanin, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật và ống mật chủ và bệnh ung thư thực quản.

Theo một khía cạnh, tế bào chủ là tế bào T CD8+ hoặc tế bào T CD4+ được chuyển nhiễm bằng axit nucleic mã hóa ít nhất một thụ thể TCR theo sáng chế, trong đó thụ thể TCR này chứa ít nhất một trình tự axit amin được bộc lộ trong Bảng 1. Theo khía cạnh khác, các tế bào chủ này được sử dụng trong liệu pháp

miễn dịch điều trị bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào xốp, u nguyên bào thần kinh), bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư vú, caxinom tế bào Merkel, u melanin, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật và ống mật chủ và bệnh ung thư thực quản.

Sáng chế còn mô tả phương pháp tiêu diệt hoặc làm giảm số lượng tế bào ung thư bao gồm bước cho các tế bào ung thư tiếp xúc với thụ thể TCR, axit nucleic, vector hoặc tế bào chủ như được mô tả ở đây. Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng thụ thể TCR, axit nucleic, vector hoặc tế bào chủ như được mô tả ở đây.

Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa thụ thể TCR theo sáng chế, và vector biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến thụ thể TCR theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế hoặc vector biểu hiện theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh và dùng làm thuốc, cụ thể là trong việc điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế hoặc vector biểu hiện như được mô tả trên đây.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ theo sáng chế là tế bào trình diện kháng nguyên, và tốt hơn nếu là tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra peptit theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế, và phân lập peptit ra khỏi tế bào chủ này hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

Sáng chế còn đề cập phương pháp theo sáng chế, trong đó kháng nguyên được tải lên các phân tử của MHC nhóm I hoặc II được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp hoặc tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo bằng cách cho kháng nguyên với lượng đủ tiếp xúc với tế bào trình diện kháng nguyên hoặc kháng nguyên này được tải lên tetrame của phức hợp MHC nhóm I hoặc nhóm II bằng cách tetrame hóa các monome của phức hợp MHC nhóm I hoặc nhóm II/kháng nguyên.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp theo sáng chế, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên chứa vector biểu hiện có khả năng biểu hiện hoặc biểu hiện peptit nêu trên chứa SEQ ID NO:1 hoặc biến thể của nó.

Sáng chế còn đề cập đến các tế bào lymphô T hoạt hóa, được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế, trong đó tế bào T nhận biết chọn lọc tế bào biểu hiện polypeptit chứa trình tự axit amin theo sáng chế.

Sáng chế còn mô tả phương pháp tiêu diệt tế bào ung thư và/hoặc ức chế tế bào ung thư ở bệnh nhân có các tế bào ung thư biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin bất kỳ theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng các tế bào T như được tạo ra theo sáng chế với lượng hữu hiệu.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng peptit bất kỳ được mô tả ở đây, các axit nucleic được mô tả ở đây, các vector biểu hiện được mô tả ở đây, các tế bào được mô tả ở đây, tế bào lymphô T hoạt hóa được mô tả ở đây, thụ thể tế bào T, kháng thể, hoặc các phân tử gắn kết với peptit-MHC và/hoặc peptit khác theo sáng chế làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc. Theo một khía cạnh, thuốc này có hoạt tính chống ung thư.

Tốt hơn nếu thuốc này dùng cho liệu pháp tế bào, thụ thể TCR, thụ thể TCR hòa tan hoặc kháng thể.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng theo sáng chế, trong đó các tế bào ung thư là tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư tế bào thận, ung thư não (ví dụ, u nguyên bào xốp, u nguyên bào thần kinh), ung thư dạ dày, ung thư kết-trực tràng, ung thư tế bào gan, ung thư tụy, ung thư tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu, ung thư vú, caxinom tế bào Merkel, u melanin, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư tử cung, ung thư túi mật và ống mật chủ và ung thư thực quản, và tốt hơn nếu là bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ.

Sáng chế còn đề cập đến các dấu ấn sinh học trên cơ sở peptit theo bản mô tả này, được gọi ở đây là “đích” có thể được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư, tốt hơn nếu là bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ. Dấu ấn này có thể là sự biểu hiện quá mức của chính (các) peptit, hoặc sự biểu hiện quá mức của (các) gen tương ứng. Các dấu ấn này cũng có thể được sử dụng để dự đoán xác suất thành công của việc điều trị, tốt hơn nếu là liệu pháp miễn dịch, và được ưu tiên nhất là

liệu pháp miễn dịch hướng cùng đích được xác định bằng dấu ấn sinh học này. Ví dụ, kháng thể hoặc thụ thể TCR hòa tan có thể được sử dụng để nhuộm các mẫu khối u để phát hiện sự có mặt của peptit quan tâm trong phức hợp với MHC. Tuy ý, kháng thể hoặc thụ thể tế bào T hòa tan có chức năng hiệu ứng khác như vùng kích thích miễn dịch hoặc độc tố.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng các đích mới này để xác định các thụ thể TCR nhận biết ít nhất một trong số các đích nêu trên, và tốt hơn là xác định các thụ thể TCR hoạt hóa tế bào T.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng các đích mới này trong ngữ cảnh điều trị bệnh ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện mức độ biểu hiện của peptit IGF2BP3-001 trong các mô khỏe mạnh và bệnh ung thư.

Các hình vẽ từ Fig.2 đến Fig.4 thể hiện mức độ biểu hiện IGF2BP3-001 trong mô ung thư và mô khỏe mạnh.

Fig.5 thể hiện mức độ nhuộm tetrame MHC/IGF2BP3-001 hoặc tetrame MHC/NYESO1-001 của các tế bào T CD8⁺ được gây xung điện bằng ARN của chuỗi alpha và chuỗi beta của thụ thể TCR R10P1A7 (Bảng 1). Các tế bào T CD8⁺ được biến nạp với ARN của thụ thể TCR 1G4 gắn kết đặc hiệu với thể biến nạp phức hợp MHC/NYESO1-001 và thể biến nạp giả được dùng làm đối chứng.

Fig.6 thể hiện mức độ giải phóng IFN γ từ các tế bào T CD8⁺ được gây xung điện bằng ARN của chuỗi alpha và beta của thụ thể TCR R10P1A7 (Bảng 1) sau khi ủ đồng thời với các tế bào đích được tải peptit IGF2BP3-001 (SEQ ID NO:1) hoặc peptit tương đồng nhưng không liên quan CLUA-001 (SEQ ID NO:26), CHCHD6-001 (SEQ ID NO:27), CDC42BPG-001 (SEQ ID NO:28), PARP14-002 (SEQ ID NO:29), SYNE2-001 (SEQ ID NO:30), IFT7-001 (SEQ ID NO:31), DHRS12-001 (SEQ ID NO:32), STX12-001 (SEQ ID NO:33), EEA-001 (SEQ ID NO:34), SENP7-001 (SEQ ID NO:35), hoặc peptit đối chứng NYESO1-001 (SEQ ID NO:36). Thu được số liệu về mức độ giải phóng IFN γ với các tế bào T CD8⁺ có nguồn gốc từ người cho khác nhau. Các tế bào T CD8⁺ được gây xung điện bằng

ARN một mình hoặc được ủ đồng thời với các tế bào đích không được tải dùng làm đối chứng.

Fig.7 thể hiện mức độ giải phóng IFN γ từ các tế bào T CD8+ được gây xung điện bằng ARN của chuỗi alpha và beta của thụ thể TCR R10P1A7 sau khi ủ đồng thời với các tế bào đích được tải IGF2BP3-001 (SEQ ID NO:1) hoặc các biến thể có sự thay thế alanin IGF2BP3-001 khác nhau ở các vị trí từ 1 đến 9 của trình tự SEQ ID NO:1. Các tế bào T CD8+ được gây xung điện bằng ARN một mình hoặc ủ đồng thời với các tế bào đích được tải peptit đối chứng NYESO1-001 hoặc các tế bào đích không được tải được dùng làm đối chứng. Thu được số liệu về mức độ giải phóng IFN γ với các tế bào T CD8+ có nguồn gốc từ người cho khác nhau.

Fig.8 thể hiện mức độ giải phóng IFN γ từ các tế bào T CD8+ được gây xung điện bằng ARN của chuỗi alpha và beta của thụ thể TCR R10P1A7 (Bảng 1) sau khi ủ đồng thời với dòng tế bào u melanin A-375, dòng tế bào u nguyên bào xẹp T98G và dòng tế bào ung thư vú SK-BR-3 tương ứng. Các tế bào T CD8+ chỉ được gây xung điện bằng ARN được dùng làm đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các thụ thể tế bào T (TCR) bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta (“thụ thể TCR alpha/beta”). Sáng chế cũng đề cập đến các peptit IGF2BP3-001 có khả năng gắn kết với thụ thể TCR và kháng thể khi được biểu hiện bởi phân tử MHC. Sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic, vectơ và tế bào chủ để biểu hiện các thụ thể TCR và peptit theo sáng chế; và phương pháp sử dụng chúng.

Các định nghĩa

Khi được sử dụng trong bản mô tả này và ngoại trừ khi được lưu ý theo nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ được định nghĩa như nêu dưới đây.

Thuật ngữ “thụ thể tế bào T” (viết tắt là TCR) để chỉ phân tử dị dime chứa chuỗi polypeptit alpha (chuỗi alpha) và chuỗi polypeptit beta (chuỗi beta), trong đó thụ thể dị dime này có khả năng gắn kết với kháng nguyên của peptit được trình diện bởi phân tử HLA.

Thuật ngữ “đáp ứng của tế bào T” có nghĩa là sự tăng sinh và hoạt hóa đặc

hiệu của chức năng hiệu ứng được tạo bởi peptit *in vitro* hoặc *in vivo*. Đối với các tế bào T gây độc tế bào được giới hạn bởi MHC nhóm I, chức năng hiệu ứng có thể là sự phân giải tế bào đích được tạo xung peptit, tế bào đích được tạo xung tiền chất peptit hoặc tế bào đích trình diện peptit trong tự nhiên, sự tiết ra xytokin, tốt hơn nếu là interferon-gama, TNF-alpha, hoặc IL-2 được cảm ứng bởi peptit, sự tiết ra các phân tử tác động, tốt hơn nếu là granzym hoặc perforin được cảm ứng bởi peptit, hoặc sự mất hạt.

Thuật ngữ “peptit” được sử dụng ở đây để chỉ dãy các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của các axit amin liền kề. Tốt hơn nếu peptit này có 9 axit amin trong chiều dài mạch, nhưng có thể chỉ là peptit mạch ngắn có 8 axit amin trong chiều dài mạch, và có thể có mạch dài đến 10, 11 hoặc 12 axit amin trong chiều dài mạch hoặc nhiều hơn, và trong trường hợp các peptit của MHC nhóm II (các biến thể kéo dài của peptit theo sáng chế), chúng có thể có mạch dài tới 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit amin trong chiều dài mạch hoặc nhiều hơn.

Ngoài ra, thuật ngữ “peptit” sẽ bao gồm các muối của dãy các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của các axit amin liền kề. Tốt hơn nếu các muối này là muối được dùng của peptit, ví dụ như muối clorua hoặc axetat (trifloaxetat). Cần lưu ý rằng các muối của các peptit theo bản mô tả này khác biệt đáng kể với peptit nêu trên về (các) trạng thái của chúng *in vivo*, do các peptit này không là muối *in vivo*.

Thuật ngữ “peptit” còn bao gồm “oligopeptit”. Thuật ngữ “oligopeptit” được sử dụng ở đây để chỉ dãy các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của các axit amin liền kề. Không có giới hạn về chiều dài của oligopeptit theo sáng chế, miễn là một hoặc nhiều epitop đúng được giữ nguyên ở đây. Các oligopeptit thường chứa ít hơn 30 gốc axit amin trong chiều dài mạch, và chứa nhiều hơn khoảng 15 axit amin trong chiều dài mạch.

Thuật ngữ “polypeptit” để chỉ dãy các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của các axit amin liền kề. Không có giới hạn về chiều dài của polypeptit theo sáng

chế miễn là các epitop đúng được giữ nguyên. Trái với các thuật ngữ peptit hoặc oligopeptit, thuật ngữ polypeptit để chỉ các phân tử chứa nhiều hơn khoảng 30 gốc axit amin.

Peptit, oligopeptit, protein hoặc polynucleotit mã hóa phân tử này có tính “sinh miễn dịch” (và do đó là “chất sinh miễn dịch” trong phạm vi của sáng chế), nếu là chất có khả năng gây đáp ứng miễn dịch. Trong trường hợp của sáng chế, tính sinh miễn dịch được xác định cụ thể hơn là có khả năng gây ra đáp ứng của tế bào T. Do đó, thuật ngữ “chất sinh miễn dịch” sẽ là phân tử có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch, và trong trường hợp của sáng chế, là phân tử có khả năng gây ra đáp ứng của tế bào T. Theo khía cạnh khác, chất sinh miễn dịch có thể là peptit, phức hợp của peptit với MHC, oligopeptit, và/hoặc protein được sử dụng để tạo ra kháng thể đặc hiệu hoặc các thụ thể TCR kháng lại nó.

Thuật ngữ “epitop” của tế bào T nhóm I cần peptit mạch ngắn được gắn kết với thụ thể MHC nhóm I, tạo ra phức hợp bậc ba (chuỗi alpha của MHC nhóm I, beta-2-microglobulin, và peptit) mà có thể được nhận biết bởi tế bào T mang thụ thể tế bào T tương ứng gắn kết với phức hợp MHC/peptit có ái lực thích hợp. Các peptit gắn kết với phân tử của MHC nhóm I thường có từ 8 đến 14 axit amin trong chiều dài mạch, và thông thường nhất là có 9 axit amin trong chiều dài mạch.

Trình tự nucleotit mã hóa peptit, oligopeptit, hoặc polypeptit cụ thể có thể có trong tự nhiên hoặc chúng có thể được tạo cấu trúc bằng phương pháp tổng hợp. Nói chung, các đoạn ADN mã hóa peptit, polypeptit, và protein theo sáng chế này được ghép từ các đoạn ADN bổ trợ và nhóm liên kết oligonucleotit ngắn, hoặc từ chuỗi các oligonucleotit, để tạo ra gen tổng hợp có khả năng được biểu hiện ở đơn vị phiên mã tái tổ hợp chứa các yếu tố điều hòa có nguồn gốc từ operon của vi sinh vật hoặc virus.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “nucleotit mã hóa (hoặc giải mã hóa) peptit” để chỉ trình tự nucleotit mã hóa peptit bao gồm các codon khởi đầu và kết thúc không tự nhiên (nhân tạo) tương hợp được với hệ sinh học, trình tự cần được biểu hiện bởi, ví dụ, tế bào đuôi gai hoặc hệ tế bào khác hữu ích cho việc tạo ra thụ thể TCR.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “nucleotit mã hóa (hoặc

giải mã hóa) thụ thể TCR” để chỉ một hoặc nhiều trình tự nucleotit mã hóa thụ thể TCR bao gồm các codon khởi đầu và kết thúc không tự nhiên (nhân tạo) tương hợp được với hệ sinh học, trình tự cần được biểu hiện bởi, ví dụ, tế bào T hoặc hệ tế bào khác hữu ích cho việc tạo ra thụ thể TCR.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, sự viện dẫn đến trình tự axit nucleic bao gồm cả axit nucleic sợi đơn và sợi kép. Do đó, trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ theo cách khác, trình tự cụ thể, ví dụ, đối với ADN, để chỉ ADN sợi đơn của trình tự này, bộ đôi của trình tự này cùng với trình tự bổ trợ của nó (ADN sợi kép) và trình tự bổ trợ của trình tự này.

Thuật ngữ “vùng mã hóa” để chỉ phần gen mã hóa tự nhiên hoặc bình thường đối với sản phẩm biểu hiện của gen này trong môi trường hệ gen tự nhiên của nó, nghĩa là vùng mã hóa *in vivo* của sản phẩm biểu hiện nguyên thể của gen này.

Vùng mã hóa có thể có nguồn gốc từ gen không đột biến (“gen bình thường”), gen được đột biến hoặc gen được biến đổi, hoặc thậm chí có thể có nguồn gốc từ trình tự ADN, hoặc gen, được tổng hợp hoàn toàn trong phòng thí nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tổng hợp ADN đã biết.

Thuật ngữ “sản phẩm biểu hiện” để chỉ polypeptit hoặc protein là sản phẩm dịch mã tự nhiên của gen và trình tự axit nucleic bất kỳ mã hóa các dạng tương đương do hiện tượng thoái hóa mã di truyền gây ra và do đó mã hóa chính (các) axit amin.

Thuật ngữ “đoạn”, khi để chỉ trình tự mã hóa, có nghĩa là phần ADN chứa vùng mã hóa hoàn toàn ít hơn, trong đó sản phẩm biểu hiện gần như giữ lại được chức năng hoặc hoạt tính sinh học giống như sản phẩm biểu hiện của vùng mã hóa hoàn toàn.

Thuật ngữ “đoạn ADN” để chỉ polyme ADN, ở dạng đoạn riêng biệt hoặc làm thành phần của cấu trúc ADN lớn hơn, có nguồn gốc từ ADN phân lập được ít nhất một lần ở dạng gần như tinh khiết, nghĩa là không chứa các chất nội sinh và với lượng hoặc nồng độ cho phép xác định, thao tác, và thu hồi đoạn mạch và các trình tự nucleotit thành phần của nó bằng phương pháp hóa sinh chuẩn, ví dụ, bằng

cách sử dụng vectơ tách dòng. Các đoạn mạch này được tạo ra ở dạng khung đọc mở không bị đứt quãng bởi các trình tự không dịch mã bên trong, hoặc intron thường có mặt trong các gen có nhân điển hình. Trình tự của ADN không dịch mã có thể có mặt ở phía sau khung đọc mở này, trong đó nó không can thiệp vào việc thao tác hoặc sự biểu hiện của các vùng mã hóa.

Thuật ngữ “đoạn môi” để chỉ trình tự axit nucleic ngắn có thể được ghép cặp với một sợi ADN và tạo ra đầu 3’-OH tự do mà ở đó ADN polymeraza bắt đầu quá trình tổng hợp chuỗi deoxyribonucleotit.

Thuật ngữ “gen khởi đầu” để chỉ vùng ADN tham gia vào sự gắn kết của ARN polymeraza để khởi đầu sự phiên mã.

Thuật ngữ “được phân lập” để chỉ chất được tách ra khỏi môi trường ban đầu của nó (ví dụ, môi trường tự nhiên, nếu nó có trong tự nhiên). Ví dụ, không phân lập được polynucleotit hoặc polypeptit có trong tự nhiên có mặt ở động vật sống nhưng phân lập được chính polynucleotit hoặc polypeptit này, được tách ra từ một phần hoặc toàn bộ các chất cùng tồn tại trong hệ tự nhiên. Theo một khía cạnh, các polynucleotit này có thể là một phần của vectơ và/hoặc các polynucleotit hoặc polypeptit này có thể là một phần của hỗn hợp, và vẫn được phân lập sao cho vectơ hoặc hỗn hợp này không là một phần của môi trường tự nhiên của nó.

Các polynucleotit, và polypeptit tái tổ hợp hoặc polypeptit sinh miễn dịch, được bộc lộ theo sáng chế cũng có thể ở dạng “được tinh chế”. Thuật ngữ “được tinh chế” không cần phải là tinh khiết tuyệt đối; thay vào đó, thuật ngữ này được dự định là định nghĩa tương đối, và có thể bao gồm cả các chế phẩm được tinh chế ở mức cao hoặc chế phẩm chỉ được tinh chế một phần, như các thuật ngữ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các dòng vô tính riêng biệt được phân lập từ thư viện ADN hỗ trợ đã được tinh chế theo quy ước đến độ đồng nhất điện di. Việc tinh chế nguyên liệu ban đầu hoặc nguyên liệu tự nhiên đến ít nhất một khoảng giá trị, tốt hơn nếu là hai hoặc ba khoảng, và tốt hơn nữa nếu là bốn hoặc năm khoảng giá trị được dự định rõ ràng. Ngoài ra, tốt hơn nếu polypeptit theo sáng chế có độ tinh khiết 99,999%, hoặc ít nhất 99,99% hoặc 99,9%; và thậm chí tốt hơn là bằng 99% trọng lượng hoặc cao hơn được dự định rõ ràng.

Các axit nucleic và sản phẩm biểu hiện polypeptit được bộc lộ theo sáng chế,

cũng như các vectơ biểu hiện chứa các axit nucleic và/hoặc polypeptit này, có thể ở “dạng được làm giàu”. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được làm giàu” có nghĩa là nồng độ của chất này ít nhất gấp khoảng 2, 5, 10, 100, hoặc 1000 lần nồng độ tự nhiên của nó (ví dụ), có lợi nếu lượng chất này bằng 0,01% trọng lượng, tốt hơn nếu ít nhất bằng khoảng 0,1% trọng lượng. Chế phẩm được làm giàu với lượng khoảng 0,5%, 1%, 5%, 10%, và 20% trọng lượng cũng được dự định. Có lợi nếu các trình tự, cấu trúc, vectơ, dòng vô tính, và các vật liệu khác theo sáng chế có thể ở dạng được làm giàu hoặc được phân lập. Thuật ngữ “đoạn mạch có hoạt tính” để chỉ đoạn mạch, thường là của trình tự peptit, polypeptit hoặc axit nucleic, để tạo ra đáp ứng miễn dịch (nghĩa là có hoạt tính sinh miễn dịch) khi được sử dụng, một mình hoặc tùy ý với tá được thích hợp hoặc trong vectơ, cho động vật, như động vật có vú, ví dụ, thỏ hoặc chuột nhắt, và còn bao gồm cả người, đáp ứng miễn dịch này ở dạng kích thích đáp ứng của tế bào T trong động vật được điều trị, như người. Theo cách khác, “đoạn mạch có hoạt tính” cũng có thể được sử dụng để gây ra đáp ứng của tế bào T *in vitro*.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “phần”, “đoạn mạch” và “đoạn” khi được sử dụng liên quan đến polypeptit, để chỉ trình tự liên tục của các gốc, như gốc axit amin, trình tự này tạo thành phân nhóm của trình tự lớn hơn. Ví dụ, nếu polypeptit được dùng để điều trị với enzym bất kỳ trong số các enzym endopeptidaza thông thường, như trypsin hoặc chymotrypsin, các oligopeptit tạo thành từ việc điều trị này sẽ là các phần, đoạn mạch hoặc đoạn của polypeptit ban đầu. Khi được sử dụng liên quan đến polynucleotit, các thuật ngữ này để chỉ các sản phẩm được tạo ra khi điều trị bằng các polynucleotit này cùng với endonucleaza bất kỳ.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tỷ lệ % độ đồng nhất” hoặc “tỷ lệ % mức độ giống”, khi liên quan đến trình tự, có nghĩa là trình tự được so sánh với trình tự yêu cầu bảo hộ hoặc trình tự được mô tả sau khi dóng thẳng hàng trình tự cần được so sánh (“trình tự được so sánh”) với trình tự được mô tả hoặc trình tự yêu cầu bảo hộ (“trình tự tham chiếu”). Sau đó, tỷ lệ % độ đồng nhất được xác định theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ \% độ đồng nhất} = 100 [1 - (C/R)]$$

trong đó C là số lượng sự khác biệt giữa trình tự tham chiếu và trình tự so sánh theo chiều dài đóng thẳng hàng giữa trình tự tham chiếu và trình tự so sánh, trong đó

(i) mỗi bazơ hoặc axit amin trong trình tự tham chiếu không có bazơ hoặc axit amin được đóng thẳng hàng tương ứng trong trình tự so sánh, và

(ii) mỗi khoảng trống trong trình tự tham chiếu, và

(iii) mỗi bazơ hoặc axit amin được đóng thẳng hàng trong trình tự tham chiếu là khác với bazơ hoặc axit amin được đóng thẳng hàng trong trình tự so sánh, tạo thành sự khác biệt, và

(iv) việc đóng thẳng hàng cần bắt đầu ở vị trí 1 của các trình tự được đóng thẳng hàng;

và R là số lượng bazơ hoặc axit amin trong trình tự tham chiếu trong chiều dài khi đóng thẳng hàng với trình tự so sánh có khoảng trống bất kỳ được tạo ra trong trình tự tham chiếu cũng được tính như bazơ hoặc axit amin.

Nếu có sự đóng thẳng hàng giữa trình tự so sánh và trình tự tham chiếu mà tỷ lệ % độ đồng nhất như tính được trên đây là bằng hoặc cao hơn tỷ lệ % độ đồng nhất tối thiểu theo lý thuyết thì trình tự so sánh có tỷ lệ % độ đồng nhất tối thiểu theo lý thuyết với trình tự tham chiếu, mặc dù có thể có sự đóng thẳng hàng trong đó tỷ lệ % độ đồng nhất tính được như trên đây là nhỏ hơn tỷ lệ % độ đồng nhất theo lý thuyết.

Theo sáng chế, thuật ngữ “độ tương đồng” để chỉ mức độ đồng nhất (xem tỷ lệ % độ đồng nhất trên đây) giữa các trình tự của hai trình tự axit amin, nghĩa là trình tự peptit hoặc trình tự polypeptit. Thuật ngữ “độ tương đồng” nêu trên được xác định bằng cách so sánh hai trình tự được đóng thẳng hàng trong điều kiện tối ưu so với các trình tự cần được so sánh. Độ tương đồng về trình tự này có thể được tính toán bằng cách tạo ra sự đóng thẳng hàng, ví dụ, bằng cách sử dụng thuật toán ClustalW. Chương trình phần mềm phân tích trình tự có bán trên thị trường, cụ thể hơn là, Vector NTI, GENETYX hoặc các công cụ phân tích khác được cung cấp theo cơ sở dữ liệu đã công bố.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể đánh giá xem các

tế bào T được tạo bởi biến thể của peptit đặc hiệu sẽ có thể phản ứng chéo với chính peptit này hay không.

Thuật ngữ “biến thể” của trình tự axit amin nhất định theo sáng chế có nghĩa là các mạch bên của, ví dụ, một hoặc hai gốc axit amin được thay đổi (ví dụ, bằng cách thay thế chúng bằng mạch bên của gốc axit amin có trong tự nhiên khác hoặc một số mạch bên khác) sao cho peptit này sẽ có khả năng gắn kết với phân tử HLA theo cách gần giống như peptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO:1. Ví dụ, peptit có thể được cải biến sao cho nó ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng tương tác và gắn kết với rãnh gắn kết của phân tử MHC thích hợp, như HLA-A*02 hoặc -DR, và theo cách sao cho nó ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng gắn kết với thụ thể TCR của các tế bào T hoạt hóa. Tương tự, thụ thể TCR có thể được cải biến sao cho nó ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng tương tác và gắn kết với phức hợp phân tử MHC/KIQEILTQV (SEQ ID NO:1) thích hợp, như HLA-A*02 hoặc -DR, và theo cách sao cho nó ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng hoạt hóa các tế bào T.

Sau đó, các tế bào T này có thể phản ứng chéo với tế bào và tiêu diệt tế bào biểu hiện polypeptit chứa trình tự axit amin tự nhiên của peptit cùng nguồn gốc, như KIQEILTQV (SEQ ID NO:1), như được xác định theo các khía cạnh của sáng chế. Như có thể thu được từ tài liệu khoa học và các cơ sở dữ liệu (Rammensee *et al.*, 1999), một số vị trí nhất định của các peptit gắn kết HLA thường là gốc dạng neo tạo ra trình tự của nhân khớp với motif gắn kết của thụ thể HLA, được xác định bằng đặc tính phân cực, tính chất điện vật lý, tính kỵ nước và cấu hình không gian của các chuỗi polypeptit tạo thành rãnh gắn kết. Theo một khía cạnh, dựa vào phần đã bộc lộ của sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có khả năng cải biến trình tự axit amin của thụ thể TCR, bằng cách giữ nguyên các gốc dạng neo đã biết, và sẽ có thể xác định xem các biến thể TCR này có duy trì khả năng gắn kết với các phức hợp phân tử MHC nhóm I hoặc II/KIQEILTQV (SEQ ID NO:1) hay không. Các biến thể của thụ thể TCR theo sáng chế vẫn duy trì khả năng gắn kết với phức hợp phân tử MHC nhóm I hoặc II/KIQEILTQV (SEQ ID NO:1). Sau đó, các biến thể của thụ thể TCR biểu hiện tế bào T theo sáng chế có thể tiêu diệt các tế bào biểu hiện polypeptit chứa trình tự axit amin tự nhiên của

peptit cùng nguồn gốc, như KIQEILTQV (SEQ ID NO:1).

Theo một khía cạnh, các peptit hoặc thụ thể TCR được bộc lộ ở đây có thể được cải biến bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc ở các vị trí khác nhau, có thể chọn lọc, trong chuỗi peptit, nếu không được chỉ rõ theo cách khác. Tốt hơn nếu sự thay thế các gốc này nằm ở đầu của chuỗi axit amin của peptit này. Đối với các thụ thể TCR, tốt hơn nếu các thay thế này nằm ở miền biến đổi chuỗi alpha của thụ thể TCR và chuỗi beta của thụ thể TCR. Sự thay thế này có thể có tính chất bảo toàn, ví dụ, khi một axit amin được thay thế bằng axit amin có cấu trúc và đặc tính tương tự, như khi axit amin kỵ nước được thay thế bằng axit amin kỵ nước khác. Thậm chí sự thay thế axit amin có kích thước hoặc tính chất hóa học và kích thước giống nhau hoặc tương tự sẽ được bảo toàn hơn, như khi leuxin được thay thế bằng isoleuxin. Trong các nghiên cứu về sự thay đổi trình tự ở họ các protein đồng dạng có trong tự nhiên, sự thay thế axit amin nhất định thường được dung nạp hơn so với các loại khác, và sự thay thế này thường có tương quan với tính tương tự về kích thước, điện tích, tính phân cực, tính kỵ nước giữa axit amin gốc và sự thay thế của nó và đây là cơ sở cho việc xác định “sự thay thế bảo toàn”.

Sự thay thế bảo toàn ở đây được xác định là sự trao đổi trong một trong năm nhóm sau: Nhóm 1-các gốc nhỏ, béo, không phân cực hoặc phân cực không đáng kể (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Nhóm 2-các gốc phân cực, có điện tích âm và các amit của chúng (Asp, Asn, Glu, Gln); Nhóm 3-các gốc phân cực, có điện tích dương (His, Arg, Lys); Nhóm 4-các gốc lớn, béo, không phân cực (Met, Leu, Ile, Val, Cys); Nhóm 5-các gốc lớn, thơm (Phe, Tyr, Trp).

Sự thay thế ít bảo toàn có thể liên quan đến sự thay thế của một axit amin bằng axit amin khác có các tính chất tương tự nhưng có khác biệt nhất định về kích thước, như sự thay thế alanin bằng gốc isoleuxin. Sự thay thế không bảo toàn ở mức cao có thể liên quan đến sự thay thế axit amin có tính axit bằng axit amin phân cực, hoặc thậm chí bằng axit amin có tính bazơ. Tuy nhiên, sự thay thế “gốc” này không thể bị loại bỏ khi có thể không hiệu quả do các hiệu quả hóa học không hoàn toàn dự đoán được và sự thay thế gốc cũng có thể làm tăng hiệu quả may mắn không dự đoán được từ các nguyên lý hóa học đơn giản.

Theo một khía cạnh, sự thay thế này có thể liên quan đến cấu trúc chứ không

phải các axit amin-L thông thường. Do đó, các axit amin-D có thể được thay thế cho các axit amin-L thường được tìm thấy trong các peptit của kháng nguyên theo sáng chế và cũng vẫn được bao gồm trong bản mô tả sáng chế này. Ngoài ra, các axit amin không chuẩn (nghĩa là không phải các axit amin tạo thành protein có trong tự nhiên thông thường) cũng có thể được sử dụng cho mục đích thay thế để tạo ra chất sinh miễn dịch và polypeptit gây miễn dịch theo sáng chế.

Nếu sự thay thế ở nhiều hơn một vị trí được phát hiện là tạo ra peptit có hoạt tính kháng nguyên lớn hơn hoặc gần như tương đương như được xác định dưới đây, thì tổ hợp của các thay thế này sẽ được thử nghiệm để xác định xem sự thay thế kết hợp có tạo ra tác dụng bổ sung hoặc tác dụng hiệp đồng đối với tính kháng nguyên của peptit hay không. Tối đa có không quá 4 vị trí trong peptit sẽ được thay thế đồng thời.

Các thụ thể tế bào T (TCR)

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến thụ thể TCR bao gồm chuỗi alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1, và các biến thể của nó; và chuỗi beta của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1, và các biến thể của nó. Theo một khía cạnh, thụ thể TCR được mô tả ở đây có khả năng gắn kết hoặc gắn kết đặc hiệu với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm-I của người/KIQEILTQV (SEQ ID NO:1) hoặc với phức hợp nhóm II/KIQEILTQV (SEQ ID NO:1).

Bảng 1: thụ thể TCR làm đại diện theo sáng chế

Nhận biết thụ thể TCR	Mô tả	Trình tự
chuỗi alpha R10P1A7	chuỗi alpha	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFL SVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGA GLQLLTIFYFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKH LSLRIADTQTGDSAIYFCAESKETRLMFGDGT QLVVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDF

		KSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFP SPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRI LLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:2)
	đoạn mạch L (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR (SEQ ID NO:3)
	chuỗi V (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFL SVREGDSSVINCTYTDSSSTYLWYKQEPGA GLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKH LSLRIADTQTGDSAIYFCAES (SEQ ID NO:4)
	CDR1	DSSSTY (SEQ ID NO:5)
	CDR2	IFS (SEQ ID NO:6)
	CDR3	CAESKETRLMF (SEQ ID NO:7)
	đoạn mạch J (TRAJ31)	RLMFGDGTQLVVKP (SEQ ID NO:8)
	Vùng ổn định (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCD VKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:9)
chuỗi beta R10P1A7	chuỗi beta	MLLLLLLLPGISLLPGSLAGSGLGAVVSQH PSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQF PKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLIN HASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARAGGHE QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKE VHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK DSRG (SEQ ID NO:10)

	đoạn mạch L (TRBV20-1)	MLLLLLLLGPGISLLLPGLAGSGL (SEQ ID NO:11)
	chuỗi V (TRBV20-1)	MLLLLLLLGPGISLLLPGLAGSGLGAVVSQH PSWVICKSGTTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQF PKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLIN HASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSAR (SEQ ID NO:12)
	CDR1	DFQATT (SEQ ID NO:13)
	CDR2	SNEGSKA (SEQ ID NO:14)
	CDR3	CSARAGGHEQFF (SEQ ID NO:15)
	chuỗi J (TRBJ2-1)	EQFFGPGTRLTVL (SEQ ID NO:16)
	vùng ổn định (TRBC2)	EDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFTWQNP FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAE AWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSAVLMMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:17)

Mỗi chuỗi alpha và beta của thụ thể TCR alpha/beta, và chuỗi gama và delta của thụ thể TCR gama/delta, thường được cho là có hai “miền”, cụ thể là miền biến đổi và miền ổn định. Miền biến đổi gồm sự kết chuỗi của vùng biến đổi (V), và vùng nối (J). Miền biến đổi cũng có thể bao gồm vùng dẫn đầu (L). Các chuỗi beta và delta cũng có thể bao gồm vùng đa dạng (D). Các miền ổn định alpha và beta cũng có thể bao gồm các miền xuyên màng (TM) ở đầu tận cùng C để neo các chuỗi alpha và beta với màng tế bào.

Do đó, theo sáng chế, thuật ngữ "miền biến đổi alpha của thụ thể TCR" để chỉ sự kết chuỗi của vùng thụ thể TCR gama V (TRGV) mà không có vùng dẫn đầu (L), và vùng thụ thể TCR gama J (TRGJ), và thuật ngữ “miền ổn định alpha của thụ

thể TCR” để chỉ vùng TRAC ngoại bào, hoặc trình tự TRAC bị cắt cụt ở đầu tận cùng C, và tùy ý, miền xuyên màng alpha (VIGFRILLKLVAGFNLLMTL (SEQ ID NO:18)).

Tương tự, thuật ngữ "miền biến đổi beta của thụ thể TCR" để chỉ sự kết chuỗi của vùng thụ thể TCR beta V (TRBV) mà không có vùng dẫn đầu (L) và vùng thụ thể TCR beta D/J (TRBD/TRBJ), và thuật ngữ “miền ổn định beta của thụ thể TCR” để chỉ vùng TRBC ngoại bào, hoặc trình tự TRGC bị cắt cụt ở đầu tận cùng C, và tùy ý, miền xuyên màng beta (TILYEILLGKATLYAVLVLSALVL (SEQ ID NO:19)).

Liên quan đến thụ thể TCR gama/delta, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miền biến đổi gama của thụ thể TCR" để chỉ sự kết chuỗi của vùng thụ thể TCR gama V (TRGV) mà không có vùng dẫn đầu (L), và vùng thụ thể TCR gama J (TRGJ), và thuật ngữ miền ổn định gama của thụ thể TCR để chỉ vùng TRGC ngoại bào, hoặc trình tự TRGC bị cắt cụt ở đầu tận cùng C. Tương tự, thuật ngữ "miền biến đổi delta của thụ thể TCR" để chỉ sự kết chuỗi của vùng thụ thể TCR delta V (TRDV) mà không có vùng dẫn đầu (L) và vùng thụ thể TCR delta D/J (TRDD/TRDJ), và thuật ngữ “miền ổn định delta của thụ thể TCR” để chỉ vùng TRDC ngoại bào, hoặc trình tự TRDC bị cắt cụt ở đầu tận cùng C.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm chuỗi alpha của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, với chuỗi alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1. Các chuỗi alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1 chứa đoạn mạch dẫn đầu (L); chuỗi V; ba vùng quyết định tính bổ trợ (CDR1, CDR2 và CDR3); vùng nối (J) và vùng ổn định, như được xác định trong Bảng 1.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm miền biến đổi alpha của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, với miền biến đổi alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, miền

ổn định alpha của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là 75%, với miền ổn định alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, miền biến đổi alpha của thụ thể TCR chứa ít nhất một vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi alpha (CDR) được chọn từ nhóm bao gồm các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi alpha được thể hiện trong Bảng 1. Theo một phương án được ưu tiên, miền biến đổi alpha của thụ thể TCR chứa vùng CDR3 của chuỗi alpha được thể hiện trong Bảng 1. Theo phương án được ưu tiên khác, miền biến đổi alpha của thụ thể TCR chứa các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi alpha được thể hiện trong Bảng 1.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, miền biến đổi alpha của thụ thể TCR có mức độ giống về trình tự ít nhất 90% với miền biến đổi alpha của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1, và chứa các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chính miền biến đổi alpha được thể hiện trong Bảng 1.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, chuỗi beta của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, với chuỗi beta của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1. Các chuỗi beta của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1 chứa đoạn mạch dẫn đầu (L); chuỗi V; ba vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR1, CDR2 và CDR3); vùng nối (J) và vùng ổn định, như được xác định trong Bảng 1.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, miền biến đổi beta của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, với miền biến đổi beta của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, miền ổn định beta của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 75%, với

miền ổn định beta của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, miền biến đổi beta của thụ thể TCR chứa ít nhất một vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) của chuỗi beta được chọn từ nhóm bao gồm các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi beta được thể hiện trong Bảng 1. Theo một phương án được ưu tiên, miền biến đổi beta của thụ thể TCR chứa vùng CDR3 của chuỗi beta được thể hiện trong Bảng 1. Theo phương án được ưu tiên khác, miền biến đổi beta của thụ thể TCR chứa các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi beta được thể hiện trong Bảng 1.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, miền biến đổi beta của thụ thể TCR có mức độ giống về trình tự ít nhất 90% hoặc 95% với miền biến đổi beta của thụ thể TCR được thể hiện trong Bảng 1, và chứa các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của cùng miền biến đổi beta của thụ thể TCR nêu trong Bảng 1.

Miền biến đổi của chuỗi alpha có thể chứa một hoặc nhiều vùng CDR của chuỗi alpha có một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế axit amin so với trình tự của vùng CDR tương ứng được thể hiện trong Bảng 1. Tương tự, vùng biến đổi của chuỗi beta có thể chứa một hoặc nhiều vùng CDR của chuỗi beta có một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế axit amin so với trình tự vùng CDR của chuỗi beta tương ứng được thể hiện trong Bảng 1.

Chuỗi alpha của thụ thể TCR và chuỗi beta của thụ thể TCR có thể được dung hợp để tạo thành thụ thể TCR chuỗi đơn. Theo cách khác, các chuỗi alpha và beta của thụ thể TCR có thể được biểu hiện dưới dạng các protein riêng biệt, các protein này có thể được ghép thành dị dimer.

Theo một phương án, chuỗi alpha của thụ thể TCR bất kỳ nêu trong Bảng 1 được ghép cặp với chuỗi beta của thụ thể TCR khác bất kỳ để tạo ra thụ thể TCR gắn kết đặc hiệu với phức hợp peptit IGF2BP3-001-phân tử HLA. Theo phương án khác, chuỗi beta của thụ thể TCR bất kỳ nêu trong Bảng 1 được ghép cặp với chuỗi alpha của thụ thể TCR khác bất kỳ để tạo ra thụ thể TCR gắn kết đặc hiệu với phức hợp peptit IGF2BP3-001-phân tử HLA.

Thụ thể TCR R10P1A7

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa hoặc bao gồm, chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta của thụ thể TCR R10P1A7, lần lượt tương ứng với trình tự SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:10.

Miền biến đổi alpha của thụ thể TCR R10P1A7 chứa, hoặc theo cách khác bao gồm, các axit amin 22 đến 130 của trình tự SEQ ID NO:2; miền ổn định alpha của thụ thể TCR R10P1A7 chứa, hoặc theo cách khác bao gồm, các axit amin từ 131 đến 271 của trình tự SEQ ID NO:2; miền biến đổi beta của thụ thể TCR R10P1A7 chứa, hoặc theo cách khác bao gồm, các axit amin từ 26 đến 139 của trình tự SEQ ID NO:10; và miền ổn định beta của thụ thể TCR chứa, hoặc theo cách khác bao gồm, các axit amin từ 140 đến 318 của trình tự SEQ ID NO:10.

Theo một phương án cụ thể, thụ thể TCR theo sáng chế chứa chuỗi alpha của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, với chuỗi alpha của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:2.

Theo phương án khác, thụ thể TCR theo sáng chế chứa miền biến đổi alpha của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, với miền biến đổi alpha của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:2.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa miền ổn định alpha của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 75%, với miền ổn định alpha của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:2.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa miền biến đổi alpha của thụ thể TCR chứa ít nhất một vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi alpha (CDR) được chọn từ nhóm bao gồm các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi alpha của trình tự SEQ ID NO:2. Theo một phương án được ưu tiên, miền biến đổi alpha của thụ thể TCR chứa vùng CDR3 của chuỗi alpha của trình tự SEQ ID NO:2. Theo phương án được ưu tiên khác, miền biến đổi alpha của thụ thể TCR chứa các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi alpha của trình tự SEQ ID NO:2.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, thụ thể TCR theo sáng chế chứa miền biến đổi alpha của thụ thể TCR có mức độ giống về trình tự ít nhất 90% với miền biến đổi alpha của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:2, và chứa các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:2.

Theo phương án cụ thể khác, thụ thể TCR theo sáng chế chứa chuỗi beta của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, với chuỗi beta của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:10.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa miền biến đổi beta của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, với miền biến đổi beta của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:10.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa miền ổn định beta của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, tốt hơn là có mức độ giống 75%, với miền ổn định beta của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:10.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế chứa miền biến đổi beta của thụ thể TCR chứa ít nhất một vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) của chuỗi beta được chọn từ nhóm bao gồm các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi beta của trình tự SEQ ID NO:10. Theo một phương án được ưu tiên, miền biến đổi beta của thụ thể TCR chứa vùng CDR3 của chuỗi beta của trình tự SEQ ID NO:10. Theo phương án được ưu tiên khác, miền biến đổi beta của thụ thể TCR chứa các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi beta của trình tự SEQ ID NO:10.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, thụ thể TCR theo sáng chế chứa miền biến đổi beta của thụ thể TCR có mức độ giống về trình tự ít nhất 90% với miền biến đổi beta của thụ thể TCR của SEQ ID NO:10, và chứa các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:10.

Miền biến đổi của chuỗi alpha có thể chứa một hoặc nhiều vùng CDR của chuỗi alpha có một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế axit amin so với trình tự của vùng CDR tương ứng của trình tự SEQ ID NO:2. Tương tự, miền biến đổi của chuỗi beta

có thể chứa một hoặc nhiều vùng CDR của chuỗi beta có một, hai, ba hoặc bốn sự thay thế axit amin so với trình tự vùng CDR của chuỗi beta tương ứng của trình tự SEQ ID NO:10.

Theo một phương án được ưu tiên khác, thụ thể TCR theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với phức hợp peptit IGF2BP3-phân tử HLA, trong đó peptit IGF2BP3 này được chọn từ KIQEILTQV (SEQ ID NO:1) và các biến thể của nó. Theo một phương án, phân tử HLA là phân tử MHC nhóm I được chọn từ nhóm bao gồm các phân tử HLA-A, HLA-B, và HLA-C. Theo một phương án phân tử HLA là HLA-A*02. Theo phương án khác, phân tử HLA là phân tử MHC nhóm II được chọn từ nhóm bao gồm HLA-DP, HLA-DQ, và HLA-DR.

Tốt hơn nếu các thụ thể TCR theo sáng chế gắn kết với phức hợp peptit IGF2BP3-phân tử HLA với ái lực gắn kết (K_D) khoảng 100 μ M hoặc nhỏ hơn, khoảng 50 μ M hoặc nhỏ hơn, khoảng 25 μ M hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 10 μ M hoặc nhỏ hơn. Được ưu tiên hơn là các thụ thể TCR ái lực cao có ái lực gắn kết khoảng 1 μ M hoặc nhỏ hơn, khoảng 100nM hoặc nhỏ hơn, khoảng 50nM hoặc nhỏ hơn, khoảng 25nM hoặc nhỏ hơn. Ví dụ không làm giới hạn về khoảng ái lực gắn kết được ưu tiên của các thụ thể TCR theo sáng chế bao gồm ái lực gắn kết nằm trong khoảng từ khoảng 1nM đến khoảng 10nM; từ khoảng 10nM đến khoảng 20nM; từ khoảng 20nM đến khoảng 30nM; từ khoảng 30nM đến khoảng 40nM; từ khoảng 40nM đến khoảng 50nM; từ khoảng 50nM đến khoảng 60nM; từ khoảng 60nM đến khoảng 70nM; từ khoảng 70nM đến khoảng 80nM; từ khoảng 80nM đến khoảng 90nM; và từ khoảng 90nM đến khoảng 100nM.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến các thụ thể TCR theo sáng chế, thuật ngữ “sự gắn kết đặc hiệu” và các biến thể ngữ pháp của chúng được sử dụng để chỉ thụ thể TCR có ái lực gắn kết (K_D) đối với phức hợp peptit IGF2BP3-phân tử HLA bằng 100 μ M hoặc nhỏ hơn.

Các thụ thể TCR dị dime alpha/beta theo sáng chế có thể có liên kết disulfua được đưa vào giữa các miền ổn định của chúng. Các thụ thể TCR được ưu tiên thuộc loại này bao gồm các thụ thể có trình tự miền ổn định TRAC và trình tự miền ổn định TRBC1 hoặc TRBC2, ngoại trừ việc các gốc Thr 48 của TRAC và Ser 57 của TRBC1 hoặc TRBC2 được thay thế bằng các gốc xystein, các gốc xystein này

tạo thành liên kết disulfua giữa trình tự miền ổn định TRAC và trình tự miền ổn định TRBC1 hoặc TRBC2 của thụ thể TCR.

Bất kể có hoặc không có liên kết giữa các chuỗi được đưa vào nêu trên, các thụ thể TCR dị dime alpha/beta theo sáng chế có thể có trình tự miền ổn định TRAC và trình tự miền ổn định TRBC1 hoặc TRBC2, và trình tự miền ổn định TRAC và trình tự miền ổn định TRBC1 hoặc TRBC2 của thụ thể TCR có thể được liên kết bằng liên kết disulfua tự nhiên giữa gốc Cys4 của exon 2 của TRAC và gốc Cys2 của exon 2 của TRBC1 hoặc TRBC2.

Các thụ thể TCR theo sáng chế có thể chứa nguyên tử đánh dấu có thể phát hiện được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, nhóm huỳnh quang và biotin. Các thụ thể TCR theo sáng chế có thể được liên hợp với chất có hoạt tính điều trị, như chất đồng vị phóng xạ, chất hóa trị liệu, hoặc độc tố.

Theo một phương án, thụ thể TCR theo sáng chế có ít nhất một đột biến trong chuỗi alpha và/hoặc có ít nhất một đột biến trong chuỗi beta được cải biến glycosyl hóa so với thụ thể TCR không được đột biến.

Theo một phương án, thụ thể TCR chứa ít nhất một đột biến trong chuỗi alpha của thụ thể TCR và/hoặc chuỗi beta của thụ thể TCR có ái lực gắn kết với, và/hoặc chu kỳ bán hủy gắn kết với, phức hợp peptid IGF2BP3-phân tử HLA, ít nhất là gấp đôi so với của thụ thể TCR chứa chuỗi alpha của thụ thể TCR không được đột biến và/hoặc chuỗi beta của thụ thể TCR không được đột biến. Việc làm tăng ái lực của các thụ thể TCR đặc hiệu khối u, và sự khai thác nó, dựa vào sự tồn tại của khung ái lực của thụ thể TCR tối ưu. Sự tồn tại của khung này dựa trên việc quan sát được rằng các thụ thể TCR đặc hiệu với tác nhân gây bệnh giới hạn bởi HLA-A2 có giá trị KD thường thấp hơn khoảng 10 lần so với các thụ thể TCR đặc hiệu với kháng nguyên bản thân liên quan đến khối u được giới hạn bởi HLA-A2 (Aleksicet *al.* 2012; Kunert *et al.* 2013). Hiện nay, đã biết rằng mặc dù các kháng nguyên khối u có khả năng gây miễn dịch, do các khối u sinh ra các tế bào của chính đối tượng chỉ đột biến một hoặc nhiều protein bằng cách xử lý dịch mã biến đổi sẽ được hệ miễn dịch coi là kháng nguyên ngoại lai. Các kháng nguyên được điều hòa tăng hoặc được biểu hiện quá mức (còn được gọi là kháng nguyên bản thân) sẽ không nhất thiết gây ra đáp ứng miễn dịch chức năng kháng u: các tế bào T

biểu hiện thụ thể TCR có khả năng phản ứng ở mức cao với các kháng nguyên này sẽ không được chọn trong tuyển ức trong quá trình được gọi là dung nạp trung tâm (Xing *et al.* 2012; Ruella *et al.* 2014; Sharpe *et al.* 2015), nghĩa là chỉ còn lại các tế bào T với thụ thể TCR có ái lực thấp đối với kháng nguyên bản thân. Do đó, ái lực của các thụ thể TCR hoặc biến thể của sáng chế với IGF2BP3 có thể được tăng lên bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này.

“Dược phẩm” là chế phẩm thích hợp để sử dụng cho người trong lĩnh vực y tế. Tốt hơn nếu dược phẩm này vô khuẩn và được bào chế theo hướng dẫn thực hành sản xuất tốt (Good Manufacturing Practice: GMP).

Các dược phẩm theo sáng chế còn chứa ít nhất một tế bào chủ biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế, trong chất mang dược dụng.

Các dược phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa các tá dược và/hoặc chất ổn định dược dụng.

Dược phẩm này để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, như sử dụng dưới da, sử dụng trong da, sử dụng trong cơ hoặc sử dụng qua đường miệng. Nhằm mục đích này, các peptit và tùy ý các phân tử khác được hòa tan hoặc tạo hỗn dịch trong chất mang dược dụng, tốt hơn nếu là chất mang trong nước. Ngoài ra, dược phẩm có thể chứa các tá dược, như chất đệm, chất gắn kết, chất gây nở, chất pha loãng, chất tạo hương vị, chất làm trơn, v.v.. Danh sách nhiều loại tá dược có thể được sử dụng trong dược phẩm này có thể được tìm thấy trong tài liệu, ví dụ, A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). Dược phẩm này có thể được sử dụng để ngăn ngừa, phòng và/hoặc điều trị các bệnh u tuyến hoặc bệnh ung thư. Các dạng dược phẩm làm ví dụ có thể được tìm thấy trong, ví dụ, Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP2112253, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các axit nucleic (ví dụ, các polynucleotit) mã hóa peptit hoặc các biến thể của peptit, các thụ thể TCR và biến thể của thụ thể TCR của sáng chế. Polynucleotit này có thể là, ví dụ, ADN, ADN hỗ trợ, APN, ARN hoặc hỗn hợp của chúng, ở dạng sợi đơn và/hoặc sợi kép, hoặc dạng nguyên thể hoặc dạng ổn định của các polynucleotit, ví dụ như các polynucleotit có khung chính phosphorothioat và nó có thể chứa hoặc không chứa

intron, miễn là nó mã hóa peptit. Tất nhiên là chỉ các peptit chứa các gốc axit amin có trong tự nhiên được liên kết bằng các liên kết peptit có trong tự nhiên là có thể mã hóa bằng polynucleotit. Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện có khả năng biểu hiện polypeptit theo sáng chế.

Nhiều phương pháp khác nhau đã được phát triển để liên kết các polynucleotit, đặc biệt là ADN, với các vector, ví dụ, bằng các đầu kết dính bổ trợ. Chẳng hạn, các vùng polyme đồng nhất bổ trợ có thể được bổ sung thêm vào đoạn ADN cần được chèn vào ADN của vector. Sau đó, vector và đoạn ADN được nối bằng sự liên kết hydro giữa các đuôi polyme đồng nhất bổ trợ để tạo ra các phân tử ADN tái tổ hợp.

Các nhóm liên kết tổng hợp chứa một hoặc nhiều vị trí giới hạn tạo ra phương pháp thay thế để nối đoạn ADN với các vector. Các nhóm liên kết tổng hợp chứa nhiều vị trí endonucleaza giới hạn được bán trên thị trường từ nhiều nguồn bao gồm cả từ công ty International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, Mỹ.

Phương pháp cải biến mong muốn đối với ADN mã hóa polypeptit theo sáng chế sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza như được bộc lộ trong tài liệu của Saiki RK và các đồng tác giả (Saiki *et al.*, 1988). Phương pháp này có thể được sử dụng để đưa ADN vào vector thích hợp, ví dụ, bằng kỹ thuật xử lý vị trí giới hạn thích hợp, hoặc phương pháp này có thể được sử dụng để cải biến ADN theo cách hữu ích khác như đã biết trong lĩnh vực này. Nếu các vector của virus được sử dụng, vector poxvirus hoặc vector adenovirus được ưu tiên.

Theo một khía cạnh, để thu được tế bào T biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế, axit nucleic mã hóa chuỗi alpha-TCR và/hoặc chuỗi beta-TCR theo sáng chế được tách dòng vào các vector biểu hiện, như gamma retrovirus hoặc lentivirus. Các virus tái tổ hợp được tạo ra và sau đó được thử nghiệm về mặt chức năng, như độ đặc hiệu kháng nguyên và ái lực chức năng. Sau đó, phần phân ước của sản phẩm cuối được sử dụng để tải nạp quần thể tế bào T đích (thường được tinh chế từ các tế bào PBMC của bệnh nhân), quần thể này được mở rộng trước khi tiêm truyền vào bệnh nhân.

Theo khía cạnh khác, để thu được các tế bào T biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế, ARN của thụ thể TCR được phân tích bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh

vực này, ví dụ, các hệ phiên mã *in vitro*. Sau đó, ARN của thụ thể TCR tổng hợp được *in vitro* này được đưa vào các tế bào T CD8+ sơ cấp được lấy từ người cho khỏe mạnh bằng cách gây xung điện để biểu hiện lại chuỗi alpha-TCR và/hoặc chuỗi beta-TCR đặc hiệu khối u.

Các chuỗi của thụ thể TCR được đưa vào tế bào T ngoại vi có thể cạnh tranh với các chuỗi TCR nội sinh để kết hợp với phức hợp CD3, là thành phần cần thiết để biểu hiện bề mặt của thụ thể TCR. Do sự biểu hiện bề mặt của thụ thể TCR ở mức cao là cần thiết để tạo độ nhạy thích hợp để làm cho các tế bào biểu hiện kháng nguyên khối u đích (Cooper *et al.*, 2000; Labrecque *et al.*, 2001), các phương pháp làm tăng mức độ biểu hiện gen của chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR là điều quan trọng cần phải tính đến trong liệu pháp gen TCR.

Để làm gia tăng mức độ biểu hiện, axit nucleic mã hóa các thụ thể TCR theo sáng chế có thể được liên kết khi hoạt động với các gen khởi đầu mạnh, như đoạn lặp ở đầu tận cùng dài (long terminal repeat: LTR) của retrovirus, virus cự bào (cytomegalovirus: CMV), virus tế bào gốc của chuột (murine stem cell virus: MSCV) U3, phosphoglycerat kinaza (phosphoglycerate kinase: PGK), β -actin, ubiquitin, và gen khởi đầu phức hợp virus của khỉ 40 (simian virus 40: 40SV40)/CD43 (Cooper *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2009), yếu tố kéo dài (elongation factor: EF)-1a (Tsuiji *et al.*, 2005) và gen khởi đầu tạo ổ bệnh ở lách (spleen focus-forming virus: SFFV) (Joseph *et al.*, 2008). Theo một phương án được ưu tiên, gen khởi đầu này khác loại với axit nucleic được biểu hiện.

Ngoài các gen khởi đầu mạnh, cat xet biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế có thể chứa các thành phần bổ sung để có thể làm gia tăng mức độ biểu hiện chuyển gen, bao gồm cả đường đa purin trung tâm (central polypurine tract: cPPT), để kích thích sự chuyển dịch nhân của cấu trúc của lentivirus (Follenzi *et al.*, 2000), và yếu tố điều hòa sau phiên mã của virus viêm gan ở chuột chũi (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: wPRE), yếu tố này làm tăng mức độ biểu hiện chuyển gen bằng cách làm tăng tính ổn định của ARN (Zufferey *et al.*, 1999).

Các chuỗi alpha và beta của thụ thể TCR theo sáng chế có thể được mã hóa bằng các axit nucleic nằm trên các vector riêng biệt, hoặc có thể được mã hóa bằng

polynucleotit nằm trên chính vector này.

Cần đạt được sự biểu hiện trên bề mặt của thụ thể TCR ở mức cao để cho cả chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR của thụ thể TCR đưa vào được phiên mã ở mức cao. Nhằm mục đích này, chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR theo sáng chế có thể được tách dòng vào cấu trúc bi-xistronic trong một vector, vector này đã được chứng minh là có khả năng khắc phục được yêu cầu nêu trên. Việc sử dụng điểm vào trong ribosom (intraribosomal entry site: IRES) của virus ở giữa chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR tạo ra sự biểu hiện kết hợp của cả hai chuỗi này, do chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR được tạo ra từ một sản phẩm phiên mã bị phá vỡ thành hai protein trong khi dịch mã, điều này đảm bảo việc tạo ra tỷ lệ mol tương đương của chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR (Schmitt *et al.* 2009).

Axit nucleic mã hóa các thụ thể TCR theo sáng chế có thể là codon được tối ưu hóa để làm tăng mức độ biểu hiện từ tế bào chủ. Sự lặp lại trong mã di truyền cho phép một số axit amin được mã hóa bằng nhiều hơn một codon, nhưng một số codon “ít tối ưu” hơn các codon khác do độ khả dụng tương đối phù hợp của các ARN vận chuyển (tRNA) cũng như các yếu tố khác (Gustafsson *et al.*, 2004). Việc cải biến các trình tự gen của TCR-alpha và TCR-beta sao cho mỗi axit amin được mã hóa bằng codon tối ưu đối với sự biểu hiện gen của động vật có vú, cũng như loại bỏ motif không ổn định của ARN thông tin hoặc các vị trí ghép nối, đã được chứng minh là làm tăng đáng kể mức độ biểu hiện gen của TCR-alpha và TCR-beta (Scholten *et al.*, 2006).

Ngoài ra, sự bắt cặp sai giữa chuỗi TCR được đưa vào và chuỗi TCR nội sinh có thể làm cho tính đặc hiệu thu được có nguy cơ đáng kể về tính tự miễn dịch. Ví dụ, sự tạo ra các dime TCR hỗn hợp có thể làm giảm số lượng phân tử CD3 có thể tạo ra phức hợp TCR được bắt cặp thích hợp, và do đó có thể làm giảm đáng kể ái lực chức năng của các tế bào hiệu ứng thụ thể TCR được đưa vào (Kuballet *et al.*, 2007).

Để làm giảm mức độ bắt cặp sai, miền ở đầu tận cùng C của các chuỗi TCR theo sáng chế được đưa vào có thể được cải biến để kích thích ái lực giữa các chuỗi, trong khi làm giảm khả năng bắt cặp với TCR nội sinh của các chuỗi được đưa vào. Các phương pháp này có thể bao gồm bước thay thế các miền ở đầu tận

cùng C của chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR của người bằng các miền tương ứng của chuỗi của chúng (vùng ở đầu tận cùng C được làm cho giống với cấu trúc của chuỗi); tạo ra liên kết disulfua thứ hai giữa các chuỗi trong miền ở đầu tận cùng C bằng cách đưa gốc xystein thứ hai vào cả chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR của thụ thể TCR được đưa vào (sự cải biến xystein); trao đổi các gốc tương tác trong các vùng ở đầu tận cùng C của chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR (phương pháp “chỗ phình vào chỗ lõm” “knob-in-hole”); và dung hợp các miền biến đổi của chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR trực tiếp với CD3 ζ (thể dung hợp CD3 ζ) (Schmitt *et al.* 2009).

Tiếp đó, ADN (hoặc trong trường hợp vector retrovirus, ARN) có thể được biểu hiện trong vật chủ thích hợp để tạo ra polypeptit chứa peptit hoặc biến thể của sáng chế. Do đó, ADN mã hóa peptit hoặc biến thể của sáng chế có thể được sử dụng theo các kỹ thuật đã biết, được cải biến thích hợp theo phần bộc lộ được nêu ở đây, để tạo cấu trúc cho vector biểu hiện, mà sau đó vector này được dùng để biến nạp tế bào chủ thích hợp để biểu hiện và tạo ra polypeptit theo sáng chế. Các kỹ thuật này bao gồm các kỹ thuật được bộc lộ, ví dụ, trong các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075, và 4.810.648, các tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo.

ADN (hoặc trong trường hợp vector retrovirus, ARN) mã hóa polypeptit tạo thành hợp chất theo sáng chế có thể được nối với nhiều loại trình tự ADN khác để đưa vào vật chủ thích hợp. ADN kèm sẽ phụ thuộc vào tính chất của vật chủ, cách đưa ADN vào vật chủ này, và sự duy trì hoặc hợp nhất episom có được mong muốn hay không.

Nói chung, ADN được chèn vào vector biểu hiện, như plasmit, theo sự định hướng thích hợp và khung đọc chính xác để biểu hiện. Nếu cần, ADN có thể được liên kết với các trình tự nucleotit đối chứng điều hòa phiên mã và dịch mã thích hợp được nhận biết bởi vật chủ mong muốn, mặc dù các đối chứng này thường có mặt trong vector biểu hiện. Sau đó, vector được đưa vào vật chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Nói chung, không phải tất cả các vật chủ sẽ được biến nạp bởi vector. Do đó, sẽ cần chọn lọc các tế bào chủ được biến nạp. Một kỹ thuật chọn lọc bao gồm bước đưa

trình tự ADN vào vector biểu hiện, với các thành phần đối chứng cần thiết bất kỳ, để mã hóa tính trạng có thể chọn lọc ở tế bào được biến nạp, như sự kháng thuốc kháng sinh.

Theo cách khác, gen dùng cho tính trạng có thể chọn lọc này có thể là gen trên vector khác, được dùng để đồng biến nạp tế bào chủ mong muốn.

Sau đó, các tế bào chủ đã được biến nạp với ADN tái tổ hợp theo sáng chế được nuôi cấy trong khoảng thời gian đủ và trong các điều kiện thích hợp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết khi xem phần mô tả được bộc lộ ở đây để cho phép sự biểu hiện của polypeptit mà có thể được thu hồi sau đó.

Nhiều hệ biểu hiện là đã biết, bao gồm vi khuẩn (ví dụ, *E. coli* và *Bacillus subtilis*), nấm men (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*), nấm dạng sợi (ví dụ, *Aspergillus spec.*), tế bào thực vật, tế bào động vật và tế bào côn trùng. Tốt hơn nếu hệ này có thể là các tế bào của động vật có vú như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO), có thể mua được từ Bảo tàng ATCC Cell Biology Collection.

Theo một phương án, tế bào chủ được thiết kế để biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế. Theo các phương án được ưu tiên, tế bào chủ là tế bào T hoặc tiền thân của tế bào T của người. Theo một số phương án, tế bào T hoặc tiền thân của tế bào T thu được từ bệnh nhân ung thư. Theo các phương án khác, tế bào T hoặc tiền thân của tế bào T thu được từ người cho khỏe mạnh. Tế bào chủ theo sáng chế có thể là tế bào khác alen cùng loài hoặc tế bào tự thân đối với bệnh nhân cần điều trị. Theo một phương án, vật chủ là tế bào T gamma/delta được biến nạp để biểu hiện thụ thể TCR alpha/beta.

Vector plasmit của tế bào động vật có vú điển hình để biểu hiện cấu trúc chứa gen khởi đầu CMV hoặc SV40 có đuôi poly A thích hợp và gen đánh dấu sự kháng thuốc, như neomycin. Một ví dụ là pSVL có thể mua được từ công ty Pharmacia, Piscataway, NJ, Mỹ. Một ví dụ về vector biểu hiện của động vật có vú chịu cảm ứng là pMSG, cũng có thể mua được từ Pharmacia. Các vector plasmit của nấm men hữu ích là pRS403-406 và pRS413-416 và thường có thể mua được từ công ty Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, Mỹ. Các plasmit pRS403, pRS404, pRS405 và pRS406 là plasmit hợp nhất của nấm men (Yeast Integrating

plasmid: YIp) và kết hợp vào các gen đánh dấu có thể chọn lọc của nấm men HIS3, TRP1, LEU2 và URA3. Các plasmid pRS413-416 là plasmid đoạn trung tâm của nấm men (Yeast Centromere plasmid: Ycp). Các vector trên cơ sở gen khởi đầu CMV (ví dụ, sản phẩm của Sigma-Aldrich) tạo ra sự biểu hiện ổn định hoặc chuyển tiếp, sự biểu hiện hoặc sự tiết trong bào chất, và sự hướng đích ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C ở các hỗn hợp khác nhau của FLAG, 3xFLAG, c-myc hoặc MAT. Các protein dung hợp này cho phép phát hiện, tinh chế và phân tích protein tái tổ hợp. Các sản phẩm dung hợp hướng đích kép tạo ra tính linh hoạt khi phát hiện.

Vùng điều hòa gen khởi đầu của virus cự bào ở người (human cytomegalovirus: CMV) có hoạt tính mạnh điều chỉnh mức độ biểu hiện của protein cơ định cao tới 1 mg/l ở các tế bào COS. Đối với các dòng tế bào có hoạt tính kém hơn, mức protein thường là ~0,1 mg/l. Sự có mặt của nguồn gốc sao chép SV40 sẽ làm cho mức độ sao chép ADN cao ở các tế bào COS cho phép sao chép SV40. Ví dụ, các vector CMV có thể chứa nguồn gốc để sao chép pMB1 (dẫn xuất của pBR322) ở các tế bào vi khuẩn, gen b-lactamaza để chọn sự kháng ampicillin ở vi khuẩn, polyA của hGH, và nguồn gốc fl. Các vector chứa trình tự dẫn đầu pre-pro-trypsin (PPT) có thể định hướng sự tiết ra của protein dung hợp FLAG vào môi trường nuôi cấy để tinh chế bằng cách sử dụng kháng thể ANTI-FLAG, nhựa và bản kính. Các vector và hệ biểu hiện khác là đã được biết rõ trong lĩnh vực này để sử dụng với nhiều loại tế bào chủ khác nhau.

Theo phương án khác, hai hoặc nhiều peptit hoặc các biến thể của peptit theo sáng chế được mã hóa và do đó được biểu hiện theo thứ tự lần lượt (tương tự với cấu trúc “chuỗi hạt”). Theo cách này, peptit hoặc các biến thể của peptit có thể được liên kết hoặc được dung hợp với nhau bằng các đoạn axit amin của nhóm liên kết, ví dụ như LLLLLL, hoặc có thể được liên kết mà không có (các) peptit bổ sung bất kỳ giữa chúng. Các cấu trúc này cũng có thể được sử dụng cho liệu pháp điều trị ung thư, và có thể gây đáp ứng miễn dịch liên quan đến cả MHC I và MHC II.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ được biến nạp với cấu trúc của vector polynucleotit theo sáng chế. Tế bào chủ này có thể là tế bào không nhân hoặc tế bào có nhân điển hình. Các tế bào vi khuẩn có thể là tế bào chủ không nhân được

ưu tiên trong một số trường hợp và thường là chủng *E. coli*, ví dụ như chủng *E. coli* DH5 có thể mua được từ Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, Mỹ, và chủng RR1 có thể mua được từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Culture Collection: ATCC) của Rockville, MD, Mỹ (số ATCC 31343). Các tế bào chủ có nhân điển hình được ưu tiên bao gồm tế bào nấm men, tế bào côn trùng và tế bào động vật có vú, tốt hơn nếu là các tế bào của động vật có xương sống như các tế bào từ chuột nhắt, chuột, khỉ hoặc người và các dòng tế bào nguyên bào sợi và tế bào ruột kết. Các tế bào chủ của nấm men bao gồm YPH499, YPH500 và YPH501, thường được mua từ công ty Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, Mỹ. Các tế bào chủ của động vật có vú được ưu tiên bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) có thể mua được từ Bảo tàng ATCC dưới dạng CCL61, tế bào phôi chuột NIH Swiss NIH/3T3 có thể mua được từ Bảo tàng ATCC dưới dạng CRL 1658, các tế bào COS-1 có nguồn gốc từ thận khỉ có thể mua được từ Bảo tàng ATCC dưới dạng CRL 1650 và các tế bào 293 là tế bào phôi thận của người. Các tế bào côn trùng được ưu tiên là tế bào Sf9 mà có thể được chuyển nhiễm với vector biểu hiện baculovirus. Tổng quan về sự lựa chọn các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện có thể được tìm thấy trong các tài liệu, ví dụ, tài liệu của Paulina Balbás và Argelia Lorence “Methods in Molecular Biology Recombinant Expression, Reviews and Protocols,” Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, và tài liệu khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Sự biến nạp của các tế bào chủ thích hợp với cấu trúc ADN của sáng chế được thực hiện bằng các phương pháp đã được biết rõ, các phương pháp này thường phụ thuộc vào loại vector được sử dụng. Liên quan đến sự biến nạp của các tế bào chủ không nhân, ví dụ, xem tài liệu của Cohen và các đồng tác giả (Cohen *et al.*, 1972) và (Green and Sambrook, 2012). Sự biến nạp của các tế bào nấm men được mô tả trong tài liệu của Sherman và các đồng tác giả (Sherman *et al.*, 1986). Phương pháp của Beggs (Beggs, 1978) cũng hữu ích. Liên quan đến các tế bào của động vật có xương sống, các chất phản ứng hữu ích trong việc chuyển nhiễm các tế bào này, ví dụ, sản phẩm canxi phosphat và DEAE-dextran hoặc liposom, có thể mua được từ công ty Stratagene Cloning Systems, hoặc Life Technologies Inc.,

Gaithersburg, MD 20877, Mỹ. Phương pháp gây xung điện cũng hữu ích để biến nạp và/hoặc chuyển nhiễm các tế bào và đã được biết rõ trong lĩnh vực này để biến nạp tế bào nấm men, các tế bào vi khuẩn, tế bào côn trùng và tế bào của động vật có xương sống.

Tế bào được biến nạp thành công nghĩa là tế bào chứa cấu trúc ADN theo sáng chế, có thể được xác định bằng các kỹ thuật đã biết rõ như PCR. Theo cách khác, sự có mặt của protein trong dịch nổi bề mặt có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể.

Cần hiểu rằng một số tế bào chủ theo sáng chế là hữu ích để tạo ra các peptit theo sáng chế, ví dụ, các tế bào vi khuẩn, nấm men và côn trùng. Tuy nhiên, các tế bào chủ khác có thể hữu ích trong một số phương pháp điều trị. Ví dụ, các tế bào trình diện kháng nguyên, như tế bào đuôi gai, có thể được sử dụng một cách hữu ích để biểu hiện các peptit theo sáng chế sao cho chúng có thể được tải vào phân tử MHC thích hợp. Do đó, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vector biểu hiện theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, tế bào chủ là tế bào trình diện kháng nguyên, cụ thể là tế bào đuôi gai hoặc tế bào trình diện kháng nguyên. APC được tải protein dung hợp tái tổ hợp chứa phosphatase axit tuyến tiền liệt (prostatic acid phosphatase: PAP) đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (FDA) phê chuẩn ngày 29 tháng 4 năm 2010, để điều trị HRPC di căn không có triệu chứng hoặc có triệu chứng không đáng kể (Sipuleucel-T) (Rini *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2006).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra peptit hoặc biến thể của nó, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ và phân lập peptit ra khỏi tế bào chủ này hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

Theo phương án khác, các thụ thể TCR, axit nucleic hoặc vector biểu hiện của sáng chế được sử dụng làm thuốc. Ví dụ, peptit hoặc biến thể của nó có thể được bào chế để tiêm qua đường trong tĩnh mạch (intravenous: i.v.), tiêm dưới da (sub-cutaneous: s.c.), tiêm trong da (intradermal: i.d.), tiêm qua đường trong màng bụng (intraperitoneal: i.p.), tiêm trong cơ (intramuscular: i.m.). Các phương pháp tiêm peptit được ưu tiên bao gồm s.c., i.d., i.p., i.m., và i.v.. Các phương pháp tiêm

ADN được ưu tiên bao gồm i.d., i.m., s.c., i.p. và i.v.. Liều dùng của peptit hoặc ADN nằm trong khoảng từ, ví dụ từ 50 μ g đến 1,5mg, tốt hơn là từ 125 μ g đến 500 μ g, có thể được cho trước và sẽ phụ thuộc vào peptit hoặc ADN tương ứng. Các liều dùng nằm trong khoảng này đã được sử dụng thành công trong các thử nghiệm trước đó (Walter *et al.*, 2012).

Polynucleotit dùng để tiêm chủng có hiệu quả có thể gần như tinh khiết, hoặc được chứa trong vector hoặc hệ giải phóng thích hợp. Axit nucleic có thể là ADN, ADN bổ trợ, APN, ARN hoặc hỗn hợp của chúng. Các phương pháp để thiết kế và đưa axit nucleic này vào là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Tổng quan về nội dung này được đưa ra, ví dụ, trong tài liệu của Teufel và các đồng tác giả (Teufel *et al.*, 2005). Các vaccin polynucleotit được bào chế dễ dàng nhưng cơ chế tác dụng của các vector này trong việc gây đáp ứng miễn dịch vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn. Các vector và hệ giải phóng thích hợp bao gồm ADN và/hoặc ARN của virus, như các hệ trên cơ sở adenovirus, virus vaccinia, retrovirus, virus ecpet, virus liên quan đến adenovirus hoặc thể lai chứa các thành phần của nhiều hơn một virus. Các hệ giải phóng không chứa virus bao gồm lipid cation và polyme cation và đã được biết rõ trong lĩnh vực giải phóng ADN. Sự giải phóng bằng phương pháp vật lý, như bằng “súng bắn gen” cũng có thể được sử dụng. Một hoặc nhiều peptit được mã hóa bằng Axit nucleic có thể là protein dung hợp, ví dụ, với epitop kích thích các tế bào T đối với vùng CDR đối lập tương ứng như được lưu ý trên đây.

Sáng chế còn đề cập đến aptame. Các aptame (xem công bố đơn quốc tế số WO 2014/191359 và tài liệu tham khảo được nêu ở đây) là phân tử axit nucleic sợi đơn mạch ngắn, có thể cuộn gập thành cấu trúc ba chiều xác định và nhận biết các cấu trúc đích đặc hiệu. Chúng dường như là thành phần thay thế thích hợp để phát triển liệu pháp hướng đích. Aptame đã được chứng minh là gắn kết chọn lọc với nhiều loại đích phức hợp khác nhau với ái lực và độ đặc hiệu cao.

Aptame nhận biết các phân tử nằm ở bề mặt tế bào đã được xác định trong thập kỷ trước và tạo ra phương tiện để phát triển phương pháp chẩn đoán và điều trị. Do aptame đã được chứng minh là gần như không có tính độc và tính sinh miễn dịch, chúng là các ứng viên triển vọng cho các ứng dụng y sinh. Thực vậy, các aptame, ví dụ, aptame nhận biết kháng nguyên màng đặc hiệu tuyến tiền liệt, đã

được sử dụng thành công cho các liệu pháp hướng đích và đã được chứng minh là có chức năng trong mô ghép khác loài *in vivo*. Ngoài ra, aptame nhận biết các dòng tế bào khối u đặc hiệu đã được xác định.

Aptame của ADN có thể được chọn lọc để cho thấy đặc tính nhận biết phổ rộng đối với các tế bào ung thư khác nhau, và cụ thể là các tế bào có nguồn gốc từ khối u rắn, trong khi các tế bào không tạo khối u và tế bào sơ cấp khỏe mạnh không được nhận biết. Nếu aptame đã xác định không chỉ nhận biết kiểu phụ của khối u đặc hiệu mà còn tương tác với loạt khối u, điều này làm cho aptame thích hợp làm chất còn được gọi là chất chẩn đoán và chất điều trị phổ rộng.

Hơn nữa, việc đánh giá đặc tính gắn kết tế bào bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy cho thấy rằng aptame có ái lực rõ ràng rất tốt trong khoảng nanomol.

Aptame hữu ích cho mục đích chẩn đoán và điều trị. Theo một khía cạnh, ít nhất một hoặc nhiều aptame được hấp thu bởi các tế bào khối u và do đó có thể có tác dụng làm thể mang phân tử để cung cấp chất kháng ung thư hướng đích như ARN can thiệp có kích thước nhỏ (small interfering RNA: siRNA) vào các tế bào khối u.

Aptame có thể được lựa chọn đối với các đích phức hợp như các tế bào và mô và phức hợp của peptit hoặc các thụ thể TCR chứa, tốt hơn là bao gồm, trình tự theo trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15 theo sáng chế sau đây với phân tử MHC, bằng cách sử dụng kỹ thuật tiến hóa theo hệ thống của phối tử bằng cách làm giàu lũy tiến (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment: SELEX)-tế bào.

Theo một phương án sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra thụ thể TCR như được mô tả ở đây, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ có khả năng biểu hiện thụ thể TCR trong các điều kiện thích hợp để kích thích sự biểu hiện của thụ thể TCR.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp nhận biết và phân lập thụ thể TCR theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước ủ các tế bào PBMC, được lấy từ người cho khỏe mạnh âm tính với HLA-A*02, với các monome A2/IGF2BP3, ủ các tế bào PBMC này với tetrame-phycoerythrin (PE) và phân lập các tế bào T có

ái lực cao bằng phương pháp phân tích Calibur-phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting: FACS).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp nhận biết và phân lập thụ thể TCR theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước ủ các tế bào PBMC, được lấy từ người cho khỏe mạnh âm tính với HLA-A*02, với các monome A2/p286-1Y2L, ủ các tế bào PBMC này với tetrame-phycoerythrin (PE) và phân lập các tế bào T có ái lực cao bằng phương pháp phân tích Calibur-phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp nhận biết và phân lập thụ thể TCR theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước ủ các tế bào PBMC, được lấy từ người cho khỏe mạnh âm tính với HLA-A*02, với các monome A2/p286-1Y2L9L, ủ các tế bào PBMC này với tetrame-phycoerythrin (PE) và phân lập các tế bào T có ái lực cao bằng phương pháp phân tích Calibur-phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp nhận biết và phân lập thụ thể TCR theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước thu được chuột chuyển gen có toàn bộ locus gen $TCR\alpha\beta$ của người (1,1 và 0,7Mb), có các tế bào T biểu hiện danh mục thụ thể TCR đa dạng của người để bù lại sự thiếu hụt thụ thể TCR của chuột, gây miễn dịch cho chuột này bằng IGF2BP3-001, ủ các tế bào PBMC thu được từ chuột chuyển gen với tetrame-phycoerythrin (PE), và phân lập các tế bào T có ái lực cao bằng phương pháp phân tích Calibur-phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp nhận biết và phân lập thụ thể TCR theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước thu được chuột chuyển gen có toàn bộ locus gen $TCR\alpha\beta$ của người (1,1 và 0,7Mb), có các tế bào T biểu hiện danh mục thụ thể TCR đa dạng của người để bù lại sự thiếu hụt thụ thể TCR của chuột, gây miễn dịch cho chuột này bằng p286-1Y2L, ủ các tế bào PBMC thu được từ chuột chuyển gen với tetrame-phycoerythrin (PE), và phân lập các tế bào T có ái lực cao bằng phương pháp phân tích Calibur-phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp nhận biết và phân lập thụ thể TCR

theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước thu được chuột chuyển gen có toàn bộ locus gen TCR $\alpha\beta$ của người (1,1 và 0,7Mb), có các tế bào T biểu hiện danh mục thụ thể TCR đa dạng của người để bù lại sự thiếu hụt thụ thể TCR của chuột, gây miễn dịch cho chuột này bằng p286-1Y2L9L, ủ các tế bào PBMC thu được từ chuột chuyển gen với tetrame-phycoerythrin (PE), và phân lập các tế bào T có ái lực cao bằng phương pháp phân tích Calibur-phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp theo sáng chế, trong đó tế bào T này chứa vector biểu hiện có khả năng biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế.

Sáng chế còn mô tả phương pháp tiêu diệt tế bào đích ở bệnh nhân có tế bào đích biểu hiện bất thường IGF2BP3, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng với lượng hữu hiệu của thụ thể TCR, thụ thể TCR hòa tan và/hoặc các tế bào T theo sáng chế.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng thụ thể TCR bất kỳ đã mô tả, axit nucleic theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, hoặc tế bào lymphô T hoạt tính gây độc tế bào theo sáng chế làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng theo sáng chế, trong đó thuốc này có hoạt tính chống ung thư.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng theo sáng chế, trong đó các tế bào ung thư nêu trên là các tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ hoặc các tế bào khối u huyết học hoặc tế bào khối u dạng rắn khác như bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư vú, caxinom tế bào Merkel, u melanin, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật và ống mật chủ và bệnh ung thư thực quản.

Sáng chế còn mô tả phương pháp tiêu diệt các tế bào ung thư bao gồm bước cho các tế bào ung thư tiếp xúc với tế bào chủ theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào chủ biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào T hoặc tiền thân của tế bào T. Theo một phương án được ưu tiên, các tế bào ung thư được chọn từ tế bào bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ hoặc các tế bào

khối u huyết học hoặc tế bào khối u dạng rắn khác như bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư vú, caxinom tế bào Merkel, u melanin, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật và ống mật chủ và bệnh ung thư thực quản. Theo một số phương án, thụ thể TCR được liên hợp với chất có hoạt tính điều trị. Theo một số phương án, chất có hoạt tính điều trị này được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, chất hóa trị liệu, và độc tố.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng tế bào chủ theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào chủ biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào T hoặc tiền thân của tế bào T. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào cùng nguồn gốc với đối tượng cần được điều trị. Theo phương án khác, tế bào chủ là tế bào khác alen cùng loài với đối tượng cần được điều trị. Theo một phương án được ưu tiên, các tế bào ung thư được chọn từ các tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ hoặc tế bào khối u huyết học hoặc tế bào khối u dạng rắn khác như tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư tế bào thận, ung thư não, ung thư dạ dày, ung thư kết-trực tràng, ung thư tế bào gan, ung thư tụy, ung thư tuyến tiền liệt, tế bào bệnh bạch cầu, tế bào ung thư vú, caxinom tế bào Merkel, u melanin, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư tử cung, ung thư túi mật và ống mật chủ và ung thư thực quản.

Theo một số phương án, thụ thể TCR được liên hợp với chất có hoạt tính điều trị. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất có hoạt tính điều trị” để chỉ hợp chất được dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh không mong muốn. Theo một phương án, chất có hoạt tính điều trị này được dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư. Theo một số phương án chất có hoạt tính điều trị này được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, chất hóa trị liệu, và độc tố.

Các thụ thể TCR, axit nucleic và tế bào chủ theo sáng chế, và được phẩm chứa chúng, có thể được sử dụng cho đối tượng cần điều trị qua các đường đã biết

trong lĩnh vực này, và có thể thay đổi tùy theo loại bệnh ung thư cần được điều trị. Các đường sử dụng bao gồm, ví dụ, sử dụng qua đường khu trú (như trong khối u) và sử dụng ngoài đường tiêu hóa như dưới da, trong màng bụng, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong rãnh ngang gan và trong gan. Theo một phương án được ưu tiên, các thụ thể TCR, axit nucleic hoặc tế bào chủ theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa chúng, được sử dụng cho đối tượng bằng cách tiêm truyền tại chỗ, ví dụ, bằng cách sử dụng bơm tiêm truyền và/hoặc hệ thống ống thông, đến vị trí cần được điều trị, như khối u dạng rắn. Theo một phương án, được phẩm theo sáng chế được tiêm truyền vào khối u dạng rắn, mạch máu nuôi dưỡng khối u dạng rắn, và/hoặc vùng xung quanh khối u dạng rắn này.

Theo các phương án được ưu tiên, được phẩm theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng bằng cách sử dụng chế độ dùng liều ít nhất hai lần, mỗi lần cách nhau ít nhất 24 giờ. Các chế độ dùng liều thích hợp để sử dụng được phẩm theo sáng chế bao gồm, ví dụ, mỗi ngày một lần, hai ngày một lần, và ba ngày một lần. Các chế độ dùng liều được ưu tiên hơn bao gồm mỗi tuần một lần, mỗi tuần hai lần, hai tuần một lần, mỗi tháng một lần, và mỗi tháng hai lần. Theo các phương án cụ thể, chế độ tăng liều dùng được sử dụng, trong đó chuỗi các liều tăng dần được sử dụng cho đối tượng trong khoảng thời gian theo ngày, theo tuần hoặc theo tháng.

Các liều dùng hữu hiệu của tế bào chủ biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế bao gồm, ví dụ, ít nhất khoảng 10^4 , ít nhất khoảng 10^5 , ít nhất khoảng 10^6 , ít nhất khoảng 10^7 , ít nhất khoảng 10^8 , ít nhất khoảng 10^9 , và ít nhất 10^{10} tế bào chủ/liều dùng. Theo một phương án, các tế bào chủ theo sáng chế được sử dụng với liều dùng nằm trong khoảng từ khoảng 10^4 đến khoảng 10^{10} tế bào/liều dùng, tốt hơn là với liều dùng nằm trong khoảng từ khoảng 10^5 đến khoảng 10^9 tế bào/liều dùng. Theo các phương án được ưu tiên, các liều dùng được sử dụng với chế độ dùng liều theo liệu trình gồm ít nhất hai hoặc nhiều chu kỳ dùng liều.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước sử dụng thụ thể TCR, axit nucleic, hoặc tế bào chủ theo sáng chế kết hợp với ít nhất một chất hóa trị liệu và/hoặc liệu pháp xạ trị.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng cần điều trị, bao gồm các bước:

- a) phân lập tế bào từ đối tượng nêu trên;
- b) biến nạp tế bào bằng ít nhất một vector mã hóa thụ thể TCR theo sáng chế để tạo ra tế bào được biến nạp;
- c) mở rộng tế bào đã biến nạp này để tạo ra nhiều tế bào được biến nạp; và
- d) sử dụng các tế bào đã biến nạp cho đối tượng nêu trên.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng cần điều trị, bao gồm các bước:

- a) phân lập tế bào từ người cho khỏe mạnh;
- b) biến nạp tế bào bằng vector mã hóa thụ thể TCR theo sáng chế để tạo ra tế bào được biến nạp;
- c) mở rộng tế bào đã biến nạp này để tạo ra nhiều tế bào được biến nạp; và
- d) sử dụng các tế bào đã biến nạp cho đối tượng nêu trên.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp phát hiện bệnh ung thư ở mẫu sinh học, bao gồm các bước:

- a) cho mẫu sinh học tiếp xúc với thụ thể TCR theo sáng chế;
- b) phát hiện sự gắn kết của thụ thể TCR với mẫu sinh học.

Theo một số phương án, phương pháp phát hiện bệnh ung thư được tiến hành *in vitro*, *in vivo* hoặc tại chỗ.

Sáng chế còn đề cập đến các protein của gen đánh dấu và dấu ấn sinh học cụ thể trên cơ sở peptit theo bản mô tả này, được gọi ở đây là “đích” có thể được sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc tiên lượng bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng các đích mới này để điều trị bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thụ thể tế bào T hòa tan (sTCR) nhận biết phức hợp peptit-MHC đặc hiệu. Các thụ thể tế bào T hòa tan này có thể được tạo ra từ các dòng vô tính của tế bào T đặc hiệu, và ái lực của chúng có thể được tăng lên bằng cách gây đột biến hướng đích là các vùng quyết định tính hỗ trợ. Nhằm mục đích chọn lọc thụ thể tế bào T, sự biểu hiện thể thực khuẩn có thể được sử dụng (Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2010/0113300 (Liddy *et al.*, 2012)). Nhằm mục đích làm ổn định các thụ thể tế bào T trong khi biểu hiện thể thực khuẩn và trong trường hợp sử dụng trên thực tế làm được chất, chuỗi alpha và beta có thể được liên kết, ví dụ, bằng các liên kết disulfua không tự

nhiên, các liên kết cộng hóa trị khác (thụ thể tế bào T chuỗi đơn), hoặc bằng các miền dime hóa (Boulter *et al.*, 2003; Card *et al.*, 2004; Willcox *et al.*, 1999). Thụ thể tế bào T có thể được liên kết với độc tố, dược chất, xytokin (ví dụ, xem công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2013/0115191), hoặc các vùng tập hợp các tế bào hiệu ứng như vùng kháng CD3, v.v., để thực hiện chức năng cụ thể trên các tế bào đích. Theo khía cạnh khác, nó được biểu hiện ở các tế bào T dùng để chuyển mượn. Ví dụ, xem các công bố đơn quốc tế số WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1, và WO 2013/057586A1, các tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Ngoài ra, các peptit và/hoặc thụ thể TCR hoặc kháng thể hoặc các phân tử gắn kết khác theo sáng chế có thể được sử dụng để kiểm tra sự chẩn đoán bệnh ung thư của chuyên gia bệnh học trên cơ sở mẫu sinh thiết.

Các kháng thể hoặc thụ thể TCR cũng có thể được sử dụng cho các thử nghiệm chẩn đoán *in vivo*. Nói chung, kháng thể được đánh dấu bằng nucleotit phóng xạ (như ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P hoặc ^{35}S) sao cho khối u có thể được cố định bằng cách sử dụng phương pháp chụp hình miễn dịch nhấp nháy. Theo một phương án, các kháng thể hoặc đoạn kháng thể gắn kết với vùng ngoại bào của hai hoặc nhiều đích của protein được chọn từ nhóm bao gồm các protein nêu trên, và giá trị ái lực (Kd) nhỏ hơn $1 \times 10\mu\text{M}$.

Các kháng thể hoặc thụ thể TCR dùng để chẩn đoán có thể được đánh dấu bằng đoạn dò thích hợp để phát hiện bằng các phương pháp chụp hình ảnh khác nhau. Các phương pháp để phát hiện đoạn dò bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp huỳnh quang, phương pháp chiếu ánh sáng, phương pháp hiển vi electron và confocal; phương pháp chụp cộng hưởng từ và phương pháp quang phổ; phương pháp nội soi huỳnh quang, phương pháp chụp ảnh cắt lớp vi tính và phương pháp chụp ảnh cắt lớp bằng bức xạ positron. Các đoạn dò thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, fluorescein, rhodamin, eosin và các nhóm huỳnh quang khác, chất đồng vị phóng xạ, vàng, gadolini và các hợp chất lanthanit khác, sắt thuận từ, flo-18 và các chất đồng vị phóng xạ phát ra positron khác. Ngoài ra, các đoạn dò có thể là đoạn dò hai chức năng hoặc đa chức năng và có thể phát hiện được bằng nhiều hơn một trong số các phương pháp đã liệt kê. Các kháng thể này

và/hoặc thụ thể TCR có thể được đánh dấu trực tiếp hoặc gián tiếp bằng các đoạn dò nêu trên. Sự liên kết của đoạn dò với kháng thể và/hoặc thụ thể TCR bao gồm sự liên kết cộng hóa trị với đoạn dò, sự kết hợp đoạn dò vào kháng thể hoặc thụ thể TCR, và sự liên kết cộng hóa trị của hợp chất chelat hóa để gắn kết đoạn dò, ngoài các liên kết khác đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Để sử dụng trong hóa mô miễn dịch, mẫu mô bệnh có thể là mẫu mới hoặc được đông lạnh hoặc có thể gắn trong parafin và cố định với chất bảo quản như formalin. Phần chứa mẫu được cố định hoặc gắn được cho tiếp xúc với kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp đã được đánh dấu, trong đó kháng thể này được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện của các protein tại chỗ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chế độ dị phản ứng có thể được sử dụng để phá vỡ sự dung nạp bản thân và tạo ra các tế bào T có ái lực cao hơn khi so sánh với các tế bào T có nguồn gốc từ nguồn tự thân, nghĩa là bệnh nhân. Ví dụ về các nguồn này bao gồm sự tạo ra các tế bào T *in vitro* đặc hiệu peptit, có khả năng phản ứng với dị kháng nguyên HLA (Sadovnikova *et al.* 1998; Savage *et al.* 2004; Wilde *et al.* 2012), và sự gây miễn dịch cho chuột chuyển gen dùng cho phức hợp MHC của người hoặc thụ thể TCR của người (Stanislawski *et al.* 2001; Li *et al.* 2010).

Ví dụ 1

Tạo ra các tế bào T đặc hiệu peptit, có khả năng phản ứng với dị kháng nguyên HLA *in vitro* (Savage *et al.* 2004)

Các tế bào PBMC từ người cho khỏe mạnh dương tính với HLA-A*02 và âm tính với HLA-A*02 được sử dụng sau khi có sự đồng ý của người tham gia. Các monome HLA-A2 nhóm I được biotinyl hóa tái tổ hợp và tetrame phát huỳnh quang A2 chứa IGF2BP3-001 thu được từ MBLI (Woburn, MA). Các tế bào PBMC được ủ với protein kháng CD20SA được pha loãng trong nước muối đệm phosphat (PBS) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, được rửa, và ủ với các monome A2/IGF2BP3-001 biotinyl hóa trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, được rửa và đàn mỏng với mật độ 3×10^6 tế bào/lỗ trong đĩa có 24 lỗ trong môi trường RPMI

chứa huyết thanh AB của người 10%. Intolokin 7 (IL-7; R&D Systems, Minneapolis, MN) được cho thêm vào ngày 1 với lượng 10 ng/ml và IL-2 (Chiron, Harefield, Vương Quốc Anh) được cho thêm với lượng 10 U/ml vào ngày 4. Trong khoảng thời gian 5 tuần, các tế bào được tái kích thích hàng tuần bằng các tế bào PBMC mới, được trộn với các tế bào đáp ứng theo tỷ lệ 1:1, và được đàn mỏng với mật độ 3×10^6 /lỗ trong các đĩa có 24 lỗ.

Đề thu được các tế bào T có ái lực cao, ử khoảng 10^6 tế bào PBMC với tetrame HLA-A2/IGF2BP3-001-phycoerythrin (PE) (thu được từ MBLI) trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C , sau đó ử với với kháng thể kháng CD8-isothioxyanat floresxein (fluorescein isothiocyanate: FITC)/allophycoxyanin (allophycocyanin: APC) trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C , sau đó ử với thiết bị phân tích- phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS)—Calibur. Việc phân loại được thực hiện với thiết bị FACS-Vantage (Becton Dickinson, Cowley, Oxford, Vương Quốc Anh). Các tế bào dương tính với tetrame đã phân loại được mở rộng trong các đĩa có 24 lỗ bằng cách sử dụng trong mỗi lỗ: 2×10^5 tế bào đã phân loại, 2×10^6 tế bào PBMC âm tính với A2 đã chiếu xạ làm tế bào tiếp liệu, 2×10^4 CD3/CD28 hạt/ml (Dynal, Oslo Norway), và IL-2 (1000 U/mL). Sau đó, các tế bào T có ái lực cao thu được được sử dụng để nhận biết và phân lập các thụ thể TCR bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, như phương pháp khuếch đại nhanh các đầu tận cùng của ADN bổ trợ (Rapid Amplification of cDNA End: RACE) ở đầu 5' của đơn bào. Tiếp đó, các ADN của thụ thể TCR không dư thừa được phân tích để xác định trình tự của axit amin/ADN và tách dòng vào các vector biểu hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Ví dụ 2: tách dòng thụ thể TCR

Các phương pháp tách dòng thụ thể TCR là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 8.519.100, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó về các phương pháp nêu trên. Oligonucleotit A1 đặc hiệu với trình tự vùng biến đổi của chuỗi alpha (ggaattccatatgagtcacaaggagaagaagatcc SEQ ID NO:22) mã hóa vị trí giới hạn NdeI, methionin được đưa vào để khơi mào hữu hiệu sự biểu hiện ở vi khuẩn, và

oligonucleotit A2 đặc hiệu với trình tự vùng ổn định alpha (ttgtcagtcgacttagagtctctcagctggtacacg SEQ ID NO:23) mã hóa vị trí giới hạn Sall được dùng để khuếch đại vùng biến đổi của chuỗi alpha. Trong trường hợp chuỗi beta, oligonucleotit B1 đặc hiệu với trình tự vùng biến đổi của chuỗi beta (tctctcatatggatgggtgaattactcaatcccaa SEQ ID NO:24) mã hóa vị trí giới hạn NdeI, methionin được đưa vào để khơi mào hữu hiệu sự biểu hiện ở vi khuẩn, và oligonucleotit B2 đặc hiệu với trình tự vùng ổn định beta (tagaaaccggtggccaggcacaccagtgtggc SEQ ID NO:25) mã hóa vị trí giới hạn AgeI được dùng để khuếch đại vùng biến đổi của chuỗi beta.

Các trình tự ADN mã hóa chuỗi alpha của thụ thể TCR được cắt bằng các enzym NdeI và Sall được gắn vào vector pGMT7+C α , vector này được cắt bằng các enzym NdeI và XhoI. Các trình tự ADN mã hóa chuỗi beta của thụ thể TCR được cắt bằng các enzym NdeI và AgeI được gắn vào vector pGMT7+C β riêng biệt, vector này cũng được cắt bằng các enzym NdeI và AgeI. Các plasmit đã gắn được biến nạp vào các tế bào của chủng *Escherichia coli* XL1-blue thích hợp và được đàn mỏng trên các đĩa thạch/LB chứa ampicillin nồng độ 100 μ g/ml. Sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C, các khuẩn lạc đơn được thu hoạch và phát triển trong 10ml LB chứa ampicillin nồng độ 100 μ g/ml qua đêm ở nhiệt độ 37°C kèm theo lắc. Các plasmit đã tách dòng được tinh chế bằng cách sử dụng kit Miniprep (Qiagen) và đoạn chèn được giải trình tự bằng cách sử dụng thiết bị giải trình tự ADN tự động (Lark Technologies).

Thụ thể TCR R10P1A7 mã hóa chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR đặc hiệu khối u, được phân lập và khuếch đại từ các tế bào T của người cho khỏe mạnh. Các tế bào từ người cho khỏe mạnh được kích thích *in vitro* theo phương pháp được mô tả trong tài liệu: Walter *et. al.* 2003. Các tế bào đặc hiệu đích là đơn bào được phân loại bằng cách sử dụng các multimer đặc hiệu đích để phân lập thụ thể TCR sau đó. Các trình tự của thụ thể TCR được phân lập bằng phương pháp 5' RACE theo các phương pháp chuẩn như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Molecular Cloning a laboratory manual fourth edition by Green and Sambrook. Thụ thể TCR R10P1A7 được phân lập từ người cho âm tính với HLA-A2. Các vùng biến đổi alpha và beta của các thụ thể TCR R20P1H7, R7P1D5 và R10P2G12

được giải trình tự

Miền biến đổi alpha của thụ thể thụ thể TCR R10P1A7 được phát hiện là có trình tự axit amin tương ứng với các gốc từ 22 đến 130 của trình tự SEQ ID NO:2. Miền biến đổi beta của thụ thể TCR R10P1A7 được phát hiện là có trình tự axit amin tương ứng với các gốc từ 26 đến 139 của trình tự SEQ ID NO:10.

Sự biểu hiện thể thực khuẩn có thể được sử dụng để tạo ra thư viện của các biến thể của thụ thể TCR để nhận biết các thể đột biến có ái lực cao. Sự biểu hiện thể thực khuẩn của thụ thể TCR và các phương pháp sàng lọc được mô tả trong tài liệu: Li *et al.*, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) có thể được áp dụng cho thụ thể TCR tham chiếu được chọn từ các thụ thể TCR được mô tả trong Bảng 1.

Ví dụ, cả ba vùng CDR của trình tự chuỗi alpha của SEQ ID NO:2 và cả ba vùng CDR của trình tự chuỗi beta của SEQ ID NO:10 có thể được hướng đích bằng cách gây đột biến, và mỗi thư viện CDR được phân loại và sàng lọc riêng biệt.

Theo đó, các thụ thể TCR có ái lực và/hoặc chu kỳ bán hủy gắn kết gấp ít nhất hai lần của thụ thể TCR tham chiếu (và do đó cũng gấp ít nhất hai lần của thụ thể TCR nguyên thể) có thể được nhận biết.

Các dị dime thụ thể TCR được cuộn gấp lại bằng cách sử dụng phương pháp bao gồm bước đưa xystein vào vùng ổn định để tạo ra liên kết disulfua nhân tạo giữa các chuỗi. Theo cách này, các thụ thể TCR được tạo ra, gồm (a) chuỗi beta của thụ thể TCR tham chiếu, cùng với các chuỗi alpha được đột biến; (b) chuỗi alpha của thụ thể TCR tham chiếu cùng với các chuỗi beta được đột biến; và (c) các tổ hợp khác nhau của chuỗi beta và chuỗi alpha bao gồm cả các miền biến đổi của thể đột biến.

Sự tương tác giữa các thụ thể TCR có liên kết disulfua hòa tan với ái lực cao, và các biến thể của thụ thể TCR, và phức hợp peptit nguyên thể KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1) HLA có thể được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp BIAcore.

Các biến thể TCR có ái lực cao cũng có thể được chọn từ thư viện của các thể đột biến CDR theo sự biểu hiện của nấm men hoặc tế bào T (Holler *et al.* 2003; Chervinet *et al.* 2008). Do đó, các biến thể của thụ thể TCR ứng viên cung cấp hướng dẫn để thiết kế các đột biến vùng CDR của thụ thể TCR để thu được các biến thể TCR có ái lực cao (Robbins *et al.* 2008; Zoete *et al.* 2007).

Ví dụ 3: thiết kế tế bào T tự thân

Các tế bào T có thể được thiết kế để biểu hiện các thụ thể TCR có ái lực cao (còn được gọi là liệu pháp thụ thể TCR) hoặc các thụ thể kháng nguyên thể khảm (chimeric antigen receptor: CAR) có nguồn gốc từ protein dung hợp có độ đặc hiệu kháng nguyên với phức hợp MHC I/IGF2BP3-001 hoặc phức hợp MHC II/IGF2BP3-001 tăng lên. Theo một khía cạnh, phương pháp này khắc phục được một số hạn chế có liên quan với mức độ dung nạp trung tâm và ngoại biên, và tạo ra các tế bào T sẽ có hiệu quả hơn trong việc hướng đích khối u mà không cần hoạt hóa tế bào T *de novo* ở bệnh nhân.

Theo một khía cạnh, để thu được tế bào T biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế, axit nucleic mã hóa chuỗi alpha-TCR và/hoặc chuỗi beta-TCR đặc hiệu khối u được nhận biết và phân lập, như được mô tả trong các ví dụ 1 và 2, được tách dòng vào các vector biểu hiện, như gama retrovirus hoặc lentivirus. Các virus tái tổ hợp được tạo ra và sau đó được thử nghiệm về mặt chức năng, như độ đặc hiệu kháng nguyên và ái lực chức năng. Sau đó, phần phân ước của sản phẩm cuối được sử dụng để tải nạp quần thể tế bào T đích (thường được tinh chế từ các tế bào PBMC của bệnh nhân), quần thể này được mở rộng trước khi tiêm truyền vào bệnh nhân.

Theo khía cạnh khác, để thu được các tế bào T biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế, ARN của thụ thể TCR được tổng hợp bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, các hệ phiên mã *in vitro*. Sau đó, các ARN của thụ thể TCR tổng hợp được *in vitro* được đưa vào các tế bào T CD8⁺ sơ cấp được lấy từ người cho khỏe mạnh bằng cách gây xung điện để biểu hiện lại chuỗi alpha-TCR và/hoặc chuỗi beta-TCR đặc hiệu khối u.

Để xác định xem các thụ thể TCR ngoại sinh có được biểu hiện chức năng trên bề mặt tế bào của các tế bào T đã biến nạp hay không, kỹ thuật nhuộm tetrame được sử dụng để phát hiện các tế bào T gắn kết với MHC/IGF2BP3-001. Như được thể hiện trên Fig.5 và trong Bảng 2, quan sát được tỷ lệ % quần thể tế bào T đặc hiệu dương tính với CD3 cao hơn, nghĩa là 6,78%, ở các tế bào T CD8⁺ biểu hiện thụ thể TCR theo mức độ nhuộm tetrame MHC/IGF2BP3-001 được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang so với các tetrame MHC/peptit không liên quan (ví dụ,

NYESO1-001), ví dụ, 1,53%, hoặc đối chứng giả, ví dụ, 1,73%. Để làm đối chứng, các tế bào T CD8+ sơ cấp được biến nạp với thụ thể TCR đối chứng, TCR 1G4, đã được biết là gắn kết đặc hiệu với phức hợp MHC/NYESO1-001, được phát hiện dễ dàng bởi tetrame MHC/NYESO1-001, nghĩa là 17,69%. Các kết quả này cho thấy rằng thụ thể TCR R10P1A7 được biểu hiện trên bề mặt tế bào T và có thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp MHC/IGF2BP3-001. Các chuỗi alpha và beta của thụ thể TCR 1G4 được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:21 tương ứng:

Chuỗi alpha của thụ thể 1G4 (SEQ ID NO:20):

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTPQAALSVPEGENLVNCSFTDS
AIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLDKSSGRSTLYIAAS
QPGDSATYLCAVRPTSGGSYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPDPVYQLRDSKSS
DKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK
SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRI
LLKVAGFNLLMTLRLWSS

Chuỗi beta của thụ thể 1G4 (SEQ ID NO:21):

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQD
MNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPL
RLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFE
PSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKE
QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK
PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSAL
VLMAMVKRKDSRG

Để xác định độ đặc hiệu và ái lực của các thụ thể TCR, các tế bào T CD8+ đã biến nạp được ủ đồng thời với các tế bào đích được tải IGF2BP3-001 hoặc các tế bào đích được tải peptit tương đồng nhưng không liên quan CLUA-001 (SEQ ID NO:26), CHCHD6-001 (SEQ ID NO:27), CDC42BPG-001 (SEQ ID NO:28), PARP14-002 (SEQ ID NO:29), SYNE2-001 (SEQ ID NO:30), IFT7-001 (SEQ ID NO:31), DHRS12-001 (SEQ ID NO:32), STX12-001 (SEQ ID NO:33), EEA-001

(SEQ ID NO:34), SENP7-001 (SEQ ID NO:35), hoặc peptit đối chứng NYESO1-001 (SEQ ID NO:36), sau đó tiến hành thử nghiệm giải phóng IFN- γ . Các các tế bào đích không được tải và riêng các tế bào T CD8+ được dùng làm đối chứng. Sự tiết ra IFN- γ từ các tế bào T CD8+ là dấu hiệu của sự hoạt hóa tế bào T có hoạt tính gây độc tế bào.

Bảng 2

Mã số thụ thể TCR	Người cho/HLA-A2 (+ hoặc -)	IFN γ (pg/ml)	Nồng độ EC50	Tỷ lệ % tế bào T CD8+ sơ cấp dương tính với IGF2BP3-001 TET	Tỷ lệ % tế bào T CD8+ sơ cấp dương tính với NYESO1-001 TET
R10P1A7	HBC-688/(-)	175	~1 nM	6.78	1.53

Như được thể hiện trên Fig.6, các tế bào T CD8+ sơ cấp được gây xung điện bằng ARNA mã hóa thụ thể TCR R10P1A7 của sáng chế, sau khi ủ đồng thời với các tế bào đích được tải IGF2BP3-001, nồng độ IFN- γ được giải phóng cao hơn nhiều so với các tế bào được kích thích bằng các tế bào đích được tải peptit đối chứng, và các đối chứng. Phép phân tích chuẩn độ peptit đích cho thấy nồng độ EC50 bằng khoảng 1nM (Bảng 2). Các kết quả này gợi ý rằng thụ thể TCR R10P1A7 theo sáng chế có thể hoạt hóa hoạt tính gây độc tế bào của tế bào T, ví dụ, sự giải phóng IFN- γ , nhờ sự tương tác đặc hiệu với phức hợp MHC/IGF2BP3-001.

Để xác định motif gắn kết của thụ thể TCR R10P1A7 đối với phức hợp MHC/IGF2BP3-001, phép phân tích sàng lọc alanin theo vị trí được thực hiện ở mỗi axit amin trong số 9 axit amin của peptit IGF2BP3-001. Các peptit IGF2BP3-001 được thế bằng alanin được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Vị trí:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IGF2BP3-001 (SEQ ID NO:1)	K	I	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A1 (SEQ ID NO:37)	A	I	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A2 (SEQ ID NO:38)	K	A	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A3 (SEQ ID NO:39)	K	I	A	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A4 (SEQ ID NO:40)	K	I	Q	A	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A5 (SEQ ID NO:41)	K	I	Q	E	A	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A6 (SEQ ID NO:42)	K	I	Q	E	I	A	T	Q	V
IGF2BP3-001 A7 (SEQ ID NO:43)	K	I	Q	E	I	L	A	Q	V
IGF2BP3-001 A8 (SEQ ID NO:44)	K	I	Q	E	I	L	T	A	V
IGF2BP3-001 A9 (SEQ ID NO:45)	K	I	Q	E	I	L	T	Q	A

Tóm lại, các tế bào T CD8⁺ được biến nạp với thụ thể TCR R10P1A7 được ủ đồng thời với các tế bào đích được tải IGF2BP3-001, từ IGF2BP3-001-A1 đến IGF2BP3-001-A9, hoặc peptit đối chứng NYESO1-001, sau đó, tiến hành thử nghiệm giải phóng IFN γ như đã mô tả trên đây.

Kết quả của phép phân tích sàng lọc alanin theo vị trí đối với thụ thể TCR R10P1A7 được thể hiện trên Fig.7, và được tóm tắt trong Bảng 4.

Bảng 4

TCR	Các vị trí IGF2BP3-001 có thể gắn kết thụ thể TCR
R10P1A7	1, 3-7

Việc sàng lọc các peptit gắn kết với A*02 trong hệ gen rộng đối với thụ thể TCR R10P1A7 có motif giống hệt cho thấy các peptit không có khả năng phản ứng chéo. Các kết quả này gợi ý rằng thụ thể TCR được mô tả ở đây có kiểu nhận biết rất đặc hiệu với nguy cơ tác động ngoài đích giảm.

Để xác định hiệu quả của các tế bào T biểu hiện thụ thể TCR được mô tả ở đây, các tế bào T CD8⁺ sơ cấp được gây xung điện bằng ARN của thụ thể TCR R10P1A7 được ủ đồng thời với các dòng tế bào ung thư của người khác nhau, ví dụ, A-375 (dòng tế bào u melanin của người) và T98G (dòng tế bào u nguyên bào xộp của người), các dòng này dương tính với HLA-A2 và dương tính với IGF2BP3-001 (đích), và SK-BR-3 (dòng tế bào ung thư vú của người), dòng này âm tính với HLA-A2- và âm tính với IGF2BP3-001, sau đó, tiến hành thử nghiệm giải phóng IFN γ .

Như được thể hiện trên Fig.8, quan sát được sự giải phóng IFN γ ở cả tế bào A-375 và T98G, các tế bào này dương tính với HLA-A2 và dương tính với IGF2BP3-001, nhưng không giải phóng trong các tế bào SK-BR-3, các tế bào này có sự giải phóng IFN γ ở mức cơ bản tương đương với sự giải phóng của chỉ riêng tế bào hiệu ứng làm đối chứng. Các kết quả này cho thấy rằng các tế bào T biểu hiện thụ thể TCR R10P1A7 có thể tạo ra hoạt tính gây độc tế bào hướng đích tế bào ung thư theo cách đặc hiệu HLA-A2/IGF2BP3-001.

Sáng chế đề xuất các thụ thể TCR hữu ích để điều trị các bệnh ung thư/khối u, tốt hơn nếu u melanin và u nguyên bào xộp biểu hiện quá mức hoặc chỉ biểu hiện IGF2BP3-001.

Ví dụ 5: Thiết kế tế bào T khác alen cùng loài

Các tế bào T gama delta ($\gamma\delta$), là các tế bào lymphô T không thông thường liên quan đến hàng rào bảo vệ đầu tiên chống lại mầm bệnh, có thể tương tác với và tiêu diệt các tế bào khối u theo cách không phụ thuộc phức hợp MHC bằng cách

hoạt hóa các thụ thể, ngoài các yếu tố khác, chuỗi delta-TCR và chuỗi gama-TCR. Các tế bào T $\gamma\delta$ này biểu hiện kiểu hình đã được hoạt hóa sơ bộ để cho phép nhanh chóng tạo ra xytokin (IFN- γ , TNF- α) và đáp ứng gây độc tế bào mạnh khi hoạt hóa. Các tế bào T này có hoạt tính kháng u đối với nhiều bệnh ung thư và gợi ý rằng có thể tiến hành liệu pháp miễn dịch qua trung gian tế bào T $\gamma\delta$ và có thể tạo ra sự đáp ứng với khối u mục tiêu (Brazaet *al.* 2013).

Các tiên bộ gần đây sử dụng các kháng nguyên đã cố định, các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies: mAbs) chủ vận, các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (artificial antigen presenting cell: aAPC) có nguồn gốc từ khối u, hoặc tổ hợp của kháng thể mAb và tế bào aAPC hoạt hóa đã thành công trong việc mở rộng các tế bào T gama delta với danh mục thụ thể TCR ít clon hoặc đa clon. Ví dụ, chuỗi liên quan A của phức hợp tương thích mô chính nhóm I đã cố định là tác nhân kích thích để các tế bào T $\gamma\delta$ biểu hiện isotyp TCR δ 1, và các kháng thể hoạt hóa gắn kết với đĩa đã mở rộng các tế bào V δ 1 và V δ 2 *ex vivo*. Lượng đủ về mặt lâm sàng của TCR δ 1, TCR δ 2, và TCR δ 1^{neg}TCR δ 2^{neg} được tạo ra sau khi nuôi cấy đồng thời trên tế bào aAPC, và các tiểu quần thể này biểu hiện sự khác biệt về kiểu hình ký ức và khả năng phản ứng với khối u *in vitro* và *in vivo*. (Denigeret *al.* 2014).

Ngoài ra, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể thay đổi để cải biến di truyền như được chứng minh bằng cách đưa vào của chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR (Hiasa *et al.* 2009). Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra các tế bào T $\gamma\delta$ biểu hiện chuỗi TCR-alpha và TCR-beta gắn kết với IGF2BP3-001. Nhằm mục đích này, các tế bào T $\gamma\delta$ được mở rộng bằng các phương pháp được mô tả trong tài liệu: Denigeret *al.* 2014, sau đó tải nạp các virus tái tổ hợp biểu hiện các thụ thể TCR gắn kết với IGF2BP3-001 (như được mô tả trong Ví dụ 3) thành các tế bào T $\gamma\delta$ được mở rộng. Sau đó, các tế bào T $\gamma\delta$ đã tải nạp virus được tiêm truyền vào bệnh nhân.

Phần bản luận về các tài liệu, bước, vật liệu, thiết bị, vật phẩm và sản phẩm tương tự được đưa vào bản mô tả này chỉ nhằm mục đích đưa ra ngữ cảnh cho sáng chế. Phần bản luận này không gợi ý hoặc thể hiện rằng nội dung bất kỳ hoặc toàn bộ nội dung của các tài liệu đã biết hoặc kiến thức phổ biến chung đã biết trong lĩnh

vực có liên quan đến sáng chế này là có trước ngày ưu tiên của mỗi điểm yêu cầu bảo hộ của đơn sáng chế này.

Trong toàn bộ phần mô tả và yêu cầu bảo hộ của bản mô tả này, thuật ngữ “bao gồm” hoặc các phương án của nó như "việc bao gồm" hoặc “có bao gồm”, không được dự định là loại trừ các chất phụ gia, thành phần, số nguyên hoặc bước khác.

Ví dụ 6: cấu trúc của lentivirut và phân tích mức độ biểu hiện

Tóm lại, hai cấu trúc thử nghiệm được tạo ra (“R10”). Sau đó, các cấu trúc này được sử dụng để tạo ra các dịch nổi bề mặt của lentivirut có chuẩn độ và khả năng sản sinh tốt. Sau đó, các dịch nổi bề mặt của lentivirut được dùng để tải nạp tế bào T sơ cấp (2 người cho) có mức độ biểu hiện bệnh sau đó của thụ thể TCR trên cơ sở sự gắn kết với tetrame được xác định bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

Bảng 5A: cấu trúc của lentivirut và đối chứng – người cho tương ứng như được thử nghiệm (các dòng trong bảng tương ứng với các cấu trúc)

		Tên	Lô số #	p24 (ng/ml) PN	qPCR HEK (TU/ml)	qPCR SUPT1 (TU/ml)	Thể tích để đạt được mức độ bội nhiễm 50% (MOI 50) (ul)
1863 R	IGF2B P3	MSCV- R10P1A7A- 2A-R10P1A7B- WPRE	0139- 0516- 230	35590	7,2E+09	1,3E+10	3,9
1864 R		MSCV- R10P1A7B-2A- R10P1A7A- WPRE	0139- 0516- 231	55724	9,7E+09	1,6E+10	3,2

VSV G- GFP	Đôi chứng	EF1a-GFP	0139- 0616- 250	62176	1,3E+09	8.21E+ 08	60,9
------------------	--------------	----------	-----------------------	-------	---------	--------------	------

			Người cho 1			
Tổng số tế bào ở thời điểm chảy	Khả năng sống	Tỷ lệ % CD3+	Tỷ lệ % CD3+ Tet+	Tỷ lệ % CD4+	Tỷ lệ % CD8+	Tỷ lệ % CD8+ Tet+
126234	99,36%	98,05	2,3	40,75	57,3	3,93
98272	99,08%	97,78	15,15	39,88	57,9	21,99
92038	95,70%	98,81	0,21			0,04

			Người cho 2			
Tổng số tế bào ở thời điểm chảy	Khả năng sống	Tỷ lệ % CD3+	Tỷ lệ % CD3+ Tet+	Tỷ lệ % CD4+	Tỷ lệ % CD8+	Tỷ lệ % CD8+ Tet+
132888	98,47	97,98	0,99	26,8	69,35	1,79
135418	98,74	98,01	8,12	29,47	71,2	11,72
104276	99,13	98,17	0	27,82	3,59	0,06

Tài liệu tham khảo

Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 589-601.

Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givél JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.

Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.

Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.

Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rughetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.

Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009).

Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.

Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.

Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a

5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.

Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.

Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.

Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.

Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.

Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.

Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, Parker AS, Leibovich BC, Jiang Z, Kwon ED (2008). External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 112, 1471-1479.

Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.

Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS ONE*. *10*, e0118927.

Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol*. *8*, 743-750.

Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* *109*, 568-575.

Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* *11*, 1809-1814.

Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int*. *2011*, 795239.

Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol*. *151*, 1213-1218.

Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* *118*, 696-703.

Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol*. *27*, 1255-1266.

Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H (2008). Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*.

Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.

Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosemberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.

Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.

Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.

Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.

Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.

Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H (2008). IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 21, 431-437.

Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). MHC Ligands and Peptide Motifs. (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).

Resnick MB, Sabo E, Kondratev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* *101*, 190-195.

Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* *64*, 443-449.

Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* *13*, 156.

Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* *51*, 870-880.

Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* *12*, 5442-5447.

Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* *68*, 105-110.

Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammanull mice. *Cancer Sci.* *103*, 17-25.

Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* *1*, 326-330.

Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.

Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Bühring HJ, Rammensee HG, Stevanović S. (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 171(10), 4974-8

Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.

Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.

Yantiss RK, Cosar E, Fischer AH (2008). Use of IMP3 in identification of carcinoma in fine needle aspiration biopsies of pancreas. *Acta Cytol.* 52, 133-138.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thụ thể tế bào T (T-cell receptor: TCR) bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta, trong đó chuỗi alpha chứa miền biến đổi alpha của thụ thể TCR bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ CDR1, CDR2, và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:2 hoặc các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 có một, hai hoặc ba sự thay thế axit amin so với các trình tự vùng CDR tương ứng của trình tự SEQ ID NO:2, và chuỗi beta chứa miền biến đổi beta của thụ thể TCR bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ CDR1, CDR2, và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:10 hoặc các vùng CDR1, CDR2, và CDR3 có một, hai hoặc ba sự thay thế axit amin so với các trình tự vùng CDR tương ứng của trình tự SEQ ID NO:10, và trong đó thụ thể TCR gắn kết đặc hiệu với phức hợp peptit IGF2BP3-001-phân tử MHC, trong đó peptit IGF2BP3-001 gồm trình tự SEQ ID NO:1, và trong đó thụ thể TCR gắn kết với các vị trí 1 và từ 3 đến 7 của peptit IGF2BP3-001 nêu trên.

2. Thụ thể TCR theo điểm 1, trong đó chuỗi alpha chứa miền biến đổi alpha của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 90% với miền biến đổi alpha của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:2 và trong đó chuỗi alpha của thụ thể TCR chứa các vùng quyết định tính bổ trợ CDR1, CDR2, và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:2, và chuỗi beta chứa miền biến đổi beta của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 90% với miền biến đổi beta của thụ thể TCR của trình tự SEQ ID NO:10 và trong đó chuỗi beta của thụ thể TCR chứa các vùng quyết định tính bổ trợ CDR1, CDR2, và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:10.

3. Thụ thể TCR theo điểm 1 hoặc 2, trong đó thụ thể này còn chứa miền ổn định alpha của thụ thể TCR và miền ổn định beta của thụ thể TCR, trong đó miền ổn định alpha của thụ thể TCR có mức độ giống ít nhất 70% với miền ổn định alpha của thụ thể TCR của SEQ ID NO:2, và miền ổn định beta có mức độ giống ít nhất 70% với miền ổn định beta của thụ thể TCR của SEQ ID NO:10.

4. Thụ thể TCR theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó

miền ổn định alpha chứa miền xuyên màng alpha có trình tự VIGFRILLKLVAGFNLLMTL (SEQ ID NO:18) và miền ổn định beta chứa miền xuyên màng beta có trình tự TILYEILLGKATLYAVLVSAVL (SEQ ID NO:19).

5. Thụ thể TCR theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó
 - a. chuỗi alpha và chuỗi beta được dung hợp để tạo thành thụ thể TCR chuỗi đơn;
 - b. chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta chứa nguyên tử đánh dấu có thể phát hiện; và/hoặc
 - c. chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta được liên hợp với chất có hoạt tính điều trị.

6. Thụ thể tế bào T bao gồm chuỗi gama và chuỗi delta, trong đó chuỗi gama chứa các vùng quyết định tính hỗ trợ CDR1, CDR2, và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:2; và/hoặc chuỗi delta của thụ thể TCR chứa các vùng quyết định tính hỗ trợ CDR1, CDR2, và CDR3 của trình tự SEQ ID NO:10, và trong đó thụ thể TCR gắn kết đặc hiệu với phức hợp peptit IGF2BP3-001-phân tử MHC, trong đó peptit IGF2BP3-001 gồm trình tự SEQ ID NO:1, và trong đó thụ thể TCR gắn kết với các vị trí 1 và từ 3 đến 7 của peptit IGF2BP3-001 nêu trên.

7. Vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta của thụ thể TCR theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc chuỗi gama và/hoặc chuỗi delta của thụ thể TCR theo điểm 6 được liên kết khi hoạt động với ít nhất một trình tự của gen khởi đầu.

8. Tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo điểm 7.

9. Tế bào chủ theo điểm 8, trong đó tế bào này là tế bào T hoặc tiền thân của tế bào T.

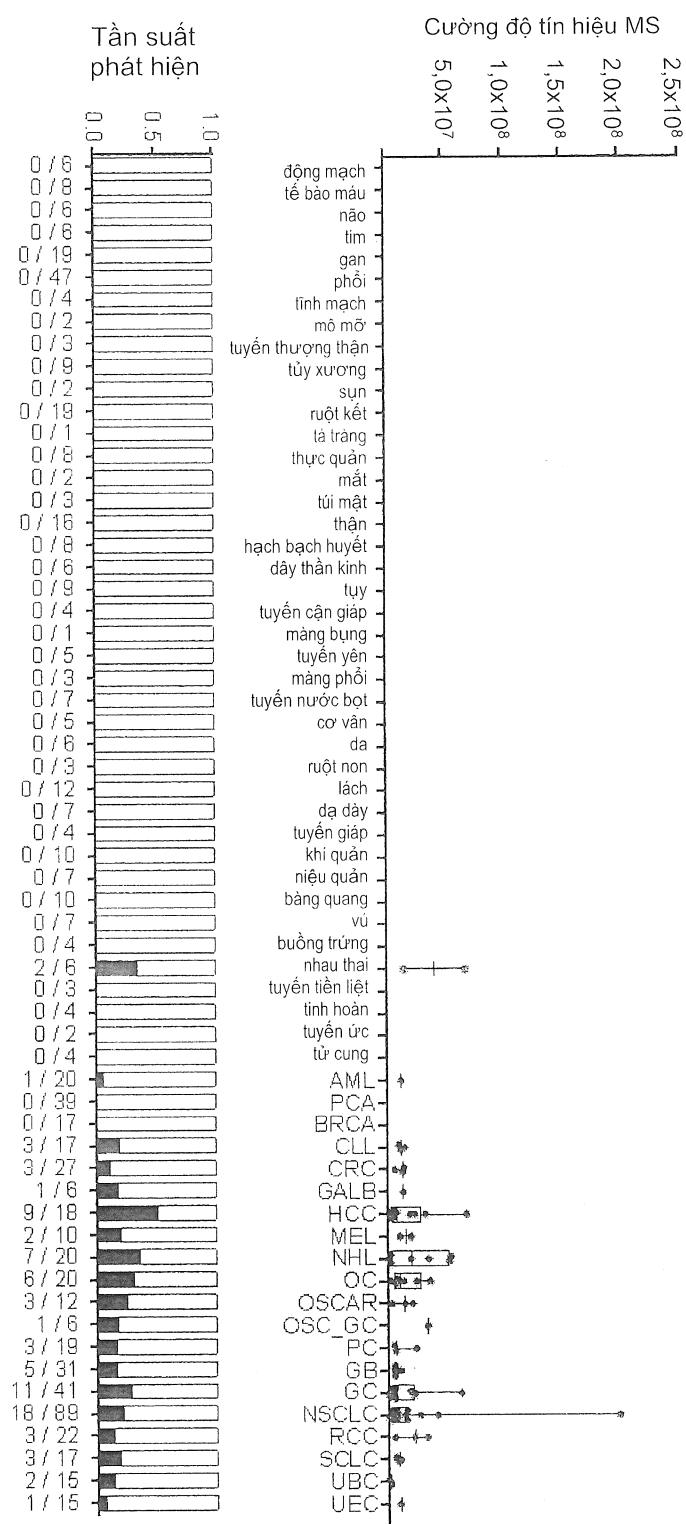
10. Dược phẩm chứa thụ thể TCR theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1

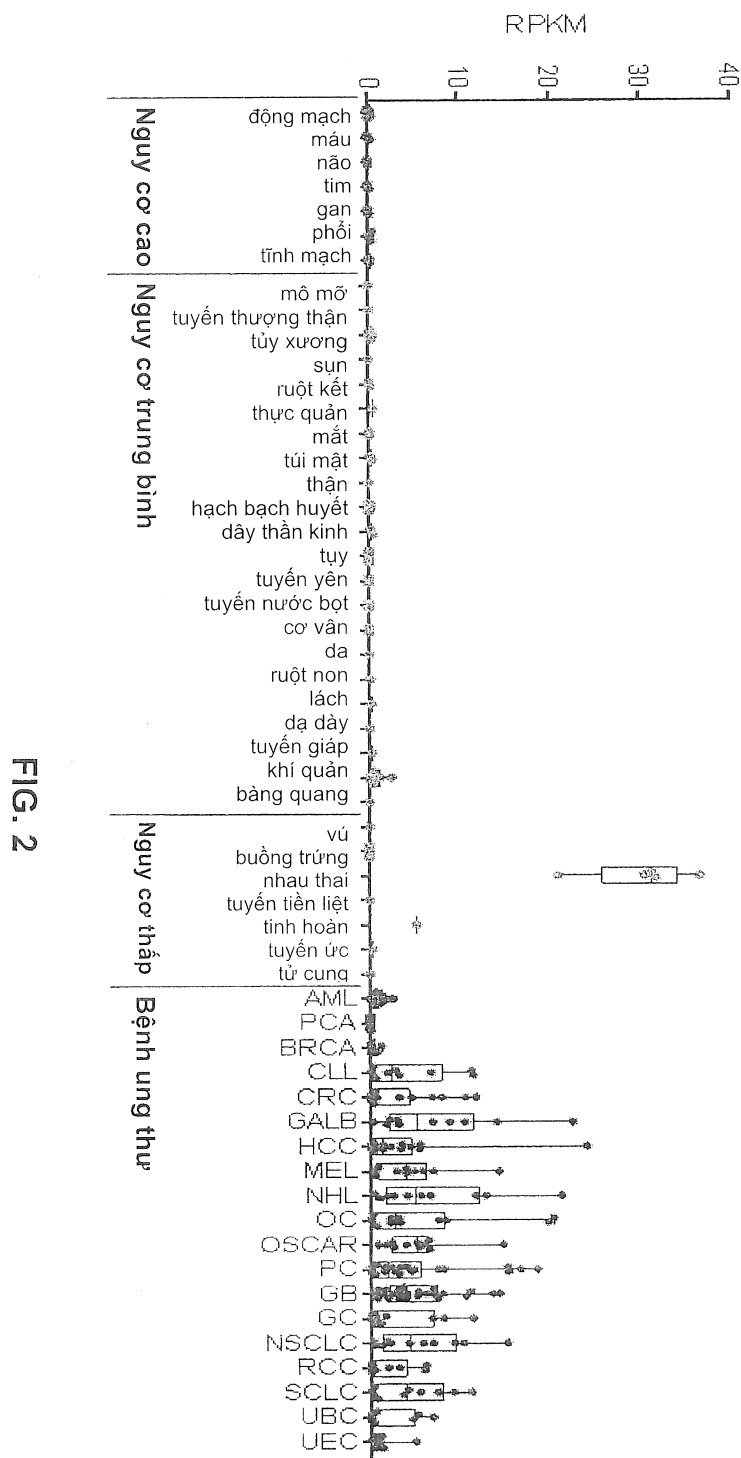
đến 6, vector biểu hiện theo điểm 7, và/hoặc tế bào chủ theo điểm 8 hoặc 9; và chất mang được dùng, và tùy ý, tá được và/hoặc chất ổn định được dùng.

11. Phương pháp tạo ra thụ thể TCR gắn kết đặc hiệu với peptit của SEQ ID NO:1 khi được biểu hiện bởi phân tử MHC, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 8 hoặc 9 trong các điều kiện thích hợp để kích thích sự biểu hiện của thụ thể TCR.

12. Thụ thể TCR theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó thụ thể này là thụ thể TCR hòa tan.

FIG. 1





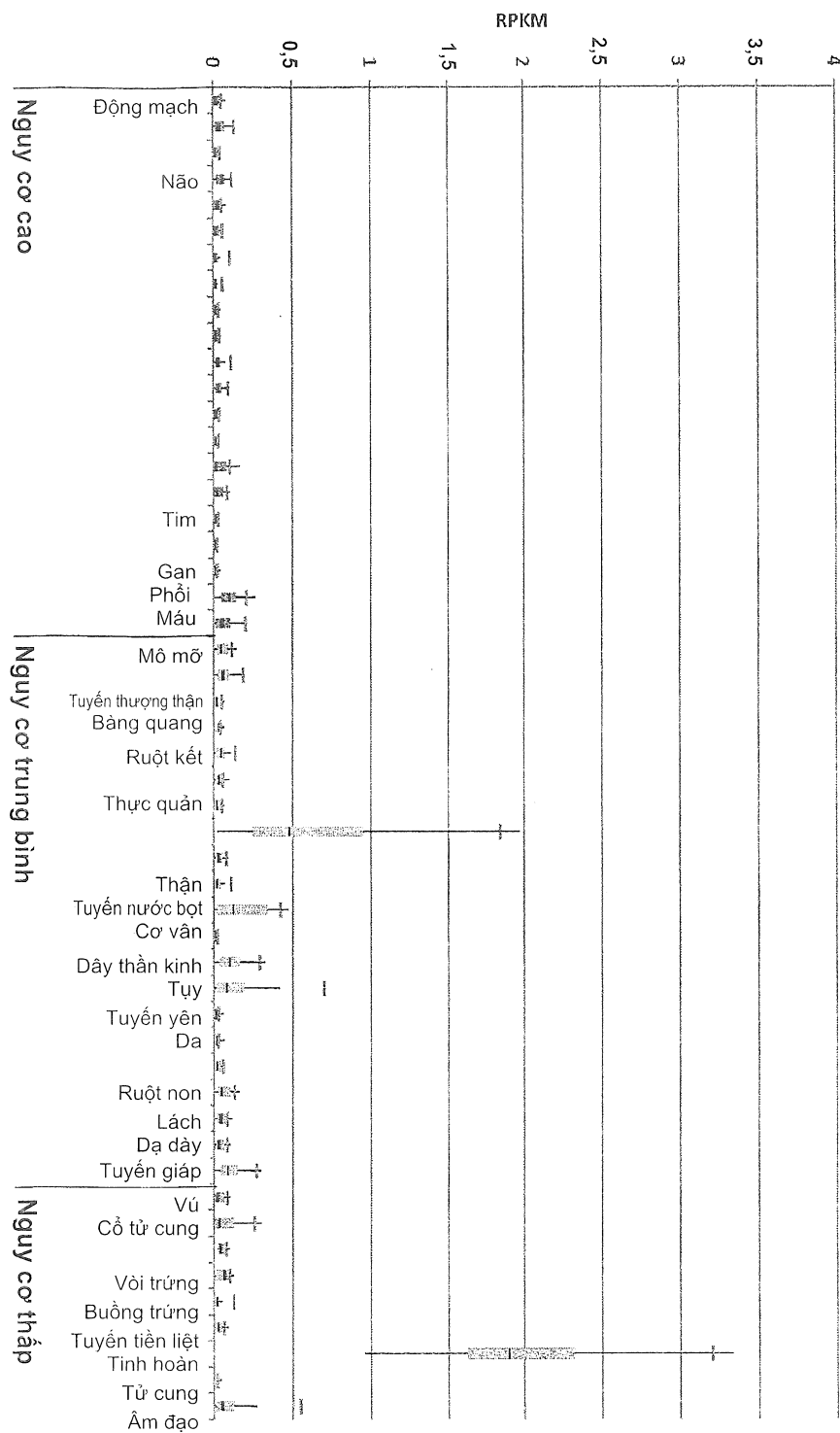
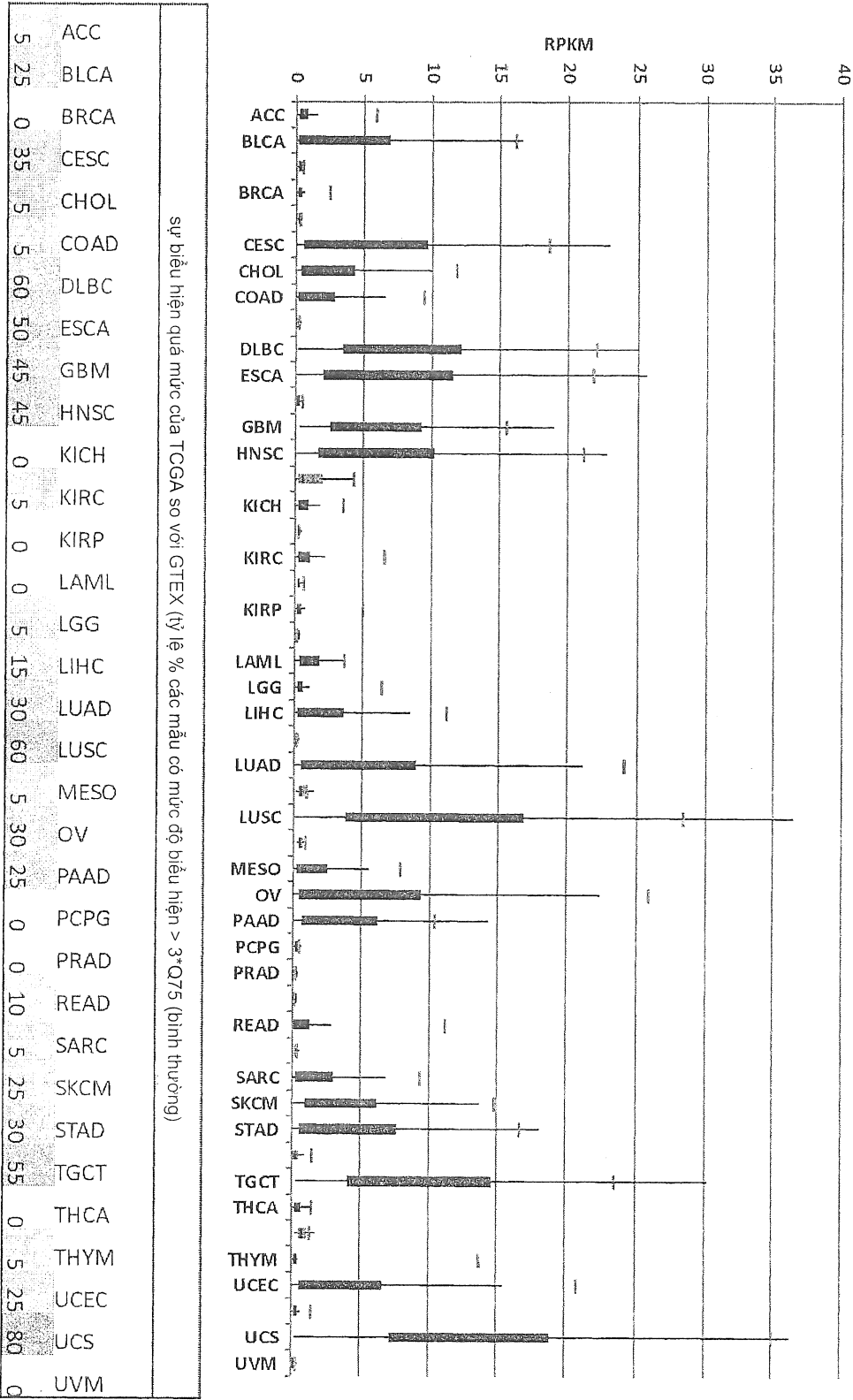


FIG. 3

FIG. 4



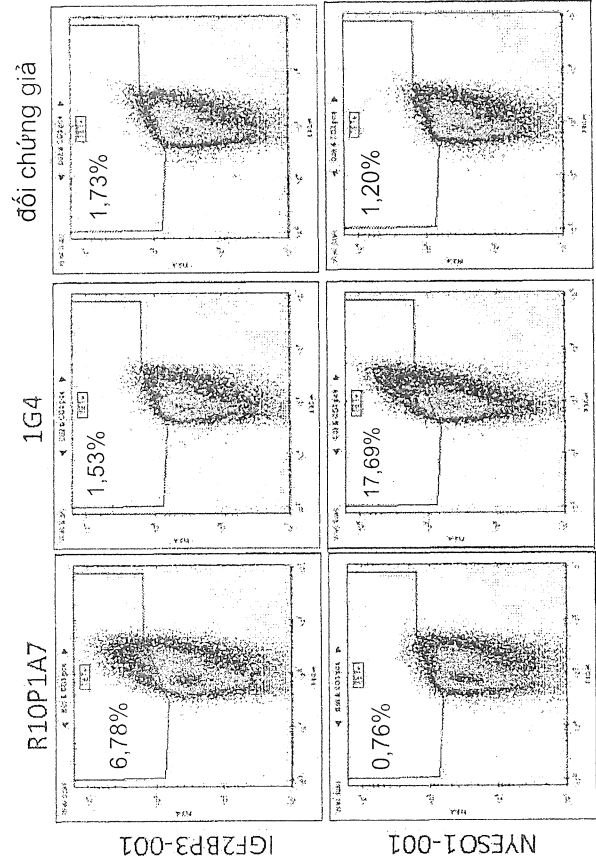


FIG. 5

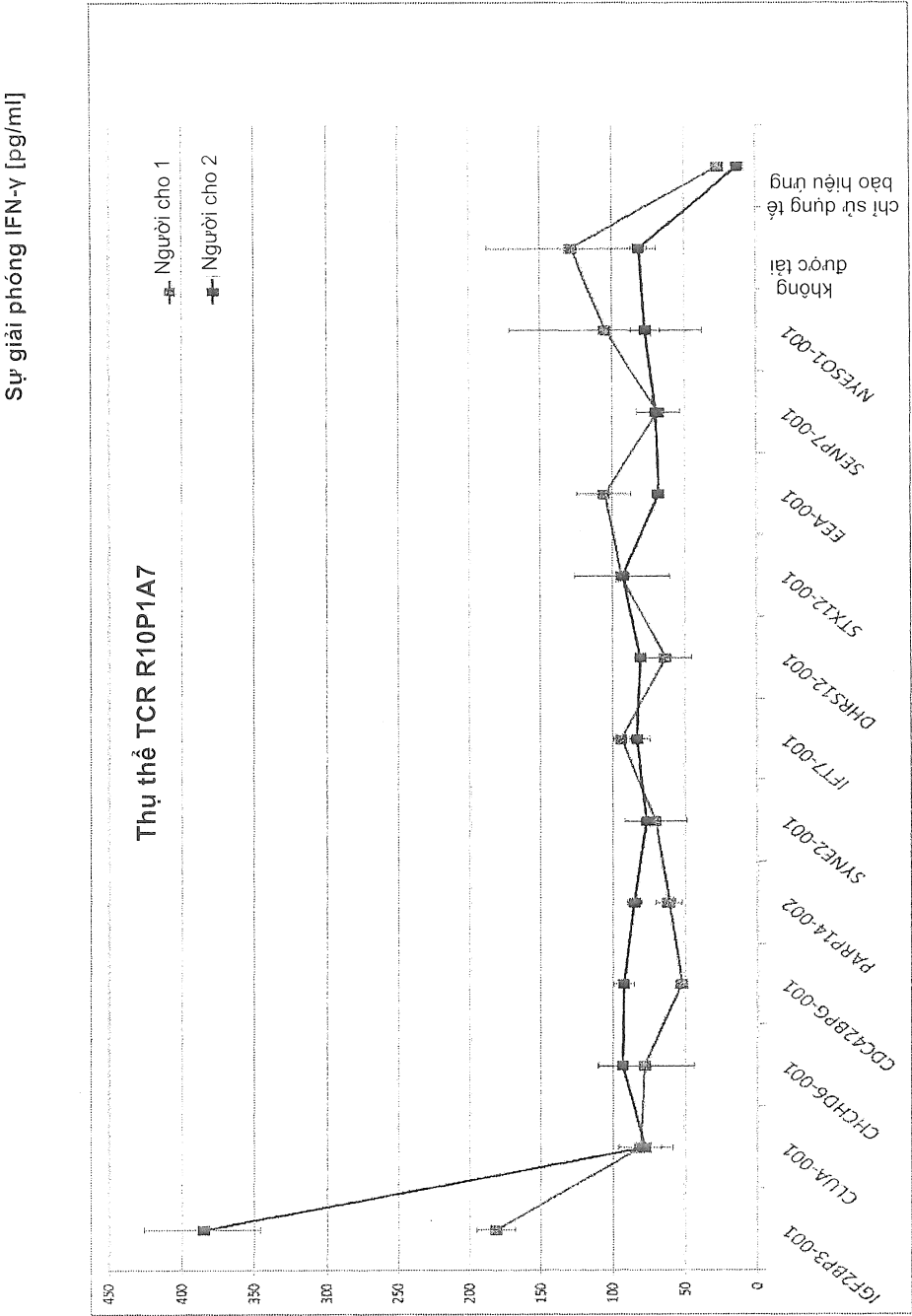
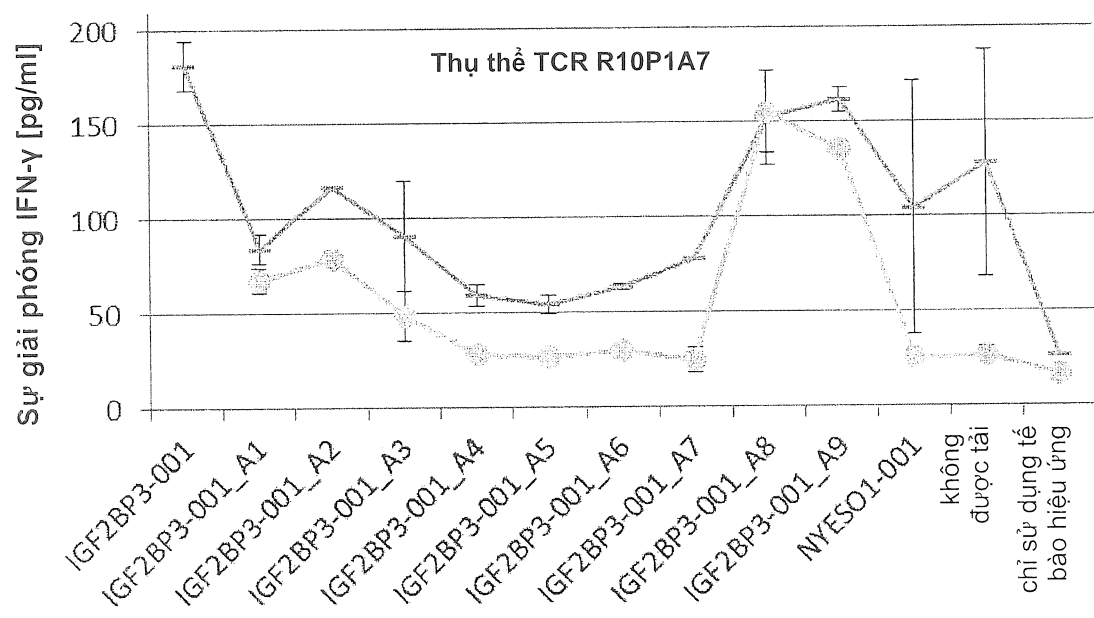


FIG. 6

FIG. 7



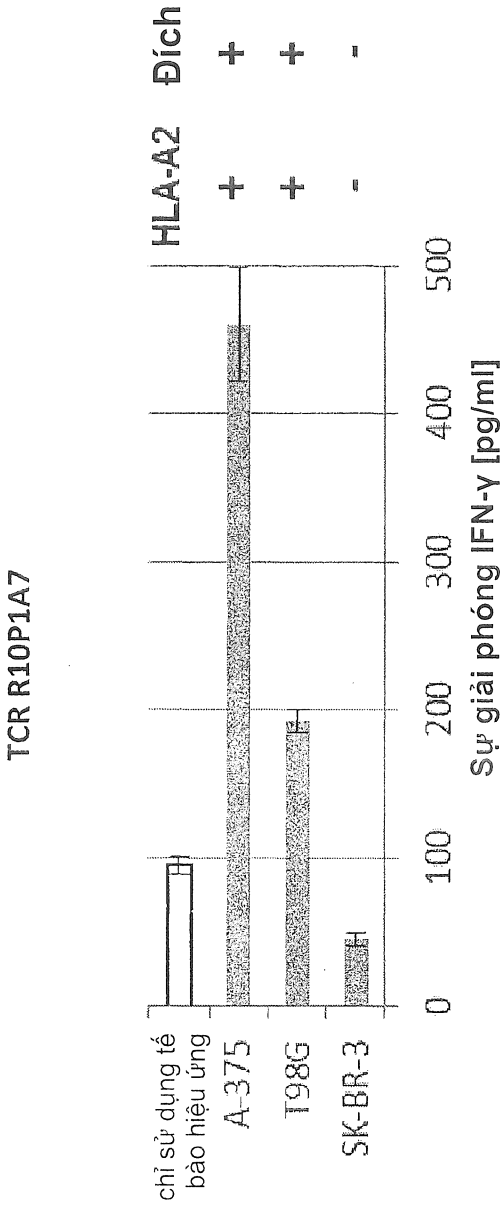


FIG. 8

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics Biotechnologies GmbH
 <120> THU THỂ TẾ BÀO T, AXIT NUCLEIC, VECTƠ BIỂU HIỆN, TẾ BÀO CHỦ,
 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG ĐỂ SỬ DỤNG TRONG LIỆU PHÁP MIỄN DỊCH
 KHÁNG BỆNH UNG THƯ
 <130> I32956W0
 <150> GB1604494.3
 <151> 2016-03-16
 <150> US 62/308,970
 <151> 2016-03-16
 <160> 45
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 1

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
 1 5

<210> 2
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 2

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
 20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
 35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
 50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
100 105 110

Ser Lys Glu Thr Arg Leu Met Phe Gly Asp Gly Thr Gln Leu Val Val
115 120 125

Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp
130 135 140

Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser
145 150 155 160

Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp
165 170 175

Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala
180 185 190

Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn
195 200 205

Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
210 215 220

Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu
225 230 235 240

Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys
245 250 255

Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270

<210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 3

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg
 20

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 4

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
 20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
 35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
 50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
 65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
 85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
 100 105 110

Ser

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 5

Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 6

Ile Phe Ser
 1

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 7

Cys Ala Glu Ser Lys Glu Thr Arg Leu Met Phe
 1 5 10

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 8

Arg Leu Met Phe Gly Asp Gly Thr Gln Leu Val Val Lys Pro
 1 5 10

<210> 9
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 9

Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys

1					5					10					15				
Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr				
			20							25				30					
Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr				
			35							40				45					
Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala				
			50							55				60					
Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser				
65							70				75								
Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp				
						85				90				95					
Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe				
						100				105				110					
Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala				
						115				120				125					
Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser							
						130				135				140					
<210> 10																			
<211> 318																			
<212> PRT																			
<213> Người hiện đại																			
<400> 10																			
Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu				
1							5				10				15				
Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ser	Gln	His				
						20				25				30					
Pro	Ser	Trp	Val	Ile	Cys	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Glu	Cys				
						35				40				45					

Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe Trp Tyr Arg Gln Phe
 50 55 60

Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser Asn Glu Gly Ser Lys
 65 70 75 80

Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys Phe Leu Ile Asn His
 85 90 95

Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr Ser Ala His Pro Glu
 100 105 110

Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg Ala Gly Gly His Glu Gln
 115 120 125

Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn
 130 135 140

Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile
 145 150 155 160

Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr
 165 170 175

Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His
 180 185 190

Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu
 195 200 205

Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr
 210 215 220

Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr
 225 230 235 240

Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val
 245 250 255

Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe
260 265 270

Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr
275 280 285

Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala
290 295 300

Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
305 310 315

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 11

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ile Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Pro Gly Ser Leu Ala Gly Ser Gly Leu
20 25

<210> 12
<211> 122
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 12

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ile Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Pro Gly Ser Leu Ala Gly Ser Gly Leu Gly Ala Val Val Ser Gln His
20 25 30

Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr Ser Val Lys Ile Glu Cys
35 40 45

Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe Trp Tyr Arg Gln Phe
50 55 60

Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser Asn Glu Gly Ser Lys
65 70 75 80

Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys Phe Leu Ile Asn His
85 90 95

Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr Ser Ala His Pro Glu
100 105 110

Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg
115 120

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 13

Asp Phe Gln Ala Thr Thr
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 14

Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala
1 5

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 15

Cys Ser Ala Arg Ala Gly Gly His Glu Gln Phe Phe
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 16

Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 17

<211> 179

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 17

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
85 90 95

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 18

Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu
 1 5 10 15

Leu Met Thr Leu
 20

<210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 19

Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
 1 5 10 15

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu
 20

<210> 20
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 20

Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp
 1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val
 20 25 30

Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala
 35 40 45

Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr
 50 55 60

Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg
 65 70 75 80

Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile
 85 90 95

Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg
 100 105 110

Pro Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser
 115 120 125

Leu Ile Val His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
 130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
 145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
 165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
 180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
 195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
 210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
 225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
 245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
 260 265 270

Ser Ser

<210> 21

<211> 311

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 21

Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
 1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
 20 25 30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
 35 40 45

Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
 50 55 60

Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
 65 70 75 80

Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
 85 90 95

Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110

Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg
 115 120 125

Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala

130	135	140
Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr		
145	150	155 160
Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser		
	165	170 175
Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro		
	180	185 190
Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu		
	195	200 205
Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn		
	210	215 220
His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu		
225	230	235 240
Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu		
	245	250 255
Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln		
	260	265 270
Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala		
	275	280 285
Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val		
	290	295 300
Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
305	310	

<210> 22
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 22

ggaattccat atgagtcaac aaggagaaga agatcc 36

<210> 23
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 23
 ttgtcagtcg acttagagtc tctcagctgg tacacg 36

<210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 24
 tctctcatat ggatgggtgga attactcaat ccccaa 36

<210> 25
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 25
 tagaaaccgg tggccaggca caccagtgtg gc 32

<210> 26
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 26
 000
 <210> 27
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 27
 000
 <210> 28
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 28
 000
 <210> 29
 <211> 0

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 29
 000

<210> 30
 <211> 0

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 30
 000

<210> 31
 <211> 0

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 31
 000

<210> 32
 <211> 0

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 32
 000

<210> 33
 <211> 0

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 33
 000

<210> 34
 <211> 0

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 34
 000

<210> 35
 <211> 0

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 35
 000

<210> 36
 <211> 0

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 36

000

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 37

Ala Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 38

Lys Ala Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 39

Lys Ile Ala Glu Ile Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 40

Lys Ile Gln Ala Ile Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 41

Lys Ile Gln Glu Ala Leu Thr Gln Val

1 5

<210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 42

Lys Ile Gln Glu Ile Ala Thr Gln Val
 1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 43

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Ala Gln Val
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 44

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Ala Val
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 45

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Ala
 1 5