



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

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

(11)



1-0034485

(51)⁷ A61K 38/04; C07K 7/08; C07K 7/06; (13) B
A61P 35/00; C07K 7/00

-
- (21) 1-2017-02374 (22) 16/12/2015
(86) PCT/EP2015/080018 16/12/2015 (87) WO 2016/102272 30/06/2016
(30) 1423016.3 23/12/2014 GB; 62/096,165 23/12/2014 US; 1501017.6 21/01/2015 GB
(45) 25/01/2023 418 (43) 25/09/2017 354A
(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)
Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany
(72) WEINSCHENK, Toni (DE); MAHR, Andrea (DE); FRITSCHKE, Jens (DE);
MÜLLER, Phillip (DE); WIEBE, Anita (DE); KUTSCHER, Sarah (DE).
(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)
-

(54) PEPTIT CÓ KHẢ NĂNG GẮN KẾT VỚI PHÂN TỬ PHỨC HỢP TƯƠNG THÍCH
MÔ CHÍNH, KHÁNG THỂ HÒA TAN HOẶC LIÊN KẾT MÀNG, DƯỢC PHẨM
CHỨA CHÚNG VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA TẾ BÀO HOẠT HÓA LYMPHO T

(57) Sáng chế đề cập đến peptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 47. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kháng thể, thụ thể tế bào T, axit nucleic mã hóa peptit, vector biểu hiện biểu hiện axit nucleic này, tế bào chủ chứa peptit, phương pháp tạo ra peptit, kháng thể, thụ thể tế bào T, tế bào lymphô T hoạt hóa *in vitro*, tế bào T hoạt hóa được tạo ra bằng phương pháp này, dược phẩm và kit bao gồm đồ chứa để đựng dược phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit, protein, axit nucleic và tế bào để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch. Cụ thể, sáng chế đề cập đến liệu pháp miễn dịch điều trị 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 được 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 các 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. Cụ thể, sáng chế đề cập đến một số trình tự peptit và các biến thể của chúng có nguồn gốc từ các phân tử kháng nguyên bạch cầu ở người (Human Leukocyte Antigen: HLA) nhóm I và nhóm II của các tế bào khối u của người có thể được sử dụng trong các chế phẩm vaccin để tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng u hoặc làm đích để phát triển các hợp chất hoặc tế bào có hoạt tính được học/miễn dịch học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Caxinom tế bào gan (hepatocellular carcinoma: HCC) là một trong số các khối u phổ biến nhất trên thế giới và chiếm khoảng 6% trong tổng số các ca bệnh ung thư mới được chẩn đoán trên thế giới. Năm 2012, có khoảng 782.000 ca bệnh HCC mới xuất hiện trên thế giới, khiến cho nó trở thành loại bệnh ung thư phổ biến thứ năm ở nam giới (554.000 ca) và loại bệnh ung thư phổ biến thứ chín ở nữ giới (228.000 ca) (<http://globocan.iarc.fr>). HCC là bệnh ác tính ở gan nguyên phát phổ biến nhất chiếm hơn 80% tổng số ca bệnh ung thư gan nguyên phát ở người trưởng thành.

Sự phân bố HCC thay đổi về mặt địa lý, và tỷ lệ mắc bệnh phụ thuộc vào giới tính. Tỷ lệ mắc bệnh được chuẩn hóa theo tuổi (age-standardized incidence rate: ASR) của HCC ở nam giới là cao nhất ở khu vực Đông Á (31,9) và Đông Nam Á (22,2), tỷ

lệ mắc bệnh ở mức trung bình là ở khu vực Nam Âu (9,5) và Bắc Mỹ (9,3) và tỷ lệ mắc bệnh thấp nhất là ở khu vực Bắc Âu (4,6) và Nam Trung Á (3,7). Tỷ lệ mắc HCC ở nữ giới là thấp hơn tỷ lệ ASR ở nam giới. Tỷ lệ ASR cao nhất ở nữ giới là ở khu vực Đông Á (10,2) và Tây Phi (8,1), tỷ lệ này thấp nhất là ở khu vực Bắc Âu (1,9) và Micronesia (1,6).

Việc chẩn đoán bệnh tổng thể cho các bệnh nhân mắc bệnh HCC là khó khăn. Tỷ lệ sống 5 năm tương đối (5-year relative survival rate: 5Y-RSR) đối với bệnh HCC là khoảng 15%, tùy thuộc vào giai đoạn ở thời điểm chẩn đoán. Đối với bệnh HCC giai đoạn tại chỗ, khi bệnh ung thư chỉ giới hạn ở gan, tỷ lệ 5Y-RSR là khoảng 28%. Đối với bệnh HCC giai đoạn khu vực và di căn, khi đó bệnh ung thư đã phát triển vào các cơ quan ở gần hoặc ở xa, tỷ lệ 5Y-RSR tương ứng là 7% và 2%.

Gần đây, có một số ít thử nghiệm về liệu pháp miễn dịch đối với bệnh HCC đã được tiến hành. Các cytokin đã được sử dụng để hoạt hóa tiểu quần thể của các tế bào miễn dịch và/hoặc làm tăng tính sinh miễn dịch của khối u (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Các thử nghiệm khác tập trung vào việc tiêm truyền các tế bào lymphô thâm nhiễm khối u hoặc các tế bào lymphô máu ngoại vi được hoạt hóa (Shi et al., 2004a; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

Cho đến nay, một lượng nhỏ thử nghiệm tiêm chủng vaccin để điều trị đã được thực hiện. Butterfield và các đồng tác giả đã tiến hành hai thử nghiệm bằng cách sử dụng các peptit có nguồn gốc từ alpha-fetoprotein (alpha-fetoprotein: AFP) làm vaccin hoặc các tế bào đuôi gai (DC) được tải peptit AFP *ex vivo* (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). Hai nghiên cứu khác nhau, các tế bào đuôi gai (DC) tự thân được tạo xung *ex vivo* bằng dịch tan khối u tự thân (Lee et al., 2005) hoặc dịch tan của dòng tế bào u nguyên bào gan HepG2 (Palmer et al., 2009). Cho đến nay, các thử nghiệm tiêm chủng vaccin chỉ cho thấy sự cải thiện có giới hạn về các hiệu quả lâm sàng.

Các peptit được phosphoryl hóa, ngoài các chất khác, được bộc lộ trong Công bố đơn quốc tế số WO 2014/39675.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến peptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 47, hoặc muối được dụng của nó, trong đó peptit này có chiều dài tối đa 30 axit amin, và

trong đó peptit này có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex: MHC) ở người nhóm I.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất peptit chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300 hoặc trình tự biến thể của chúng có mức độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 90%, (tốt hơn là có mức độ giống ít nhất 80% hoặc ít nhất 90% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, trong đó biến thể này gắn kết với MHC 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 có chiều dài đầy đủ cơ bản.

Sáng chế còn đề xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300 hoặc biến thể của nó, có mức độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 88% (tốt hơn là có tính đồng nhất ít nhất 80% hoặc ít nhất 88%) với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, trong đó peptit này hoặc biến thể của nó từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là từ 8 đến 30 axit amin, và được ưu tiên nhất là từ 8 đến 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic mã hóa các peptit theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện có khả năng biểu hiện và/hoặc biểu hiện axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng peptit theo sáng chế hoặc phức hợp của các peptit theo sáng chế với MHC, và phương pháp tạo ra chúng.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế hoặc vector biểu hiện như được mô tả trên đây. Sáng chế còn đề xuất 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 xuất 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 xuất kit bao gồm:

(a) đồ chứa để đựng được phẩm như đã mô tả trên đây, ở dạng dung dịch hoặc dạng đông khô;

(b) tùy ý, đồ chứa thứ hai để đựng chất pha loãng hoặc dung dịch hoàn nguyên dùng cho sản phẩm dạng đông khô; và

(c) tùy ý, các hướng dẫn để (i) sử dụng dung dịch hoặc (ii) hoàn nguyên

và/hoặc sử dụng sản phẩm dạng đông khô.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự trình diện quá mức của các peptit khác nhau ở mô bình thường (màu xám đậm) và HCC (màu xám nhạt). Fig.1A) APOB, Peptit: ALVDTLKFV (A*02) (SEQ ID NO: 7), các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 2 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 4 thực quản, 2 túi mật, 3 đường dạ dày-ruột (GI), 3 tim, 16 thận, 4 mẫu bạch cầu, 45 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 7 tụy, 1 dây thần kinh ngoại vi, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 3 cơ xương, 1 thanh mạc, 3 da, 4 lách, 7 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, và 20 gan; Fig.1B) ALDH1L1, Peptit: KLQAGTVFV (A*02) (SEQ ID NO: 2), các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 2 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 4 thực quản, 2 túi mật, 3 đường dạ dày-ruột (GI), 3 tim, 16 thận, 4 mẫu bạch cầu, 45 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 7 tụy, 1 dây thần kinh ngoại vi, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 3 cơ xương, 1 thanh mạc, 3 da, 4 lách, 7 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, và 20 gan; Fig.1C) C8B, Peptit: AYLLQPSQF (A*24) (SEQ ID NO: 200), các mô từ trái sang phải: bao gồm 2 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 4 não, 1 vú, 5 ruột kết, 1 tim, 13 thận, 9 phổi, 3 tụy, 2 trực tràng, 3 da, 1 lách, 12 dạ dày, 1 tuyến ức, 2 tử cung, và 9 gan; Fig.1D) RAD23B Peptit: KIDEKNFVV (SEQ ID NO: 63) 1 thanh mạc, 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 2 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 2 túi mật, 3 đường dạ dày-ruột (GI), 3 tim, 12 thận, 4 bạch cầu, 19 gan, 43 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 6 tụy, 1 dây thần kinh ngoại vi, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 3 cơ xương, 3 da, 4 lách, 5 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 4 thực quản; Fig.1E) RAD23B Peptit: KIDEKNFVV (SEQ ID NO: 63), chỉ thể hiện các mẫu mà trên đó peptit được biểu hiện: 5 dòng tế bào, 1 mô bình thường (1 tuyến thượng thận), 16 mô ung thư (2 bệnh ung thư não, 4 bệnh ung thư gan, 5 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư trực tràng, 1 bệnh ung thư bàng quang, 3 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải); Fig.1F) RFNG RLPPDTLLQQV (SEQ ID NO: 92), chỉ thể hiện các mẫu mà trên đó peptit được biểu hiện: 1 thanh mạc, 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 2 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 2 túi mật, 3 đường dạ dày-ruột (GI), 3 tim, 12 thận, 4 bạch cầu, 19 gan, 43 phổi, 1 hạch

bạch huyết, 1 buồng trứng, 6 tụy, 1 dây thần kinh ngoại vi, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 3 cơ xương, 3 da, 4 lách, 5 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 4 thực quản; Fig.1G) RFNG Peptit: RLPPDTLLQQV (SEQ ID NO: 92), chỉ thể hiện các mẫu mà trên đó peptit được biểu hiện: 2 dòng tế bào, 2 mô bình thường (2 tuyến thượng thận), 17 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư thực quản, 5 bệnh ung thư gan, 4 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 2 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải); Fig.1H) FLVCR1 Peptit: SVWFGPKEV (SEQ ID NO: 104) 1 thanh mạc, 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 2 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 2 túi mật, 3 đường dạ dày-ruột (GI), 3 tim, 12 thận, 4 bạch cầu, 19 gan, 43 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 6 tụy, 1 dây thần kinh ngoại vi, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 3 cơ xương, 3 da, 4 lách, 5 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 4 thực quản; Fig.1I) FLVCR1 Peptit: SVWFGPKEV (SEQ ID NO: 104), chỉ thể hiện các mẫu mà trên đó peptit được biểu hiện: 9 dòng tế bào, 1 mô bình thường (1 ruột non), 16 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 5 bệnh ung thư gan, 5 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải); Fig.1J) IKBKAP Peptit: LLFPHPVNQV (SEQ ID NO: 156) 1 thanh mạc, 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 2 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 2 túi mật, 3 đường dạ dày-ruột (GI), 3 tim, 12 thận, 4 bạch cầu, 19 gan, 43 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 6 tụy, 1 dây thần kinh ngoại vi, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 3 cơ xương, 3 da, 4 lách, 5 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 4 thực quản; Fig.1K) IKBKAP Peptit: LLFPHPVNQV (SEQ ID NO: 156), chỉ thể hiện các mẫu mà trên đó peptit được biểu hiện: 7 dòng tế bào, 2 môi trường nuôi cấy sơ cấp, 1 mô bình thường (1 ruột kết), 34 mô ung thư (1 bệnh ung thư tủy xương, 1 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 4 bệnh ung thư gan, 11 bệnh ung thư phổi, 3 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 5 bệnh ung thư buồng trứng, 4 bệnh ung thư bàng quang) (từ trái sang phải); Fig.1L) NKD1 Peptit: FLDTPIAKV (SEQ ID NO: 47), 1 thanh mạc, 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 2 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 2 túi mật, 3 đường dạ dày-ruột (GI), 3 tim, 12 thận, 4 bạch cầu, 19 gan, 43 phổi, 1 hạch bạch

huyết, 1 buồng trứng, 6 tụy, 1 dây thần kinh ngoại vi, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 3 cơ xương, 3 da, 4 lách, 5 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 4 thực quản; Fig.1M) NKD1 Peptit: FLDTPIAKV (SEQ ID NO: 47), chỉ thể hiện các mẫu mà trên đó peptit được biểu hiện: 1 bệnh khác (thoát vị não), 2 mô bình thường (1 phổi, 1 lách), 35 mô ung thư (5 bệnh ung thư não, 6 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư thực quản, 6 bệnh ung thư gan, 9 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 4 bệnh ung thư trực tràng, 2 bệnh ung thư dạ dày) (từ trái sang phải).

Fig.2 thể hiện các profin biểu hiện làm ví dụ (sự biểu hiện tương đối so với thận bình thường) của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện cao quá mức hoặc chỉ được biểu hiện ở HCC trong nhóm các mô bình thường (màu xám đậm) và 12 mẫu HCC (màu xám). Fig.2A) APOB, các mô từ trái sang phải: 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ vân, 1 da, 1 tiểu tràng, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, 1 tĩnh mạch; Fig.2B) AMACR, các mô từ trái sang phải: 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ vân, 1 da, 1 tiểu tràng, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, 1 tĩnh mạch; Fig.2C) ALDH1L1, các mô từ trái sang phải: 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ vân, 1 da, 1 tiểu tràng, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, 1 tĩnh mạch; Fig.2D) FGG, các mô từ trái sang phải: 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ vân, 1 da, 1 tiểu tràng, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, 1 tĩnh mạch; Fig.2E) C8B, các mô từ trái sang phải: 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực

quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ vân, 1 da, 1 tiểu tràng, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, 1 tĩnh mạch; và Fig.2F) HSD17B6, các mô từ trái sang phải: bao gồm 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ vân, 1 da, 1 tiểu tràng, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, và 1 tĩnh mạch.

Fig.3 thể hiện kết quả đếm tế bào theo dòng chảy làm ví dụ sau khi nhuộm bằng multime đặc hiệu với peptit. Phần giải thích thêm, xem ví dụ 4.

Fig.4 thể hiện kết quả đếm tế bào theo dòng chảy làm ví dụ sau khi nhuộm bằng multime đặc hiệu với peptit. Phần giải thích thêm, xem ví dụ 4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các bảng sau đây thể hiện peptit theo sáng chế, số trình tự nhận biết tương ứng của nó, và gen nguồn (cơ sở) triển vọng của peptit này. Peptit trong Bảng 1 gắn kết với HLA-A*02. Ngoài ra, các peptit trong Bảng 2 hữu ích trong việc chẩn đoán và/hoặc điều trị các bệnh ác tính khác nhau liên quan đến sự biểu hiện quá mức hoặc trình diện quá mức của polypeptit cơ sở tương ứng

Bảng 1: peptit HLA-A*02 theo sáng chế - S* = phosphoserin

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
47	FLDTPIAKV	85407	NKD1

Ngoài ra, nói chung, sáng chế còn đề cập đến các peptit để sử dụng trong việc điều trị các bệnh tăng sinh, ví dụ như bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư não, và/hoặc bệnh bạch cầu.

Được đặc biệt ưu tiên là các peptit – một mình hoặc kết hợp - theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300. Được ưu tiên hơn là các peptit – một mình hoặc kết hợp - được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 124 (xem Bảng 1), tốt hơn nếu là các peptit để gắn kết với A*02, và từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 187

đến SEQ ID NO: 218, tốt hơn là các peptit để gắn kết với A*24, và sử dụng chúng trong liệu pháp miễn dịch của bệnh HCC, bệnh ung thư não, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng hoặc bệnh bạch cầu, và tốt hơn nếu là bệnh HCC.

Như được thể hiện trong bảng 2 và 3 sau đây, nhiều peptit theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong liệu pháp miễn dịch của các triệu chứng khác. Các bảng này cho thấy rằng đối với peptit được chọn mà trên các loại khối u bổ sung chúng được phát hiện là có sự trình diện quá mức (bao gồm cả sự trình diện đặc hiệu) đối với trên 5% các mẫu khối u được xác định, hoặc sự trình diện đối với trên 5% các mẫu khối u được xác định với tỷ lệ của khối u theo số trung bình nhân với các mô bình thường là lớn hơn 3. Sự trình diện quá mức được xác định là sự trình diện cao hơn đối với mẫu khối u so với mẫu bình thường có sự trình diện cao nhất. Các mô bình thường kháng lại sự trình diện quá mức được thử nghiệm là: mô mỡ, tuyến thượng thận, tế bào máu, mạch máu, tủy xương, não, sụn, thực quản, mắt, túi mật, tim, thận, đại tràng, gan, phổi, hạch bạch huyết, dây thần kinh, tụy, tuyến cận giáp, màng bụng, tuyến yên, màng phổi, tuyến nước bọt, cơ vân, da, tiểu tràng, lách, dạ dày, tuyến giáp, khí quản, niệu quản, bàng quang.

Bảng 2: các peptit theo sáng chế và ứng dụng đặc hiệu của chúng ở các bệnh tăng sinh khác, đặc biệt là ở các bệnh ung thư khác - S* = phosphoserin

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
47	FLDTPIAKV	Não, Ruột kết, Trực tràng

Bảng 3: các peptit theo sáng chế và ứng dụng đặc hiệu của chúng trong các bệnh tăng sinh khác, đặc biệt là trong các bệnh ung thư khác - S* = phosphoserin

SEQ ID NO.	Trình tự	Các thực thể bổ sung
47	FLDTPIAKV	NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), GC (bệnh ung thư dạ dày), bệnh ung thư thực quản

Tương tự, các peptit như được liệt kê trong Bảng 3 trên đây có thể tạo cơ sở - theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị các bệnh như được chỉ định.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng các peptit theo sáng chế - tốt hơn là được kết hợp - để điều trị bệnh tăng sinh được chọn từ nhóm bao gồm

HCC, bệnh ung thư não, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, và bệnh bạch cầu.

Sáng chế còn đề xuất các peptit như được bộc lộ ở đây có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm -I ở người hoặc - ở dạng kéo dài, như biến thể theo chiều dài- MHC nhóm -II.

Sáng chế còn đề xuất các peptit như được bộc lộ ở đây trong đó (mỗi) peptit này gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300.

Sáng chế còn đề xuất các peptit như được bộc lộ ở đây, trong đó peptit này được cải biến và/hoặc bao gồm các liên kết không peptit.

Sáng chế còn đề xuất các peptit như được bộc lộ ở đây, trong đó peptit này là một phần của protein dung hợp, cụ thể là được dung hợp với các axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii), hoặc được dung hợp với (hoặc vào trình tự của) kháng thể, ví dụ như, kháng thể đặc hiệu với tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic mã hóa các peptit như được bộc lộ ở đây. Sáng chế còn đề xuất axit nucleic như được bộc lộ ở đây là ADN, ADN bổ trợ, APN, ARN hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện có khả năng biểu hiện và/hoặc biểu hiện axit nucleic như được bộc lộ ở đây.

Sáng chế còn đề xuất peptit như được bộc lộ ở đây, axit nucleic như được bộc lộ ở đây hoặc vector biểu hiện như được bộc lộ ở đây để sử dụng trong việc điều trị bệnh và dùng làm thuốc, cụ thể là trong việc điều trị các bệnh bao gồm bệnh ung thư và bệnh tự miễn/bệnh viêm/bệnh miễn dịch.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng các peptit như được bộc lộ ở đây hoặc phức hợp của các peptit này như được bộc lộ ở đây với MHC, và phương pháp tạo ra chúng.

Sáng chế còn đề xuất các thụ thể tế bào T (T-cell receptor: TCR), cụ thể là TCR hòa tan (soluble TCR: sTCR) và các TCR tách dòng được thiết kế vào tế bào T tự thân hoặc khác loài cùng loài, và các phương pháp tạo ra chúng, cũng như các tế bào NK hoặc tế bào khác mang thụ thể TCR nêu trên hoặc phản ứng chéo với các thụ thể TCR này.

Kháng thể và các thụ thể TCR là các phương án bổ sung của việc sử dụng liệu pháp miễn dịch của peptit theo sáng chế sau đây.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic như được bộc lộ ở đây hoặc vectơ biểu hiện như được mô tả trên đây. Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ như được bộc lộ ở đây là tế bào trình diện kháng nguyên, và tốt hơn nếu là tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra peptit như được bộc lộ ở đây, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ như được bộc lộ ở đây, và phân lập peptit ra khỏi tế bào chủ này hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp nêu trên như được bộc lộ ở đây, trong đó kháng nguyên được tải lên các phân tử 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.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp như được bộc lộ ở đây, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên chứa vectơ biểu hiện có khả năng biểu hiện hoặc biểu hiện peptit nêu trên có các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No.: 300, tốt hơn là có các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 124, và từ SEQ ID No. 187 đến SEQ ID No.: 218 hoặc trình tự axit amin của biến thể.

Sáng chế còn đề xuất các tế bào T hoạt hóa, được tạo ra bằng phương pháp như được bộc lộ ở đây, trong đó tế bào T này nhận biết chọn lọc tế bào biểu hiện polypeptit chứa trình tự axit amin như được bộc lộ ở đây.

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

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng peptit bất kỳ như được mô tả, axit nucleic như được bộc lộ ở đây, vectơ biểu hiện như được bộc lộ ở đây, tế bào như được bộc lộ ở đây, tế bào lymphô T hoạt hóa, thụ thể tế bào T hoặc kháng thể hoặc các phân tử gắn kết với peptit-MHC hoặc peptit khác như được bộc lộ ở đây làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc. Tốt hơn nếu thuốc này có hoạt tính kháng ung thư.

Tốt hơn nếu thuốc này dùng cho liệu pháp tế bào, vaccin hoặc protein trên cơ sở TCR hòa tan hoặc kháng thể.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng như được bộc lộ ở đây, trong đó các tế bào ung thư nêu trên là tế bào HCC, bệnh ung thư não, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng hoặc bệnh bạch cầu, và tốt hơn nếu là các tế bào HCC.

Sáng chế còn đề xuất các protein đánh dấu cụ thể và các dấu ấn sinh học trên cơ sở peptit như được bộc lộ ở đây, được gọi ở đây là “đích” có thể được sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc tiên lượng HCC. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các đích mới này trong ngữ cảnh điều trị bệnh ung thư.

Có hai nhóm phân tử MHC là MHC nhóm I và MHC nhóm II. Các phân tử MHC gồm chuỗi nặng alpha và beta-2-microglobulin (các thụ thể MHC nhóm I) hoặc chuỗi alpha và chuỗi beta (các thụ thể MHC nhóm II), tương ứng. Cấu dạng ba chiều của chúng tạo thành rãnh gắn kết, rãnh này được sử dụng để tương tác không cộng hóa trị với các peptit. Các phân tử MHC nhóm I có thể được tìm thấy chủ yếu trên các tế bào có nhân. Chúng là các peptit được tạo ra từ sự phân cắt phân giải protein của phần lớn các protein nội sinh, các sản phẩm ribosom khiếm khuyết (defective ribosomal product: DRIP) và các peptit có phân tử lớn. Các phân tử MHC nhóm II có thể được tìm thấy chủ yếu trên các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cell: APC) chuyên nghiệp, và chủ yếu là các peptit của các protein ngoại sinh hoặc protein xuyên màng được hấp thụ bởi các tế bào APC trong quá trình nhập nội bào, và được xử lý sau đó. Các phức hợp của peptit và MHC nhóm I được nhận biết bởi các tế bào T dương tính với CD8 mang thụ thể TCR thích hợp (thụ thể tế bào T), 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. Đã biết rõ rằng thụ thể TCR, peptit và MHC có mặt với lượng theo hệ số tỷ lệ bằng 1:1:1.

Các tế bào T hỗ trợ dương tính với CD4 đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra và duy trì các đáp ứng hữu hiệu nhờ tế bào gây độc tế bào dương tính với CD8. Việc xác định các epitop của tế bào T dương tính với CD4 có nguồn gốc từ các kháng nguyên liên quan đến khối u (tumor associated antigen: TAA) là điều quan trọng nhất để phát triển các sản phẩm được để kích thích đáp ứng miễn dịch kháng u (Gnjatic S, et al., 2003). Ở vị trí khối u, các tế bào T hỗ trợ, thúc đẩy cytokin thân thiện với tế bào T gây độc tế bào (cytotoxic T cell: CTL) (Mortara, et al., 2006) và thu hút các tế bào hiệu ứng, ví dụ, tế bào CTL, tế bào NK, đại thực bào, tế bào hạt (Hwang, et al., 2007).

Khi không có hiện tượng viêm, sự biểu hiện của các phân tử MHC nhóm II chủ yếu bị giới hạn ở các tế bào của hệ miễn dịch, đặc biệt là các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) chuyên nghiệp, ví dụ, các bạch cầu đơn nhân to, các tế bào có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân to, đại thực bào, tế bào đuôi gai. Ở các bệnh nhân mắc bệnh ung thư, các tế bào khối u đã được phát hiện là biểu hiện các phân tử MHC nhóm II (Dengjel et al., 2006).

Các peptit kéo dài (dài hơn) theo sáng chế có thể có tác dụng làm các epitop có hoạt tính MHC nhóm II. Các tế bào T hỗ trợ, được hoạt hóa bởi epitop của MHC nhóm II, đóng vai trò quan trọng trong việc phối hợp chức năng hiệu ứng của CTL trong sự miễn dịch kháng u. Các epitop của tế bào T hỗ trợ kích thích đáp ứng của tế bào T hỗ trợ về chức năng hiệu ứng thúc đẩy loại TH1 của tế bào T tiêu diệt dương tính với CD8, các chức năng này bao gồm chức năng gây độc tế bào chống lại các tế bào khối u biểu hiện các phức hợp peptit/MHC liên quan đến khối u trên bề mặt tế bào của chúng. Theo cách này, các epitop peptit của tế bào T hỗ trợ liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác, có thể dùng làm thành phần dược chất có hoạt tính của chế phẩm vacxin để kích thích các đáp ứng miễn dịch kháng u.

Như được thể hiện trong các mô hình động vật có vú, ví dụ, chuột, ngay cả khi không có mặt các tế bào lymphô T dương tính với CD8, các tế bào T dương tính với CD4 vẫn đủ để ức chế sự biểu hiện của khối u bằng cách ức chế sự tạo mạch nhờ sự tiết ra interferon-gama (interferon-gamma: IFN γ).

Có bằng chứng về việc tế bào T CD4 làm tế bào hiệu ứng kháng u trực tiếp (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Do sự biểu hiện cấu trúc của các phân tử HLA nhóm II thường bị giới hạn ở các tế bào miễn dịch, khả năng phân lập các peptit nhóm II trực tiếp từ khối u nguyên phát được cho là không thể thực hiện. Tuy nhiên, Dengjel và các đồng tác giả đã thành công trong việc nhận biết nhiều epitop của MHC nhóm II trực tiếp từ khối u (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Các kháng nguyên được nhận biết bởi các tế bào lymphô T gây độc tế bào đặc hiệu khối u, nghĩa là các epitop của chúng, có thể là các phân tử 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.

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 các kháng nguyên liên quan đến khối u được nhận biết bởi các tế bào T CD8+ (phối tử: phân tử MHC nhóm I + epitop peptit) hoặc bởi các tế bào T hỗ trợ T dương tính với CD4 (phối tử: phân tử MHC nhóm II + epitop peptit) là quan trọng trong việc phát triển các vaccin khối u.

Để một peptit của MHC nhóm I gây ra (tạo ra) đáp ứng miễn dịch tế bào, nó cũng phải gắn kết với phân tử MHC. Quá trình này phụ thuộc vào alen của phân tử MHC và hiện tượng đa hình đặc hiệu của trình tự axit amin của peptit. Các peptit gắn kết với MHC nhóm I thường chứa từ 8 đến 12 gốc axit amin trong chiều dài mạch và thường chứa hai gốc bảo toàn ("dạng neo") trong trình tự của chúng để tương tác với rãnh gắn kết tương ứng của phân tử MHC. Theo cách này, mỗi alen của MHC có một "motif gắn kết" để quyết định việc các peptit có thể gắn kết đặc hiệu với rãnh gắn kết này.

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.

Sự phân loại hiện nay của các kháng nguyên liên quan đến khối u bao gồm các nhóm chính sau:

a) Các kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư: các kháng nguyên TAA đầu tiên từng được xác định là có thể được nhận biết bởi tế bào T thuộc nhóm này, lúc đầu các kháng nguyên này được gọi là kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư (cancer-testis: CT) do sự biểu hiện của các thành viên của nó trong các khối u của người khác nhau về mô học và trong số các mô bình thường, chúng chỉ biểu hiện trong tế bào tinh/nguyên bào tinh của tinh hoàn và đôi khi trong nhau thai. Do các tế bào tinh hoàn không biểu hiện phân tử HLA nhóm I và II, các kháng nguyên này không thể được nhận biết bởi tế bào T trong mô bình thường và do đó có thể được cho là đặc hiệu khối u về mặt miễn dịch học. Ví dụ đã biết rõ về kháng nguyên CT là thành viên thuộc họ MAGE hoặc NY-ESO-1.

b) Các kháng nguyên biệt hóa: các kháng nguyên TAA này có mặt trong cả khối u và mô bình thường mà từ đó khối u xuất hiện; phần lớn kháng nguyên này

được phát hiện trong u melanin và tế bào melanin bình thường. Nhiều protein trong số các protein liên quan đến dòng tế bào melanin này tham gia vào quá trình sinh tổng hợp melanin và do đó không đặc hiệu khối u nhưng được sử dụng rộng rãi đối với liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư. Ví dụ về chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tyrosinaza và Melan-A/MART-1 đối với u melanin hoặc PSA đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

c) Các kháng nguyên TAA được biểu hiện quá mức: các gen mã hoá TAA được biểu hiện rộng rãi đã được phát hiện trong các loại khối u khác nhau về mặt mô học cũng như trong nhiều mô bình thường, thường là có mức độ biểu hiện thấp hơn. Nhiều epitop được xử lý và có thể được biểu hiện bởi mô bình thường có thể ở mức thấp hơn mức ngưỡng đối với sự nhận biết của tế bào T, trong khi sự biểu hiện quá mức của chúng trong tế bào khối u có thể gây ra đáp ứng kháng khối ung thư bằng cách phá vỡ sự dung nạp đã được thiết lập trước đó. Các ví dụ nổi bật về loại TAA này là Her-2/neu, Survivin, Telomeraza hoặc WT1.

d) Các kháng nguyên đặc hiệu khối u: các kháng nguyên TAA đặc biệt này là do sự đột biến các gen bình thường (như β -catenin, CDK4, v.v.). Một số thay đổi phân tử này có liên quan đến sự biến đổi và/hoặc tiến triển của khối u. Các kháng nguyên đặc hiệu khối u có thể thường gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh mà không mang nguy cơ phản ứng tự miễn chống lại mô bình thường. Mặt khác, trong hầu hết các trường hợp, các TAA này chỉ liên quan đến khối u chính xác mà trên đó chúng được xác định và thường không có mặt trong nhiều khối u riêng biệt. Độ đặc hiệu khối u (hoặc -mức độ kết hợp) của peptit cũng có thể xuất hiện nếu peptit này có nguồn gốc từ exon của khối u (-được kết hợp) trong trường hợp các protein có các đồng dạng đặc hiệu khối u (-được kết hợp).

e) Các kháng nguyên TAA do các cải biến bất thường sau dịch mã: các TAA này có thể xuất hiện do protein không đặc hiệu và không được biểu hiện quá mức trong khối u nhưng trở thành có liên quan đến khối u do các quá trình sau dịch mã có hoạt tính chủ yếu trong các khối u. Ví dụ về loại kháng nguyên này xuất hiện do kiểu glycosyl hoá biến đổi dẫn tới các epitop mới trong khối u như đối với MUC1 hoặc các sự kiện như ghép nối protein trong quá trình phân huỷ, chúng có thể đặc hiệu khối u hoặc có thể không đặc hiệu khối u.

f) Các protein của virus gây ung thư: các TAA này là các protein của virus có

thể đóng vai trò quyết định trong quá trình gây bệnh ung thư và do chúng là protein ngoại lai (không có nguồn gốc từ người), chúng có thể gây ra đáp ứng tế bào T. Ví dụ về protein này là protein E6 và E7 của virus gây u nhú người typ 16, chúng được biểu hiện trong caxinom cổ tử cung.

Đối với các protein cần được nhận biết bởi các tế bào lymphô T gây độc tế bào dưới dạng các kháng nguyên đặc hiệu khối u hoặc kháng nguyên liên quan đến khối u, và cần được sử dụng trong liệu pháp, các điều kiện tiên quyết cụ thể phải được đáp ứng. Kháng nguyên này cần được biểu hiện chủ yếu bởi tế bào khối u và không được biểu hiện bởi các mô khỏe mạnh bình thường, hoặc được biểu hiện với lượng tương đối nhỏ. Theo một phương án được ưu tiên, peptit cần được biểu hiện quá mức bởi các tế bào khối u so với các mô khỏe mạnh bình thường. Ngoài ra, tốt hơn nếu kháng nguyên tương ứng không chỉ có mặt ở một loại khối u, mà còn có mặt với nồng độ cao (nghĩa là số lượng bản sao của peptit tương ứng trong mỗi tế bào). Kháng nguyên đặc hiệu khối u và kháng nguyên liên quan đến khối u thường có nguồn gốc từ các protein tham gia trực tiếp vào quá trình biến đổi của tế bào bình thường thành tế bào khối u do chức năng của chúng, ví dụ trong việc kiểm soát hoặc ức chế chu trình tế bào của quá trình chết tế bào theo chương trình. Ngoài ra, các đích xuôi dòng của protein là nguyên nhân trực tiếp của sự biến đổi có thể được điều hòa tăng và do đó có thể liên quan gián tiếp với khối u. Các kháng nguyên liên quan gián tiếp với khối u này cũng có thể là đích của phương pháp tiêm chủng (Singh-Jasuja et al., 2004). Điều quan trọng là các epitop có mặt trong trình tự axit amin của kháng nguyên để đảm bảo rằng peptit này ("peptit gây miễn dịch"), có nguồn gốc từ kháng nguyên liên quan với khối u, điều này dẫn đến đáp ứng của tế bào T *in vitro* hoặc *in vivo*.

Về cơ bản, peptit bất kỳ có khả năng gắn kết với phân tử MHC có thể có chức năng làm epitop của tế bào T. Điều kiện tiên quyết để gây ra đáp ứng của tế bào T *in vitro* hoặc *in vivo* là sự có mặt của tế bào T có thụ thể TCR tương ứng và không có sự dung nạp miễn dịch đối với epitop cụ thể này.

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 vaccin khối u. Các phương pháp để nhận biết và xác định kháng nguyên TAA dựa trên việc sử dụng các tế bào T có thể được phân lập ra khỏi bệnh nhân hoặc đối tượng khỏe mạnh, hoặc các phương pháp này dựa trên sự tạo ra các profin phiên mã khác nhau hoặc các kiểu biểu

hiện peptit khác nhau giữa mô khối u và mô bình thường.

Tuy nhiên, việc xác định các gen được biểu hiện quá mức trong mô khối u hoặc dòng tế bào khối u ở người, hoặc được biểu hiện chọn lọc ở các mô hoặc dòng tế bào này, không cung cấp thông tin chính xác để sử dụng các kháng nguyên cần được phiên mã từ các gen này trong liệu pháp miễn dịch. Điều này là do chỉ các tiểu quần thể riêng biệt của các epitop của các kháng nguyên này là thích hợp cho ứng dụng này do các tế bào T cùng với thụ thể TCR tương ứng cần có mặt và không được có sự dung nạp miễn dịch đối với epitop cụ thể này hoặc sự dung nạp này ở mức rất nhỏ. Do đó, theo phương án rất được ưu tiên của sáng chế, điều quan trọng là chỉ chọn lọc các peptit được biểu hiện quá mức hoặc được biểu hiện chọn lọc đối với tế bào T chức năng và/hoặc tăng sinh cần được phát hiện. Tế bào T chức năng này được định nghĩa là tế bào T mà khi kích thích bằng kháng nguyên đặc hiệu, nó có thể được mở rộng về dòng vô tính và có thể thực hiện chức năng hiệu ứng (“tế bào T hiệu ứng”).

Trong trường hợp các thụ thể TCR và kháng thể theo sáng chế, tính sinh miễn dịch của các peptit cơ sở là thứ yếu. Đối với các thụ thể TCR và kháng thể theo sáng chế, sự biểu hiện là yếu tố quyết định.

Cả ứng dụng trong điều trị và chẩn đoán đối với bệnh ung thư bổ sung đều được bộc lộ trong phần mô tả chi tiết thêm sau đây của các protein cơ sở (polypeptit) của peptit theo sáng chế.

Mức protein NKD1 giảm nhưng mức ARN thông tin của NKD1 lại tăng lên ở bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, mức protein NKD1 có tương quan với khả năng xâm lấn gia tăng và sự tiên lượng xấu (Zhang et al., 2011). ARN thông tin của NKD1 cũng được phát hiện là tăng lên ở các tế bào được lấy từ khối u ruột kết ở người (Yan et al., 2001; Zhang et al., 2011).

Peptit bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin như được xác định trên đây có thể có một hoặc hai axit amin dạng không neo (xem phần dưới đây liên quan đến motif dạng neo) được trao đổi mà không có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm-I hoặc nhóm-II ở người bị thay đổi đáng kể hoặc bị ảnh hưởng tiêu cực, so với peptit không được cải biến. Theo phương án khác, ở peptit chủ yếu bao gồm trình tự axit amin như được xác định ở đây, một hoặc hai axit amin có thể được trao đổi với các đối tác trao đổi bảo toàn của chúng (xem phần dưới đây) mà không có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương

thích mô chính (MHC) nhóm-I hoặc nhóm-II ở người bị thay đổi đáng kể, hoặc bị ảnh hưởng tiêu cực, khi so sánh với peptit không được cải biến.

Sáng chế còn đề xuất peptit như được bộc lộ ở đây, trong đó peptit này được cải biến và/hoặc bao gồm các liên kết không peptit như được mô tả dưới đây.

Sáng chế còn đề xuất peptit như được bộc lộ ở đây, trong đó peptit này là một phần của protein dung hợp, cụ thể là được dung hợp với các axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii), hoặc được dung hợp với (hoặc vào trình tự của) kháng thể, ví dụ như kháng thể đặc hiệu với tế bào đuôi gai, nghĩa là gắn kết với các tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic mã hóa peptit như được bộc lộ ở đây. Sáng chế còn đề xuất axit nucleic như được bộc lộ ở đây nghĩa là ADN, ADN bổ trợ, APN, ARN hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện có khả năng biểu hiện có khả năng biểu hiện và/hoặc chứa axit nucleic như được bộc lộ ở đây.

Sáng chế còn đề xuất peptit như được bộc lộ ở đây, axit nucleic như được bộc lộ ở đây hoặc vector biểu hiện như được bộc lộ ở đây để dùng làm thuốc.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể như được mô tả thêm dưới đây và phương pháp tạo ra chúng. Kháng thể được ưu tiên là kháng thể đặc hiệu với peptit theo sáng chế, và/hoặc với peptit theo sáng chế khi được gắn kết với MHC của chúng. Kháng thể được ưu tiên có thể là kháng thể đơn dòng.

Sáng chế còn đề xuất thụ thể tế bào T (TCR), cụ thể là thụ thể TCR hòa tan (sTCR) hướng đích peptit như được bộc lộ ở đây và/hoặc phức hợp peptit-MHC của nó, và phương pháp tạo ra chúng.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc các phân tử gắn kết khác hướng đích peptit như được bộc lộ ở đây và/hoặc phức hợp peptit-MHC của nó, và phương pháp tạo ra chúng.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic như được bộc lộ ở đây hoặc vector biểu hiện như được mô tả trên đây. Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ như được bộc lộ ở đây là tế bào trình diện kháng nguyên. Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ như được bộc lộ ở đây, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên là tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra peptit như được bộc lộ ở đây, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ như được bộc lộ ở đây, và phân lập peptit

ra khỏi tế bào chủ và/hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra tế bào T hoạt hóa *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc *in vitro* với các phân tử MHC nhóm I hoặc nhóm II của người đã được tải kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp trong khoảng thời gian đủ để hoạt hóa tế bào T này theo cách đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này là ít nhất một peptit theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất phương pháp, trong đó kháng nguyên được tải vào các phân tử MHC nhóm I hoặc II được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp bằng cách cho kháng nguyên với lượng đủ tiếp xúc với tế bào trình diện kháng nguyên.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp như được bộc lộ ở đây, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên chứa vectơ biểu hiện có khả năng biểu hiện peptit nêu trên, peptit này chứa các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, hoặc trình tự axit amin của biến thể của nó.

Sáng chế còn đề xuất tế bào T hoạt hóa, được tạo ra bằng phương pháp như được bộc lộ ở đây, phương pháp này nhận biết chọn lọc tế bào có biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin như được bộc lộ ở đây.

Sáng chế còn mô tả phương pháp tiêu diệt tế bào đích ở bệnh nhân có tế bào đích biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin bất kỳ như được bộc lộ ở đây, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng lượng hữu hiệu của tế bào T như được bộc lộ ở đây.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng peptit bất kỳ đã mô tả, axit nucleic như được bộc lộ ở đây, vectơ biểu hiện như được bộc lộ ở đây, tế bào như được bộc lộ ở đây, hoặc tế bào T hoạt hóa như được bộc lộ ở đây làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng như được bộc lộ ở đây, trong đó thuốc nêu trên là vaccin, tế bào, quần thể tế bào, ví dụ như dòng tế bào, thụ thể sTCR và kháng thể đơn dòng.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng như được bộc lộ ở đây, trong đó thuốc nêu trên có hoạt tính chống ung thư.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng như được bộc lộ ở đây, trong đó các tế bào ung thư nêu trên là tế bào HCC.

Sáng chế còn đề xuất các protein đánh dấu cụ thể và các dấu ấn sinh học trên

cơ sở peptit theo sáng chế có thể được sử dụng trong việc chẩn đoán và/hoặc tiên lượng HCC.

Ngoài ra, sáng chế mô tả việc sử dụng các đích mới này để điều trị bệnh ung thư.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra vacxin chống ung thư được cá nhân hóa cho từng bệnh nhân bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu (sau đây được gọi là “kho chứa”) của các peptit liên quan đến khối u đã được sàng lọc sơ bộ.

Sự kích thích đáp ứng miễn dịch phụ thuộc vào sự có mặt của các kháng nguyên được nhận biết là kháng nguyên ngoại lai bởi hệ miễn dịch của vật chủ. Việc phát hiện ra sự tồn tại của các kháng nguyên liên quan đến khối u làm gia tăng khả năng sử dụng hệ miễn dịch của vật chủ để can thiệp vào sự phát triển của khối u. Nhiều cơ chế khác nhau khai thác cả nhánh thể dịch và nhánh tế bào của hệ miễn dịch hiện đang được khai thác cho liệu pháp miễn dịch ung thư.

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).

Thuật ngữ “peptit” được sử dụng ở đây để chỉ loạt các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của 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 mạch dài đến 10, 11, 12, hoặc 13 axit amin trong chiều dài mạch 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 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit amin trong chiều dài mạch.

Ngoài ra, thuật ngữ “peptit” sẽ bao gồm các muối của loạt gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của axit amin liền kề. Tốt hơn nếu các muối này là muối được dụng

của peptit, ví dụ như các muối clorua hoặc axetat (trifloaxetat). Cần lưu ý rằng các muối của peptit theo sáng chế 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 loạt các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của axit amin liên kề. Không có giới hạn về chiều dài của oligopeptit theo sáng chế, miễn là một hoặc nhiều epitop chính xác được giữ nguyên ở đây. Các oligopeptit thường chứa ít hơn 30 axit amin trong chiều dài mạch, và chứa nhiều hơn 15 axit amin trong chiều dài mạch.

Thuật ngữ “peptit theo sáng chế” cũng còn bao gồm các peptit gồm hoặc chứa peptit như được xác định trên đây theo trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300.

Thuật ngữ “polypeptit” để chỉ loạt các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của axit amin liên 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 “gây 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, 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 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 các phân tử 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.

Ở người, có ba locus di truyền khác nhau mã hóa các phân tử MHC nhóm I (các phân tử MHC của người còn được ký hiệu là các kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA)): HLA-A, HLA-B, và HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, và HLA-B*07 là các ví dụ về các alen của MHC nhóm I khác nhau có thể được biểu hiện từ các locus này.

Bảng 4: Tần suất biểu hiện F của HLA-A*02 và HLA-A*24 và các kiểu huyết thanh HLA-DR phổ biến nhất. Tần suất được xác định từ tần suất kiểu đơn Gf trong quần thể dân số Mỹ được làm thích ứng theo tài liệu của Mori và các đồng tác giả (Mori M, et al. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):1017-27) bằng cách sử dụng công thức Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$. Tổ hợp của A*02 hoặc A*24 với các alen HLA-DR nhất định có thể được làm giàu hoặc với tần suất ít hơn tần suất dự kiến từ các tần số riêng lẻ của chúng do sự mất cân bằng liên kết. Để hiểu chi tiết hơn, xem tài liệu của Chanock và các đồng tác giả (S.J. Chanock, et al (2004) HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and DRB1 in an African American population from Bethesda, USA Human Immunology, 65: 1223-1235).

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
A*02	Người da trắng (Bắc Mỹ)	49,1%
A*02	Người Mỹ gốc Phi (Bắc Mỹ)	34,1%
A*02	Người Mỹ gốc Á (Bắc Mỹ)	43,2%
A*02	Người Mỹ La-tinh (Bắc Mỹ)	48,3%
DR1	Người da trắng (Bắc Mỹ)	19,4%
DR2	Người da trắng (Bắc Mỹ)	28,2%
DR3	Người da trắng (Bắc Mỹ)	20,6%
DR4	Người da trắng (Bắc Mỹ)	30,7%
DR5	Người da trắng (Bắc Mỹ)	23,3%
DR6	Người da trắng (Bắc Mỹ)	26,7%
DR7	Người da trắng (Bắc Mỹ)	24,8%
DR8	Người da trắng (Bắc Mỹ)	5,7%
DR9	Người da trắng (Bắc Mỹ)	2,1%
DR1	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	13,20%
DR2	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	29,80%

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
DR3	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	24,80%
DR4	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	11,10%
DR5	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	31,10%
DR6	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	33,70%
DR7	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	19,20%
DR8	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	12,10%
DR9	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	5,80%
DR1	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	6,80%
DR2	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	33,80%
DR3	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	9,20%
DR4	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	28,60%
DR5	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	30,00%
DR6	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	25,10%
DR7	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	13,40%
DR8	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	12,70%
DR9	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	18,60%
DR1	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	15,30%
DR2	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	21,20%
DR3	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	15,20%
DR4	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	36,80%
DR5	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	20,00%
DR6	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	31,10%
DR7	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	20,20%
DR8	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	18,60%
DR9	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	2,10%
A*24	Người Philippin	65%
A*24	Người Nenets ở Nga	61%
A*24:02	Người Nhật Bản	59%
A*24	Người Malaysia	58%
A*24:02	Người Philippin	54%
A*24	Người Ấn Độ	47%
A*24	Người Hàn Quốc	40%

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
A*24	Người Sri Lanka	37%
A*24	Người Trung Quốc	32%
A*24:02	Người Ấn Độ	29%
A*24	Người Tây Úc	22%
A*24	Người Mỹ	22%
A*24	Người Samara ở Nga	20%
A*24	Người Nam Mỹ	20%
A*24	Người châu Âu	18%

Tốt hơn nếu khi được đưa vào vacxin theo sáng chế, các peptit theo sáng chế như được mô tả ở đây gắn kết với A*02 hoặc A*24. Vacxin cũng có thể chứa các peptit của MHC nhóm II gắn kết toàn diện. Do đó, vacxin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị ung thư ở các bệnh nhân hoặc có A*02 dương tính, A*24 dương tính hoặc dương tính với A*02 và A*24, trong khi không cần lựa chọn đối với alotyp của MHC nhóm II do tính chất liên kết-pan của các peptit này.

Việc kết hợp các peptit, ví dụ, A*02 và A*24 trong một vacxin có lợi thế là tỷ lệ % quần thể bệnh nhân bất kỳ có thể được điều trị là cao hơn so với việc chỉ sử dụng alen của MHC nhóm I. Trong khi ở phần lớn các nhóm bệnh nhân, có ít hơn 50% bệnh nhân có thể được điều trị bằng chỉ một alen, vacxin theo sáng chế có thể điều trị cho ít nhất 60% bệnh nhân với tỷ lệ quần thể liên quan bất kỳ. Cụ thể, tỷ lệ % bệnh nhân sau đây sẽ dương tính với ít nhất một trong số các alen này ở các vùng khác nhau: người Mỹ 61%, người Tây Âu 62%, người Trung Quốc 75%, người Hàn Quốc 77%, người Nhật Bản 86% (tính theo trang web www.allelefrequencies.net).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, sự việ dẫn đến trình tự ADN bao gồm cả ADN sợi đơn và ADN sợi kép. Do đó, trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ theo cách khác, trình tự cụ thể để chỉ ADN sợi đơn của trình tự này, bộ đôi của trình tự này 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.

Theo một phương án được ưu tiên, thuật ngữ “trình tự nucleotit” để chỉ dị polyme của deoxyribonucleotit.

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 “mã hóa nucleotit (hoặc mã hóa) đối với 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.

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 kháng thể”, 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 vector 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 mồi” 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. 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 gây 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, vector, 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 gây miễn dịch) khi được sử dụng, một mình hoặc tùy ý với tá được thích hợp hoặc trong vector, cho động vật, như động vật có vú, ví dụ, thỏ hoặc chuột, 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 tương đồng”, “tỷ lệ % tính 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 đóng 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

(iiii) 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 là nhỏ hơn tỷ lệ % độ đồng nhất 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.

Các peptit gốc (không được cải biến) như được bộc lộ ở đây có thể được cải biến bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc ở các vị trí, có thể chọn lọc, khác nhau trong chuỗi peptit, nêu không được chỉ rõ theo cách khác. Tốt hơn nếu sự thay thế các gốc này nằm ở đầu của chuỗi axit amin. 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 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); và 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.

Tất nhiên là sự thay thế này có thể liên quan đến cấu trúc chứ không phải L-axit amin thông thường. Do đó, D-axit amin có thể được thay thế cho L-axit amin 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, axit amin có các gốc R không chuẩn (nghĩa là các nhóm R không phải nhóm được tìm thấy trong 20 axit amin thông thường của protein tự nhiên) 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 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 peptit theo sáng chế có thể kéo dài tối đa 4 axit amin, nghĩa là 1, 2, 3 hoặc 4 axit amin có thể được bổ sung vào một trong hai đầu theo tổ hợp bất kỳ nằm trong khoảng từ 4:0 đến 0:4.

Tổ hợp bất kỳ của việc kéo dài theo sáng chế có thể được thể hiện trong Bảng 5:

Đầu tận cùng C	Đầu tận cùng N
4	0
3	0 hoặc 1
2	0 hoặc 1 hoặc 2
1	0 hoặc 1 hoặc 2 hoặc 3
0	0 hoặc 1 hoặc 2 hoặc 3 hoặc 4
Đầu tận cùng N	Đầu tận cùng C

Đầu tận cùng C	Đầu tận cùng N
4	0
3	0 hoặc 1
2	0 hoặc 1 hoặc 2
1	0 hoặc 1 hoặc 2 hoặc 3
0	0 hoặc 1 hoặc 2 hoặc 3 hoặc 4

Các axit amin để kéo dài/mở rộng có thể là peptit có trình tự gốc của protein hoặc (các) axit amin khác bất kỳ. Sự kéo dài có thể được sử dụng để làm gia tăng độ ổn định hoặc độ tan của peptit.

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 CTL được giới hạn bởi MHC nhóm I, chức năng hiệu ứng có thể là sự phân giải các tế bào đích được tạo xung peptit, được tạo xung tiền chất peptit 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.

Tốt hơn nếu khi các tế bào T đặc hiệu với peptit như được bộc lộ ở đây được thử nghiệm đối với peptit được thể, nồng độ peptit mà khi đó các peptit đã thể đạt một nửa mức tăng tối đa trong quá trình phân giải so với nồng độ tức thời là không nhiều hơn khoảng 1mM, tốt hơn là không nhiều hơn khoảng 1μM, tốt hơn nữa là không nhiều hơn khoảng 1nM, và vẫn tốt hơn nữa là không nhiều hơn khoảng 100pM, và tốt nhất là không nhiều hơn khoảng 10pM. Cũng được ưu tiên nếu peptit được thể được nhận biết bởi các tế bào T với nhiều hơn một đối tượng, ít nhất là hai, và tốt hơn nữa là ba đối tượng.

Do đó, các epitop theo sáng chế có thể giống với các epitop có trong tự nhiên liên quan đến khối u hoặc đặc hiệu với khối u hoặc có thể bao gồm các epitop khác biệt không quá bốn gốc so với peptit tham chiếu, miễn là chúng có hoạt tính kháng nguyên gần như giống nhau.

Các phân tử của MHC nhóm I có thể được tìm thấy trên hầu hết các tế bào có nhân chứa peptit chủ yếu được tạo thành từ sự phân cắt phân giải protein của các protein trong nhân hoặc phân bào tan nội sinh, DRIPS, và các peptit có phân tử lớn. Tuy nhiên, các peptit có nguồn gốc từ các ngân thể nhân hoặc nguồn ngoại sinh cũng

thường được tìm thấy trên các phân tử MHC nhóm I. Cách trình diện không cổ điển này của nhóm I còn được gọi là trình diện chéo trong tài liệu chuyên ngành.

Do cả hai loại đáp ứng phụ thuộc CD8 và CD4 đều góp phần cùng nhau và hiệp đồng vào hiệu quả kháng u, việc nhận biết và xác định các nhóm liên quan đến khối u được nhận biết bởi các tế bào T dương tính với CD8 (phân tử MHC nhóm I) hoặc tế bào T dương tính với CD4 (phân tử MHC nhóm II) là quan trọng trong việc phát triển vaccin khối u. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm peptit chứa các peptit gắn kết với phức hợp MHC của một trong hai nhóm.

Khi tính đến các tác dụng phụ nghiêm trọng và chi phí liên quan việc điều trị bệnh ung thư tốt hơn, rất cần có các phương pháp tiên lượng và chẩn đoán tốt hơn. Do đó, cần xác định các yếu tố khác thể hiện các dấu ấn sinh học đối với bệnh ung thư nói chung và HCC nói riêng. Ngoài ra, cần xác định các yếu tố có thể được sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư nói chung và HCC nói riêng.

Sáng chế đề xuất các peptit hữu ích trong việc điều trị bệnh ung thư/khối u, tốt hơn nếu là HCC biểu hiện quá mức hoặc chỉ biểu hiện các peptit theo sáng chế. Các peptit này được chứng minh bằng phương pháp phổ khối lượng là được biểu hiện trong tự nhiên bởi các phân tử HLA trên mẫu HCC nguyên phát ở người.

Gen/protein nguồn (còn được gọi là “protein có chiều dài đầy đủ” hoặc “protein cơ sở”) mà các peptit có nguồn gốc từ đó được chứng minh là biểu hiện ở mức quá cao ở bệnh ung thư so với các mô bình thường – thuật ngữ “các mô bình thường” liên quan đến sáng chế này sẽ có nghĩa là tế bào gan khỏe mạnh hoặc các tế bào mô bình thường khác, chứng minh sự liên quan đến khối u ở mức cao của các gen nguồn (xem ví dụ 2). Ngoài ra, chính các peptit được biểu hiện ở mức quá cao trên mô khối u – thuật ngữ “mô khối u” liên quan đến sáng chế này có nghĩa là mẫu lấy từ bệnh nhân bị HCC, mà không ở trên các mô bình thường (xem Ví dụ 1).

Các peptit gắn kết với HLA có thể được nhận biết bởi hệ miễn dịch, cụ thể là các tế bào lymphô T. Các tế bào T có thể phá hủy các tế bào biểu hiện phức hợp HLA/peptit đã được nhận biết, ví dụ, các tế bào HCC biểu hiện peptit có nguồn gốc từ đó.

Các peptit theo sáng chế đã được chứng minh là có khả năng kích thích đáp ứng của tế bào T và/hoặc được biểu hiện quá mức và do đó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể và/hoặc các thụ thể TCR, cụ thể là thụ thể TCR hòa tan (sTCR) theo sáng

chế (xem Ví dụ 3). Hơn nữa, khi các peptit được tạo phức với MHC tương ứng cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể và/hoặc thụ thể TCR, cụ thể là các thụ thể hòa tan sTCR theo sáng chế. Các phương pháp tương ứng là đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và cũng có thể được tìm thấy trong các tài liệu chuyên ngành tương ứng. Do đó, các peptit theo sáng chế hữu ích để tạo ra đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân, nhờ đó các tế bào khối u có thể bị phá hủy. Đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân có thể được tạo ra bằng cách sử dụng trực tiếp các peptit đã mô tả hoặc tiền chất thích hợp (ví dụ, peptit được kéo dài, protein, hoặc axit nucleic mã hóa các peptit) cho bệnh nhân, lý tưởng là kết hợp với chất làm gia tăng tính sinh miễn dịch (nghĩa là tá dược). Đáp ứng miễn dịch có nguồn gốc từ việc tiêm chủng vaccin điều trị bệnh này có thể được dự kiến là có độ đặc hiệu cao với các tế bào khối u do các peptit đích của sáng chế không được biểu hiện trên mô bình thường với số lượng bản sao tương đương, điều này ngăn ngừa nguy cơ của các phản ứng tự miễn không mong muốn đối với tế bào bình thường ở bệnh nhân.

Tốt hơn nếu “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 chứa peptit ở dạng tự do hoặc ở dạng muối dược dụng (cũng xem phần trên đây). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "muối dược dụng" để chỉ dẫn xuất của peptit được bộc lộ trong đó peptit này được cải biến bằng cách tạo muối axit hoặc muối bazơ của nó. Ví dụ, các muối axit được điều chế từ bazơ tự do (trong đó thường là dạng trung tính của dược chất có nhóm $-NH_2$ trung tính) liên quan đến phản ứng với axit thích hợp. Các axit thích hợp để điều chế các muối axit bao gồm cả các axit hữu cơ, ví dụ, axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit pyruvic, axit oxalic, axit malic, axit malonic, axit succinic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit citric, axit benzoic, axit xianic, axit mandelic, axit metan sulfonic, axit etane sulfonic, axit p-toluensulfonic, axit salicylic, và axit tương tự, cũng như các axit vô cơ, ví dụ, axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric và axit tương tự. Ngược lại, việc điều chế các muối bazơ của gốc axit có thể có mặt trên peptit được điều chế bằng cách sử dụng bazơ dược dụng như natri hydroxit, kali hydroxit, amoni hydroxit, canxi hydroxit, trimetylamin hoặc bazơ tương tự.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, dược phẩm chứa peptit dưới dạng muối của axit axetic (axetat), triflo axetat hoặc axit clohydric (clorua).

Đặc biệt được ưu tiên là chế phẩm và/hoặc sử dụng chế phẩm này, ví dụ, ở dạng vaccin.

Các peptit theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra và phát triển kháng thể đặc hiệu với phức hợp MHC/peptit. Chúng có thể được sử dụng cho liệu pháp, hướng đích độc tố hoặc các chất phóng xạ đến mô bị bệnh. Ứng dụng khác của các kháng thể này có thể là hướng đích các chất đồng vị phóng xạ đến mô bị bệnh cho mục đích chụp hình như phương pháp chụp xạ hình cắt lớp positron (Positron Emission Tomography: PET). Ứng dụng này có giúp phát hiện sự di căn nhỏ hoặc để xác định vị trí chính xác và kích thước của mô bị bệnh.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể tái tổ hợp gắn kết đặc hiệu với phức hợp tương thích mô chính (MHC) ở người nhóm I hoặc II được tạo phức với kháng nguyên được giới hạn bởi HLA, phương pháp này bao gồm các bước: tạo miễn dịch cho động vật có vú không phải người được thiết kế di truyền có các tế bào biểu hiện phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc II ở người nêu trên bằng dạng hòa tan của phân tử MHC nhóm I hoặc II được tạo phức với kháng nguyên được giới hạn bởi HLA nêu trên; phân lập các phân tử ARN thông tin từ các tế bào tạo ra kháng thể của động vật có vú không phải người nêu trên; tạo ra thư viện biểu hiện thể thực khuẩn biểu hiện các phân tử protein được mã hóa bởi các phân tử ARN thông tin nêu trên; và phân lập ít nhất một thể thực khuẩn ra khỏi thư viện biểu hiện thể thực khuẩn nêu trên, ít nhất một thể thực khuẩn nêu trên biểu hiện kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc nhóm II ở người nêu trên được tạo phức với kháng nguyên giới hạn HLA nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc II ở người được tạo phức với kháng nguyên giới hạn HLA, trong đó tốt hơn nếu kháng thể này là kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể thể khảm.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc II ở người được tạo phức với kháng nguyên được giới hạn bởi HLA nêu trên, phương pháp này bao gồm các bước: tạo miễn dịch cho động vật có vú không phải người được thiết kế di

truyền chứa tế bào biểu hiện phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc II ở người nêu trên bằng dạng hòa tan của phân tử MHC nhóm I hoặc II được tạo phức với kháng nguyên giới hạn HLA nêu trên; phân lập các phân tử ARN thông tin từ các tế bào tạo ra kháng thể của động vật có vú không phải người nêu trên; tạo ra thư viện biểu hiện thể thực khuẩn biểu hiện các phân tử protein được mã hóa bởi các phân tử ARN thông tin nêu trên; và phân lập ít nhất một thể thực khuẩn ra khỏi thư viện biểu hiện thể thực khuẩn này, ít nhất một thể thực khuẩn nêu trên biểu hiện kháng thể có thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc II ở người nêu trên được tạo phức với kháng nguyên giới hạn HLA nêu trên. Các phương pháp tương ứng để tạo ra kháng thể này và các phức hợp tương thích mô chính nhóm I chuỗi đơn, cũng như các công cụ khác để tạo ra các kháng thể này được bộc lộ trong các công bố đơn quốc tế số WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, và các tài liệu: Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denzberg et al., 2003).

Tốt hơn nếu kháng thể này gắn kết với phức hệ, với ái lực gắn kết nhỏ hơn 20 nanomol, tốt hơn là nhỏ hơn 10 nanomol, được cho là “đặc hiệu” trong ngữ cảnh của sáng chế.

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 trên thể thực khuẩn có thể được sử dụng (US 2010/0113300, Liddy et al., 2012). Nhằm mục đích làm ổn định các thụ thể tế bào T trong khi biểu hiện trên 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 (xem tài liệu Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Thụ thể tế bào T có thể được liên kết với các độc tố, được chất, xytokin (ví dụ, xem công bố sáng chế Mỹ số US 2013/0115191), các miền tập hợp các tế bào hiệu ứng như miền kháng CD3, v.v., để thực hiện chức năng cụ thể trên các tế bào đích. Ngoài ra, nó có thể được biểu hiện ở các tế bào T dùng để chuyển mược. Thông tin thêm có thể được tìm thấy trong các công bố đơn quốc tế số WO

2004/033685A1 và WO 2004/074322A1. Tổ hợp của các thụ thể TCR hòa tan được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2012/056407A1. Các phương pháp tạo ra khác được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2013/057586A1.

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.

Để chọn lọc các peptit được trình diện quá mức, profin trình diện tính được cho thấy sự trình diện của mẫu trung bình cũng như sự biến đổi lặp lại. Để profin của các mẫu thực thể khối u quan tâm và đường gốc của các mẫu mô bình thường cạnh nhau. Sau đó, mỗi profin này có thể được hợp nhất thành điểm số của sự trình diện quá mức bằng cách tính giá trị p của mô hình hiệu quả hỗn hợp tuyến tính (Pinheiro et al., 2007) điều chỉnh cho nhiều thử nghiệm bằng tỷ lệ phát hiện sai (Benjamini and Hochberg, 1995).

Để xác định và định lượng tương đối các phối tử của HLA bằng phương pháp phổ khối lượng, các phân tử HLA từ mẫu mô được đông lạnh sốc được tinh chế và các peptit liên quan đến HLA được phân lập. Các peptit phân lập được tách ra và trình tự được xác định bằng các thử nghiệm sắc ký lỏng-phổ khối lượng (liquid chromatography-mass spectrometry: LC-MS) ion hóa phun điện tử nano (nano-electrospray-ionization: nanoESI) trực tuyến. Các peptit trình tự tạo thành được kiểm tra bằng cách so sánh mẫu phân mảnh của TUMAP tự nhiên ghi được từ các mẫu HCC (N = 16 mẫu dương tính với A*02 bao gồm cả 13 mẫu dương tính với A*02:01, N = 15 mẫu dương tính với A*24) với các mẫu phân mảnh của các peptit tham chiếu tổng hợp tương ứng của các trình tự giống nhau. Do các peptit được xác định trực tiếp được xác định trực tiếp dưới dạng phối tử của các phân tử HLA của khối u nguyên phát, các kết quả này cung cấp bằng chứng trực tiếp về việc xử lý và trình diện tự nhiên của các peptit được xác định trên mô ung thư nguyên phát thu được từ 31 bệnh nhân HCC.

Thiết bị phát hiện XPRESIDENT® v2.1 (ví dụ, xem công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2013-0096016) cho phép xác định và chọn lọc các ứng viên vacxin peptit được trình diện quá mức liên quan trên cơ sở định lượng tương đối trực tiếp lượng peptit giới hạn bởi HLA trên các mô ung thư so với một vài mô và cơ quan không ung thư khác nhau. Điều này đạt được bằng cách phát triển phương pháp định lượng khác

nhau không đánh dấu bằng cách sử dụng dữ liệu LC-MS thu được được xử lý bằng chương trình phân tích dữ liệu độc quyền, kết hợp các thuật toán để xác định trình tự, phân cụm phổ, đếm ion, dóng thẳng hàng thời gian duy trì, giải phóng trạng thái tích điện và chuẩn hóa.

Mức độ trình diện bao gồm cả sai số ước tính đối với mỗi peptit và mẫu được thiết lập. Các peptit chỉ được trình diện trên mô khối u và các peptit được trình diện quá mức trong khối u so với các cơ quan và mô không ung thư đã được xác định.

Các phức hợp HLA-peptit lấy từ các mẫu mô HCC được tinh chế và các peptit liên quan đến HLA được phân lập và phân tích bằng phương pháp LC-MS (xem các ví dụ). Tất cả các peptit TUMAP theo sáng chế được xác định bằng phương pháp này trên các mẫu HCC nguyên phát đều khẳng định sự trình diện của chúng trên HCC nguyên phát.

TUMAP được xác định trên nhiều khối u HCC và các mô bình thường được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp đếm ion theo các số liệu LC-MS không đánh dấu. Phương pháp này giả định rằng các đỉnh tín hiệu LC-MS của peptit có tương quan với sự có mặt quá nhiều của chúng trong mẫu. Tất cả các tín hiệu định lượng của peptit trong các thử nghiệm LC-MS khác nhau đều được chuẩn hóa trên cơ sở xu hướng trung tâm, được tính trung bình theo mỗi mẫu và được hợp nhất thành biểu đồ cột, được gọi là profin trình diện. Profin trình diện này hợp nhất các phương pháp phân tích khác nhau như tìm kiếm cơ sở dữ liệu protein, phân cụm phổ, giải phóng trạng thái tích điện (khử tích điện) và dóng thẳng hàng thời gian duy trì và chuẩn hóa.

Sáng chế đề xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, hoặc biến thể của nó có độ tương đồng (tốt hơn là mức độ giống) về trình tự ít nhất là 90% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300 hoặc biến thể của nó gây ra phản ứng chéo của các tế bào T với peptit nêu trên, trong đó peptit này không là polypeptit cơ bản có chiều dài đầy đủ.

Sáng chế còn đề xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300 hoặc biến thể của nó có độ tương đồng (tốt hơn là mức độ giống) về trình tự ít nhất là 90% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, trong đó peptit hoặc biến thể này có từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là từ 8 đến 30 axit amin, và tốt nhất là từ 8 đến 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài

mạch.

Sáng chế còn đề xuất các peptit như được bộc lộ ở đây có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm-I hoặc nhóm –II ở người.

Sáng chế còn đề xuất các peptit như được bộc lộ ở đây trong đó peptit này bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300.

Sáng chế còn đề xuất các peptit như được bộc lộ ở đây, trong đó peptit này được cải biến (bằng phương pháp hóa học) và/hoặc bao gồm các liên kết không peptit.

Sáng chế còn đề xuất các peptit như được bộc lộ ở đây, trong đó peptit này là một phần của protein dung hợp, cụ thể là chứa axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii), hoặc trong đó peptit này được dung hợp với (hoặc vào) kháng thể, ví dụ như kháng thể đặc hiệu với tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic mã hóa các peptit như được bộc lộ ở đây, với điều kiện là peptit này không là protein hoàn toàn (đầy đủ) của người.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic như được bộc lộ ở đây, axit này là ADN, ADN bổ trợ, APN, ARN hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic như được bộc lộ ở đây.

Sáng chế còn đề xuất peptit như được bộc lộ ở đây, axit nucleic như được bộc lộ ở đây hoặc vector biểu hiện như được bộc lộ ở đây để dùng làm thuốc, cụ thể là để điều trị bệnh HCC.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic như được bộc lộ ở đây hoặc vector biểu hiện như được bộc lộ ở đây.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ như được bộc lộ ở đây là tế bào trình diện kháng nguyên, và tốt hơn nếu là tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp như được bộc lộ ở đây, trong đó kháng nguyên được tải lên các phân tử MHC nhóm I hoặc II được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp bằng cách cho kháng nguyên với lượng đủ tiếp xúc với tế bào trình diện kháng nguyên.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp như được bộc lộ ở đây, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên chứa vector biểu hiện có khả năng biểu hiện peptit nêu trên chứa các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300 hoặc trình tự axit amin biến thể

của nó.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng peptit bất kỳ đã mô tả, axit nucleic như được bộc lộ ở đây, vector biểu hiện như được bộc lộ ở đây, tế bào như được bộc lộ ở đây, hoặc tế bào lymphô T hoạt tính gây độc tế bào như được bộc lộ ở đây làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng như được bộc lộ ở đây, trong đó thuốc này có hoạt tính chống ung thư.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng như được bộc lộ ở đây, trong đó thuốc này là vaccin. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng như được bộc lộ ở đây, trong đó thuốc này có hoạt tính chống ung thư.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng như được bộc lộ ở đây, trong đó các tế bào ung thư nêu trên là tế bào HCC hoặc tế bào khối u huyết học hoặc khối u dạng rắn khác như bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư não, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, hoặc bệnh bạch cầu.

Sáng chế còn đề xuất các protein đánh dấu và dấu ấn sinh học cụ thể trên cơ sở các peptit như được bộc lộ ở đây, được gọi ở đây là “đích” có thể được sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc tiên lượng HCC. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng các đích mới này để điều trị bệnh ung thư.

Thuật ngữ “kháng thể” hoặc “các kháng thể” được sử dụng ở đây theo nghĩa rộng và bao gồm cả kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng. Ngoài các phân tử globulin miễn dịch nguyên vẹn hoặc “đầy đủ” cũng được bao gồm trong thuật ngữ “kháng thể” là các đoạn kháng thể (ví dụ, các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR), đoạn Fv, đoạn Fab và đoạn Fc) hoặc các polyme của các phân tử globulin miễn dịch này và các phiên bản được làm cho giống kháng thể của người của phân tử globulin miễn dịch, miễn là chúng có đặc tính bất kỳ trong số các đặc tính mong muốn (ví dụ, sự gắn kết đặc hiệu của polypeptit của dấu ấn HCC, cung cấp độc tố đến tế bào HCC biểu hiện gen đánh dấu ung thư ở mức cao, và/hoặc ức chế hoạt tính của polypeptit của gen đánh dấu HCC) như được bộc lộ ở đây.

Kháng thể theo sáng chế có thể được mua từ các nguồn thương mại bất cứ khi nào. Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các polypeptit của gen đánh dấu HCC có chiều dài đầy đủ hoặc các đoạn của nó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế. Polypeptit được sử dụng để tạo ra

kháng thể theo sáng chế có thể được tinh chế một phần hoặc hoàn toàn ra khỏi nguồn tự nhiên, hoặc có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Ví dụ, peptit mã hóa ADN bổ trợ như được bộc lộ ở đây, như peptit theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, polypeptit, hoặc biến thể hoặc đoạn của nó, có thể được biểu hiện ở các tế bào không nhân (ví dụ, vi khuẩn) hoặc các tế bào có nhân điển hình (ví dụ, các tế bào nấm men, côn trùng, hoặc động vật có vú), mà sau đó protein tái tổ hợp có thể được tinh chế và sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng để gắn kết đặc hiệu với polypeptit của gen đánh dấu HCC được sử dụng để tạo ra kháng thể như được bộc lộ ở đây.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sự tạo ra một hoặc nhiều tập hợp khác nhau của kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đơn dòng làm tăng tối đa khả năng thu được kháng thể có độ đặc hiệu và ái lực cần thiết cho mục đích dự định của nó (ví dụ, thử nghiệm ELISA, hóa mô miễn dịch, chụp ảnh *in vivo*, liệu pháp kháng độc tố). Các kháng thể được thử nghiệm về hoạt tính mong muốn của chúng bằng các phương pháp đã biết, theo mục đích mà kháng thể này cần được sử dụng (ví dụ, thử nghiệm ELISA, hóa mô miễn dịch, liệu pháp miễn dịch, v.v.; để biết thêm hướng dẫn về việc tạo ra và thử nghiệm kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Harlow and Lane, 2013). Ví dụ, các kháng thể có thể được thử nghiệm trong thử nghiệm ELISA, phép thấm tách Western, nhuộm hóa mô miễn dịch bệnh ung thư được cố định trong formalin hoặc phần mô đông lạnh. Sau khi xác định tính chất ban đầu của chúng *in vitro*, kháng thể được dự định cho mục đích điều trị hoặc chẩn đoán *in vivo* được sử dụng theo các phương pháp thử nghiệm trong lâm sàng đã biết.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" để chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể gần như đồng nhất, nghĩa là các kháng thể riêng biệt chứa quần thể là giống nhau ngoại trừ sự đột biến có thể có trong tự nhiên nhưng có thể có mặt với lượng rất nhỏ. Các kháng thể đơn dòng ở đây cụ thể bao gồm các kháng thể "thể khảm" trong đó phần chuỗi nặng và/hoặc nhẹ là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ loài cụ thể hoặc thuộc về nhóm hoặc phân nhóm kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi này là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác hoặc thuộc về nhóm hoặc phân nhóm kháng thể, cũng như các đoạn của kháng thể này, miễn là chúng có hoạt tính đối kháng mong

muốn (Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.816.567).

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp lai. Trong phương pháp lai, chuột hoặc động vật chủ thích hợp khác thường được tạo miễn dịch bằng chất gây miễn dịch để tạo ra các tế bào lymphô để tạo ra hoặc có khả năng tạo ra kháng thể mà sẽ gắn kết đặc hiệu với chất gây miễn dịch. Theo cách khác, các tế bào lymphô có thể được tạo miễn dịch *in vitro*.

Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp ADN tái tổ hợp, như các phương pháp được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.816.567. ADN mã hóa các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được phân lập dễ dàng và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng đoạn dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột).

Các phương pháp *in vitro* cũng thích hợp để tạo ra tạo ra kháng thể hóa trị một. Sự phân giải kháng thể để tạo ra các đoạn kháng thể của nó, cụ thể là các đoạn Fab, có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Chẳng hạn, sự phân giải có thể được thực hiện bằng cách sử dụng papain. Các ví dụ về sự phân giải papain được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 94/29348 và Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.342.566. Sự phân giải papain của kháng thể thường tạo ra hai đoạn gắn kết kháng nguyên giống nhau, được gọi là đoạn Fab, mỗi đoạn này có một vị trí gắn kết kháng nguyên, và đoạn Fc còn lại. Việc điều trị bằng pepsin tạo ra đoạn F(ab')₂ và đoạn pFc'.

Các đoạn kháng thể, bất kể được gắn kết với các trình tự hay không, cũng có thể bao gồm sự xen đoạn, sự khuyết đoạn, sự thay thế đoạn, hoặc các cải biến được chọn khác của vùng cụ thể hoặc hoặc các gốc axit amin cụ thể, với điều kiện là hoạt tính của đoạn này không bị thay đổi hoặc ảnh hưởng đáng kể so với kháng thể hoặc đoạn kháng thể không được cải biến. Các cải biến này có thể tạo ra một số đặc tính bổ sung như loại bỏ/bổ sung thêm axit amin có khả năng liên kết disulfua, để làm gia tăng tuổi thọ sinh học của nó, để làm thay đổi đặc tính tiết ra của nó, v.v.. Trong trường hợp bất kỳ, đoạn kháng thể phải có đặc tính về hoạt tính sinh học, như hoạt tính gắn kết, sự điều hòa gắn kết ở vùng gắn kết, v.v.. Các vùng chức năng hoặc có hoạt tính của kháng thể này có thể được xác định bằng cách gây đột biến vùng đặc hiệu của protein, sau đó biểu hiện và thử nghiệm polypeptit được biểu hiện. Các

phương pháp này đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ và có thể bao gồm cả sự gây đột biến đặc hiệu vị trí của axit nucleic mã hóa đoạn kháng thể.

Kháng thể theo sáng chế có thể còn bao gồm kháng thể của người hoặc kháng thể được làm cho giống kháng thể của người. Các dạng kháng thể không phải của người (ví dụ, của chuột) được làm cho giống kháng thể của người là các globulin miễn dịch thể khảm, chuỗi globulin miễn dịch hoặc các đoạn của nó (như đoạn Fv, Fab, Fab' hoặc các trình tự nhỏ gắn kết kháng nguyên khác của kháng thể) chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người. Các kháng thể được làm cho giống kháng thể của người bao gồm globulin miễn dịch của người (kháng thể thể nhận) trong đó các gốc từ vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) của kháng thể thể nhận được thay thế bằng các gốc từ vùng CDR của loài không phải người (kháng thể thể cho) như chuột nhắt, chuột hoặc thỏ có độ đặc hiệu, ái lực và khả năng mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc của khung Fv (Fv framework: FR) của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải của người tương ứng. Kháng thể được làm cho giống kháng thể của người cũng có thể chứa các gốc không được tìm thấy trong trình tự kháng thể thể nhận hoặc trong các trình tự được nhập khẩu CDR hoặc trình tự khung. Nói chung, kháng thể được làm cho giống kháng thể của người sẽ chủ yếu bao gồm toàn bộ ít nhất một, và thường là hai, vùng biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc gần như toàn bộ các vùng CDR tương ứng với các vùng của globulin miễn dịch không phải của người và toàn bộ hoặc gần như toàn bộ các vùng FR là các vùng của trình tự liên ứng của globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm cho giống kháng thể của người tối ưu cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định (Fc) của globulin miễn dịch, thường là các vùng của globulin miễn dịch của người.

Các phương pháp làm cho kháng thể không phải của người giống với kháng thể của người là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Nói chung, kháng thể được làm cho giống kháng thể của người có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào nó từ nguồn không phải của người. Các gốc axit amin không phải của người này thường được gọi là gốc "nhập khẩu", các gốc này thường được lấy từ vùng biến đổi "nhập khẩu". Việc làm cho giống với kháng thể của người có thể được thực hiện chủ yếu bằng cách thay thế các vùng CDR hoặc trình tự CDR của động vật gặm nhấm cho các

trình tự tương ứng của kháng thể của người. Do đó, các kháng thể "được làm cho giống kháng thể của người" này là kháng thể thể khảm (Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.816.567), trong đó vùng biến đổi nguyên vẹn của người được thay thế ít hơn đáng kể bằng trình tự tương ứng từ các loài không phải người. Trên thực tế, kháng thể được làm cho giống kháng thể của người thường là kháng thể của người trong đó một số gốc CDR và có thể là một số gốc FR được thay thế bằng các gốc từ các vị trí tương tự ở kháng thể của động vật gặm nhấm.

Các động vật chuyển gen (ví dụ, chuột nhắt), khi được tạo miễn dịch, có khả năng tạo ra kho đầy đủ của kháng thể của người khi không có sự tạo ra globulin miễn dịch nội sinh có thể được sử dụng. Ví dụ, sự cạn kiệt của gen xác định tính trạng ở vùng ghép nối của chuỗi nặng của kháng thể ở chuột nhắt đột biến thể khảm và dòng phôi đã được mô tả là tạo ra sự ức chế hoàn toàn quá trình sản sinh kháng thể nội sinh. Sự chuyển mẫn gen globulin miễn dịch ở chuột nhắt đột biến dòng phôi này sẽ dẫn đến sự tạo ra kháng thể của người khi thách thức kháng nguyên. Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra trong thư viện biểu hiện trên thể thực khuẩn.

Tốt hơn nếu kháng thể theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng trong chất mang được dụng. Thông thường, lượng thích hợp của muối được dụng được sử dụng trong sản phẩm để tạo ra sản phẩm đẳng trương. Ví dụ về các chất mang được dụng bao gồm nước muối, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Tốt hơn nếu độ pH của dung dịch nằm trong khoảng từ 5 đến 8, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 7 đến 7.5. Các chất mang khác bao gồm các thành phần giải phóng duy trì như nền bán thấm của polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, các nền đã được tạo hình từ trước, ví dụ, màng, liposom hoặc vi hạt. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng một số chất mang nhất định có thể được ưu tiên hơn, tùy theo, ví dụ, đường sử dụng và nồng độ kháng thể được sử dụng.

Các kháng thể có thể được sử dụng cho đối tượng, bệnh nhân, hoặc tế bào bằng cách tiêm (ví dụ, tiêm qua đường trong tĩnh mạch, trong màng bụng, dưới da, trong cơ), hoặc bằng các phương pháp khác như tiêm truyền để đảm bảo rằng sự cung cấp của nó vào dòng máu ở dạng hữu hiệu. Kháng thể cũng có thể được sử dụng qua đường trong khối u hoặc quanh khối u, để có hiệu quả điều trị khu trú cũng như hiệu quả điều trị toàn thân. Phương pháp tiêm tại chỗ hoặc qua đường trong tĩnh mạch là được ưu tiên.

Liều dùng hữu hiệu và chế độ sử dụng kháng thể có thể được xác định theo kinh nghiệm, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết cách xác định này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng liều dùng của kháng thể cần được sử dụng sẽ thay đổi tùy theo, ví dụ, đối tượng sẽ nhận kháng thể, đường sử dụng, loại kháng thể cụ thể được sử dụng và các dược chất khác được sử dụng. Liều dùng hàng ngày thông thường của kháng thể được sử dụng một mình có thể nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến tối đa 100 mg/kg thể trọng hoặc cao hơn mỗi ngày, tùy theo các yếu tố nêu trên. Khi sử dụng kháng thể, tốt hơn là để điều trị HCC, hiệu quả của kháng thể điều trị có thể được đánh giá theo nhiều cách khác nhau mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết rõ. Chẳng hạn, kích thước, số lượng và/hoặc sự phân bố bệnh ung thư ở đối tượng được điều trị có thể được theo dõi bằng cách sử dụng kỹ thuật hình ảnh khối u chuẩn. Kháng thể được sử dụng để điều trị bệnh làm ngừng sự phát triển của khối u, làm cho khối u nhỏ lại, và/hoặc ngăn ngừa sự phát triển của khối u mới, so với sự diễn biến của bệnh sẽ xuất hiện khi không sử dụng kháng thể, là kháng thể có hiệu quả để điều trị bệnh ung thư.

Do các peptit như được nêu trong các bảng trên đây của sáng chế và các polypeptit cơ bản được biểu hiện ở mức cao ở HCC, và được biểu hiện ở mức từ khá thấp đến rất thấp ở các tế bào bình thường, sự ức chế protein được chọn từ nhóm bao gồm các sản phẩm protein của các gen sau đây: sự ức chế được ưu tiên là ức chế của kháng thể và/hoặc thụ thể TCR đối với GLUL, GPAM, PLIN2, SLC16A1, SLC9A3R1, PCBD1, SEC16A, AKR1C4, ABCB11, HAL, CYP2E1, C4A, C4B, ALDH1L1, CRP, ACSL4, EEF2, HLTF, FBXO22, GALK1, TMC01, TMEM33, ZNF318, IPO9, AMACR, C1QTNF3, CYP4F8, CYP4F3, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, MOCOS, A1CF, COL18A1, HPR, LBP, C19orf80, CFHR5, ITIH4, TMEM110, LARP4, LMF2, SLC10A5, và SLC16A11; được ưu tiên hơn nữa là sự ức chế của kháng thể và/hoặc thụ thể TCR đối với ANKFY1, C12orf44, C16orf58, CPSF1, DCAF8, PEX19, DDX11, DDX12P, DECR2, NME4, DENND5B, DYM, EDC4, ERI3, FAM20A, FNDC3A, GPR107, GYG2, HEATR2, IFT81, KCTD3, SHKBP1, KIAA1324L, KLHL24, MARCH6, MBTPS2, MIR1279, CPSF6, NOC4L, NXF1, PANK2, PCNXL3, PIPSL, PSMD4, PSMD14, SLC35B1, TCP11L2, THNSL2, THOC2, TOMM5, TRAPPC6B, TRIM54, TRIM55, TRIM63, UGGT2, URB1, VPS54, WIZ, ZNF451, RFTN2, SCFD1, SERINC5, CCT7P2, CMAS,

ANKS1A, C17orf70, CCT7, CDK5RAP2, CLPTM1, và được ưu tiên nhất là sự ức chế của kháng thể và/hoặc thụ thể TCR đối với APOB, FASN, và/hoặc COPA; và tốt hơn nếu sự biểu hiện hoặc hoạt tính của các gen đánh dấu này có thể được hợp nhất vào chiến lược điều trị, ví dụ, để điều trị hoặc phòng ngừa HCC.

Nguyên lý của liệu pháp đối nghĩa là dựa trên giả thuyết rằng sự ức chế đặc hiệu-trình tự của sự biểu hiện gen (bằng quá trình phiên mã hoặc dịch mã) có thể đạt được bằng cách lai nội bào giữa ADN hệ gen hoặc ARN thông tin và các loài đối nghĩa bổ trợ. Sự tạo ra axit nucleic sợi kép thể lai này cản trở sự phiên mã của ADN hệ gen mã hóa kháng nguyên của khối u đích, hoặc xử lý/vận chuyển/dịch mã và/hoặc tính ổn định của ARN thông tin của kháng nguyên của mô đích.

Các axit nucleic đối nghĩa có thể được cung cấp bằng nhiều phương pháp khác nhau. Ví dụ, các oligonucleotit đối nghĩa hoặc ARN đối nghĩa có thể được sử dụng trực tiếp (ví dụ, bằng cách tiêm qua đường trong tĩnh mạch) cho đối tượng ở dạng cho phép hấp thu vào các tế bào khối u. Theo cách khác, virus hoặc vector plasmid mã hóa ARN (hoặc đoạn ARN) đối nghĩa có thể được đưa vào tế bào *in vivo*. Hiệu quả đối nghĩa cũng có thể được tạo ra bằng các trình tự cùng chiều; tuy nhiên, mức độ thay đổi kiểu hình là lớn. Sự thay đổi kiểu hình được tạo bởi liệu pháp đối nghĩa hữu hiệu được đánh giá theo sự thay đổi, ví dụ, về mức ARN thông tin đích, mức protein đích, và/hoặc mức độ hoạt tính của protein đích.

Theo một ví dụ cụ thể, sự ức chế chức năng đích/gen đánh dấu HCC bằng liệu pháp gen đối nghĩa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng trực tiếp ARN của gen đánh dấu khối u đối nghĩa cho đối tượng. ARN của gen đánh dấu khối u đối nghĩa này có thể được tạo ra và phân lập bằng kỹ thuật chuẩn bất kỳ, nhưng được tạo ra dễ dàng nhất là bằng cách phiên mã *in vitro* bằng cách sử dụng ADN bổ trợ của gen đánh dấu khối u đối nghĩa với sự kiểm soát của gen khởi đầu có hiệu quả cao (ví dụ, gen khởi đầu T7). Việc sử dụng ARN của gen đánh dấu khối u đối nghĩa cho tế bào có thể được tiến hành bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp sử dụng axit nucleic trực tiếp được mô tả dưới đây.

Liệu pháp thay thế để ức chế chức năng của protein được chọn từ nhóm bao gồm các protein nêu trên, và được ưu tiên nhất là APOB, FASN, và/hoặc COPA, bao gồm việc sử dụng axit nucleic (ví dụ siRNA, hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể kháng protein hoặc một phần của nó mà có thể được chuyển vào các tế bào ung thư

hoặc tế bào khác, dẫn đến sự biểu hiện và tiết ra kháng thể nội bào), protein hoặc phân tử nhỏ, hoặc hợp chất khác bất kỳ hướng đích sự biểu hiện, dịch mã, và/hoặc chức năng sinh học của protein này.

Trong các phương pháp đã mô tả trên đây, bao gồm việc sử dụng và hấp thu ADN ngoại sinh vào tế bào của đối tượng (nghĩa là, sự tải nạp hoặc chuyển nhiễm gen), các axit nucleic theo sáng chế có thể ở dạng ADN trần hoặc các axit nucleic có thể ở trong vector để cung cấp các axit nucleic này đến tế bào để ức chế sự biểu hiện protein của gen đánh dấu HCC. Vector có thể là sản phẩm có bán trên thị trường, như vector adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canada)). Sự cung cấp axit nucleic hoặc vector đến tế bào có thể bằng nhiều cơ chế khác nhau. Theo một ví dụ, sự cung cấp có thể qua liposom, bằng cách sử dụng các sản phẩm liposom có bán trên thị trường như Lipofectin, Lipofectamin (GIBCO-25 BRL, Inc., Gaithersburg, Md.), Superfect (Qiagen, Inc. Hilden, Đức) và Transfectam (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis., Mỹ), cũng như các liposom khác được phát triển theo quy trình chuẩn trong lĩnh vực này. Ngoài ra, axit nucleic hoặc vector theo sáng chế này có thể được cung cấp *in vivo* bằng phương pháp xung điện, công nghệ này có sẵn từ Genetronics, Inc. (San Diego, Mỹ) cũng như bằng máy Sonoporation (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Arizona, Mỹ).

Theo một ví dụ, sự giải phóng vector có thể là qua hệ virus, như hệ vector retrovirus mà có thể bao gói hệ gen của retrovirus tái tổ hợp. Sau đó, retrovirus tái tổ hợp có thể được sử dụng để gây nhiễm và nhờ đó giải phóng axit nucleic đối nghĩa đến các tế bào được gây nhiễm để ức chế sự biểu hiện của protein được chọn từ nhóm bao gồm các protein nêu trên. Tất nhiên là phương pháp chính xác để đưa axit nucleic được biến đổi vào các tế bào của động vật có vú không bị giới hạn bởi việc sử dụng các vector retrovirus. Các kỹ thuật khác được sử dụng rộng rãi cho quy trình này bao gồm sử dụng vector adenovirus, các vector của virus liên quan đến adenovirus (adenovirus-associated viral: AAV), vector lentivirus, vector retrovirus kiểu giả. Các kỹ thuật tải nạp vật lý cũng có thể được sử dụng, như cơ chế giải phóng liposom và cơ chế qua trung gian thụ thể và các cơ chế nhập nội bào khác. Sáng chế này có thể được sử dụng kết hợp với phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này hoặc các phương pháp chuyển gen thường được sử dụng khác.

Kháng thể 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, 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 (K_d) là nhỏ hơn $1 \times 10\mu\text{M}$.

Kháng thể 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 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, đồng vị phóng xạ, vàng, gadolini và các hợp chất lanthanit khác, sắt thuận từ, flo-18 và chất đồng vị phóng xạ phát ra positron. 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 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 bao gồm sự liên kết cộng hóa trị với đoạn dò, sự kết hợp đoạn dò vào kháng thể, 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 được 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.

Do đó, như đã nêu trên đây, sáng chế đề xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300 hoặc biến thể của nó có mức độ tương đồng 90% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, hoặc biến thể của nó mà sẽ gây ra phản ứng chéo của tế bào T với peptit này. Các peptit theo sáng chế có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm -I ở người hoặc phiên bản được kéo dài của các peptit này với nhóm II.

Theo sáng chế, thuật ngữ “độ tương đồng” để chỉ mức độ đồng nhất (xem tỷ lệ % 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 dóng 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 dóng 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 (Fong et al. 2001; Zaremba et al. 1997; Colombetti et al. 2006; Appay et al. 2006).

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 gồm các trình tự axit amin nhất định gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300. Ví dụ, peptit có thể được cải biến sao cho nó ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng tương tác với và gắn kết với rãnh liên 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.

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 được xác định theo các khía cạnh của sáng chế. Như có thể thu được từ các tài liệu khoa học (Godkin et al. 1997) 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, kỵ nước và cấu hình không gian của các chuỗi polypeptit tạo thành rãnh liên kết. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể cải biến trình tự axit amin nêu trong các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO

300, bằng cách giữ nguyên các gốc dạng neo đã biết, và sẽ có thể xác định xem các biến thể này có duy trì khả năng gắn kết với các phân tử MHC nhóm I hoặc II hay không. Các biến thể theo sáng chế vẫn duy trì khả năng gắn kết với thụ thể TCR của các tế bào T hoạt hóa, mà sau đó chúng 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 được xác định theo các khía cạnh của sáng chế.

Các gốc axit amin không góp phần đáng kể vào sự tương tác với thụ thể tế bào T có thể được cải biến bằng cách thay thế bằng axit amin khác mà sự kết hợp này không làm ảnh hưởng đáng kể đến khả năng phản ứng của tế bào T và không làm mất sự gắn kết với MHC thích hợp. Do đó, ngoài các điều kiện đã đưa ra, peptit theo sáng chế có thể là peptit bất kỳ (theo thuật ngữ bao gồm oligopeptit hoặc polypeptit), bao gồm các trình tự axit amin hoặc phần hoặc biến thể của nó như đã nêu.

Các gốc axit amin không góp phần đáng kể vào sự tương tác với thụ thể TCR có thể được cải biến bằng cách thay thế bằng axit amin khác mà sự kết hợp của nó không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng phản ứng của tế bào T và không làm mất sự gắn kết với MHC thích hợp. Do đó, ngoài các điều kiện đã đưa ra, peptit theo sáng chế có thể là peptit bất kỳ (theo thuật ngữ bao gồm oligopeptit hoặc polypeptit), bao gồm các trình tự axit amin hoặc phần hoặc biến thể của nó như đã nêu.

Các peptit dài hơn cũng có thể thích hợp. Các epitop của MHC nhóm I, mặc dù thường có từ 8 đến 11 axit amin trong chiều dài mạch, cũng có thể được tạo ra bằng cách xử lý peptit từ các peptit hoặc protein dài hơn bao gồm epitop thực tế. Tốt hơn nếu các gốc nằm rìa epitop thực tế là các gốc gần như không ảnh hưởng đến sự phân giải protein cần thiết để tiếp xúc với epitop trong khi xử lý.

Theo đó, sáng chế đề xuất các peptit và biến thể của epitop của MHC nhóm I, trong đó peptit hoặc biến thể này có từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là có từ 8 đến 30 axit amin, và được ưu tiên nhất là có từ 8 đến 14 axit amin, cụ thể là có 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch, trong trường hợp các peptit liên kết với nhóm II được kéo dài, nó cũng có thể có 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 hoặc 22 axit amin trong chiều dài mạch.

Tất nhiên là peptit hoặc biến thể theo sáng chế sẽ có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc II ở người.

Sự gắn kết của peptit hoặc biến thể với phức hợp MHC có thể được thử nghiệm

bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế, peptit bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300.

Thuật ngữ “chủ yếu bao gồm” sẽ có nghĩa là, ngoài trình tự theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO 300 hoặc biến thể của nó, peptit theo sáng chế chứa các đoạn axit amin nằm ở đầu tận cùng N- và/hoặc C bổ sung là các đoạn không nhất thiết tạo thành một phần của peptit có chức năng làm epitop đối với epitop của phân tử MHC.

Tuy nhiên, các đoạn này có thể là quan trọng để đưa hữu hiệu peptit theo sáng chế vào tế bào. Theo một phương án của sáng chế, peptit là một phần của protein dung hợp bao gồm, ví dụ, 80 axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (p33, trong phần “Ii” sau đây) khi có nguồn gốc từ NCBI, mã số truy cập ngân hàng gen là X00497. Trong các sản phẩm dung hợp khác, peptit theo sáng chế có thể được dung hợp với kháng thể như được mô tả ở đây, hoặc phần chức năng của nó, cụ thể là vào trình tự của kháng thể, để được hướng đích đặc hiệu bằng kháng thể này, hoặc ví dụ, dung hợp với hoặc vào kháng thể đặc hiệu với tế bào đuôi gai như được mô tả ở đây.

Ngoài ra, peptit hoặc biến thể có thể được cải biến thêm để cải thiện độ ổn định và/hoặc sự gắn kết với các phân tử MHC để tạo ra mức độ đáp ứng miễn dịch mạnh hơn. Các phương pháp để tối ưu hóa trình tự peptit này là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, việc đưa liên kết peptit ngược hoặc liên kết không phải peptit vào.

Trong liên kết peptit ngược, các gốc axit amin không được liên kết bằng các liên kết peptit (-CO-NH-) mà liên kết peptit này bị đảo ngược. Các chất bắt chước peptit ngược-đảo ngược này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ như các chất được mô tả trong tài liệu của Meziere và các đồng tác giả (1997). Phương pháp này liên quan đến việc tạo ra chất giả peptit có sự thay đổi liên quan đến khung chính, và không có sự định hướng của mạch bên. Tài liệu của Meziere và các đồng tác giả (1997) cho thấy rằng sự gắn kết với MHC và các đáp ứng của tế bào T hỗ trợ, các chất giả peptit là hữu ích. Các peptit ngược-đảo ngược, chứa các liên kết NH-CO thay cho liên kết peptit CO-NH, có độ bền với sự

phân giải protein tốt hơn.

Các liên kết không phải peptit là, ví dụ, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH=CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$, và $-\text{CH}_2\text{SO-}$. Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.897.445 đề xuất phương pháp tổng hợp pha rắn của các liên kết không phải peptit ($-\text{CH}_2\text{-NH}$) trong chuỗi polypeptit, phương pháp này liên quan đến việc các polypeptit được tổng hợp bằng phương pháp chuẩn và các liên kết không phải peptit này được tổng hợp bằng cách cho aldehyt amin phản ứng với axit amin với sự có mặt của NaCNBH_3 .

Các peptit chứa trình tự được mô tả trên đây có thể được tổng hợp bằng các nhóm hóa học bổ sung có mặt ở đầu tận cùng amin và/hoặc carboxy của chúng, để làm tăng độ ổn định, độ sinh khả dụng, và/hoặc ái lực của các peptit. Ví dụ, các nhóm kỵ nước như nhóm carbobenzoxy, dansyl, hoặc t-butyloxycarbonyl có thể được bổ sung vào đầu tận cùng amin của peptit. Tương tự, nhóm axetyl hoặc nhóm 9-florenylmethoxy-carbonyl có thể được thay thế ở đầu tận cùng amin của peptit. Ngoài ra, nhóm kỵ nước, nhóm t-butyloxycarbonyl, hoặc nhóm amido có thể được bổ sung vào đầu tận cùng carboxy của peptit.

Ngoài ra, các peptit theo sáng chế cũng có thể được tổng hợp để làm thay đổi cấu hình không gian của chúng. Ví dụ, chất đồng phân D của một hoặc nhiều gốc axit amin của peptit có thể được sử dụng, chứ không phải chất đồng phân L. Hơn nữa, ít nhất một trong số các gốc axit amin của peptit theo sáng chế có thể được thay thế bằng một trong số các gốc axit amin không có trong tự nhiên đã biết rõ. Các thay đổi như nêu trên có thể dùng để làm gia tăng độ ổn định, độ sinh khả dụng và/hoặc tác dụng gắn kết của các peptit theo sáng chế.

Tương tự, peptit hoặc biến thể theo sáng chế có thể được cải biến bằng phương pháp hóa học bằng cách cho các axit amin đặc hiệu phản ứng trước hoặc sau khi tổng hợp peptit. Ví dụ về các cải biến này là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và được tóm tắt, ví dụ trong tài liệu: R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2005. Sự cải biến hóa học của axit amin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cải biến bằng cách axyl hóa, amit hóa, pyridoxyl hóa lysin, alkyl hóa khử, trinitrobenzyl hóa các nhóm amin bằng axit 2,4,6-trinitrobenzen sulphonic (TNBS), sự cải biến amit của các nhóm cacboxyl và cải biến sulphydryl bằng cách oxy hóa xystein bằng axit thành axit xysteic, sự tạo ra các dẫn xuất có thủy

ngân, sự tạo ra disulfua hỗn hợp bằng các hợp chất thiol khác, sự phản ứng với maleimide, carboxymethyl hóa bằng axit iodoacetic hoặc iodoacetamide và carbamoyl hóa bằng xyanat với độ pH có tính kiềm, tuy nhiên không chỉ giới hạn ở các cải biến này. Về mặt này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tham khảo tài liệu: Chapter 15 of Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) về phương pháp có phạm vi rộng hơn liên quan đến sự cải biến hóa học của các protein.

Tóm lại, sự cải biến, ví dụ, của các gốc arginyl trong protein thường dựa trên phản ứng của các hợp chất vicinal dicarbonyl như phenylglyoxal, 2,3-butanedione, và 1,2-cyclohexanedione để tạo ra sản phẩm cộng. Ví dụ khác là phản ứng của methylglyoxal với các gốc arginin. Xystein có thể được cải biến mà không cải biến đồng thời các vị trí ái nhân khác như lysin và histidin. Kết quả là lượng lớn các chất phản ứng có thể sử dụng để cải biến xystein. Website của các công ty như Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) cung cấp thông tin về các chất phản ứng đặc hiệu.

Việc khử chọn lọc liên kết disulfua trong protein cũng là việc phổ biến. Các liên kết disulfua có thể được tạo ra và oxy hóa trong quá trình xử lý nhiệt đối với được phẩm sinh học. Chất phản ứng K của Woodward có thể được sử dụng để cải biến các gốc axit glutamic đặc hiệu. Hợp chất N-(3-(dimethylamino)propyl)-N'-ethylcarbodiimide có thể được sử dụng để tạo ra các liên kết ngang nội phân tử giữa gốc lysin và gốc axit glutamic. Ví dụ, diethylpyrocarbonate là chất phản ứng để cải biến các gốc histidyl trong protein. Histidin cũng có thể được cải biến bằng cách sử dụng 4-hydroxy-2-nonenal. Phản ứng của các gốc lysin và các gốc α -amin khác chẳng hạn là hữu ích trong sự gắn kết của peptit với bề mặt hoặc sự liên kết ngang của các protein/peptit. Lysin là vị trí liên kết của poly(etylen)glycol và vị trí cải biến chính trong quá trình glycosyl hóa của các protein. Các gốc methionin trong protein có thể được cải biến bằng, ví dụ, iodoacetamide, bromoethylamine, và cloamine T.

Tetranitromethane và N-acetylimidazole có thể được sử dụng để cải biến các gốc tyrosyl. Sự tạo liên kết ngang bằng cách tạo ra dityrosine có thể được thực hiện với các ion hydro peroxide/đồng.

Các nghiên cứu gần đây đối với sự cải biến tryptophan đã sử dụng N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide hoặc 3-bromo-3-methyl-2-(2-

nitrophenylmercapto)-3H-indol (BPNS-skatol).

Sự cải biến thành công của các protein và peptit điều trị bệnh bằng PEG thường có liên quan đến sự kéo dài thời gian bán hủy tuần hoàn trong khi tạo liên kết ngang của protein bằng glutaraldehyt, polyetylen glycol diacrylat và formaldehyt được sử dụng để tạo ra hydrogel. Sự cải biến hóa học của các dị nguyên đối với liệu pháp miễn dịch thường đạt được bằng cách carbamyl hóa bằng kali xyanat.

Peptit hoặc biến thể, trong đó peptit này được cải biến hoặc bao gồm các liên kết không peptit là phương án được ưu tiên của sáng chế. Nói chung, các peptit và biến thể (ít nhất là các chất này chứa liên kết peptit giữa các gốc axit amin) có thể được tổng hợp bằng chế độ Fmoc-polyamit của phương pháp tổng hợp peptit pha rắn như được bộc lộ trong tài liệu của Lukas và các đồng tác giả (Solid-phase peptide synthesis under continuous-flow conditions. Proc Natl Acad Sci U S A. May 1981; 78(5): 2791–2795), và các tài liệu viện dẫn được nêu ở đây. Sự bảo vệ tạm thời nhóm N-amin được thực hiện bởi nhóm 9-florenylmetyloxycarbonyl (Fmoc). Sự phân cắt lặp lại của nhóm bảo vệ bazơ không bền ở mức cao này được tiến hành bằng cách sử dụng piperidin 20% trong N, N-dimetylformamit. Các nhóm chức ở mạch bên có thể được bảo vệ như các ete butyl của chúng (trong trường hợp serin threonin và tyrosin), các este butyl (trong trường hợp axit glutamic và axit aspartic), dẫn xuất butyloxycarbonyl (trong trường hợp lysin và histidin), dẫn xuất trityl (trong trường hợp xystein) và dẫn xuất 4-metoxi-2,3,6-trimetylbenzensulphonyl (trong trường hợp arginin). Khi glutamin hoặc asparagin là các gốc ở đầu tận cùng C, cần sử dụng nhóm 4,4'-dimetoxibenzhydryl để bảo vệ các nhóm chức amido ở mạch bên. Nền pha rắn trên cơ sở polyme polydimetyl-acrylamit được tạo thành từ ba monome dimetylacrylamit (monome khung chính), bisacryloyletylen diamin (nhóm liên kết ngang) và este acryoylsarcosin metyl (chất tạo nhóm chức). Chất liên kết có thể phân giải peptit-với nhựa được sử dụng là dẫn xuất axit không bền với axit 4-hydroxymetyl-phenoxyaxetic. Tất cả các dẫn xuất axit amin được bổ sung thêm vào dưới dạng dẫn xuất anhydrit đối xứng được điều chế từ trước của chúng, ngoại trừ asparagin và glutamin được bổ sung bằng cách sử dụng phương pháp liên kết qua trung gian N, N-dixyclohexyl-carbodiimide/1hydroxybenzotriazol ngược. Tất cả các phản ứng liên kết và khử bảo vệ được theo dõi bằng cách sử dụng ninhydrin, axit trinitrobenzen sulphonic hoặc phương pháp thử nghiệm isotin. Khi quá trình tổng hợp

kết thúc, các peptit được phân giải ra khỏi nền nhựa và đồng thời loại bỏ các nhóm bảo vệ mạch bên bằng cách xử lý bằng axit trifloaxetic 95% chứa hỗn hợp chất tẩy tạp 50%. Các chất tẩy tạp thường được sử dụng bao gồm etandithiol, phenol, anisol và nước, sự lựa chọn chính xác tùy thuộc vào axit amin thành phần của peptit được tổng hợp. Cũng có thể sử dụng tổ hợp phương pháp pha rắn và pha dung dịch để tổng hợp peptit (ví dụ, xem tài liệu: Bruckdorfer et al., 2004, và các tài liệu viện dẫn được nêu ở đây).

Axit trifloaxetic được loại bỏ bằng cách làm bay hơi trong chân không, sau đó nghiền thành bột với ete dietyl để tạo ra peptit thô. Các chất tẩy tạp bất kỳ có mặt được loại bỏ bằng phương pháp chiết một lần trong đó sự đông khô pha nước tạo ra peptit thô không chứa chất tẩy tạp. Các chất phản ứng để tổng hợp peptit thường được mua từ, ví dụ, công ty Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Vương Quốc Anh).

Việc tinh chế có thể được thực hiện bằng kỹ thuật, hoặc tổ hợp các kỹ thuật như tái kết tinh, sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước và (thường là) sắc ký lỏng có hiệu năng cao pha ngược bằng cách sử dụng, ví dụ, kỹ thuật tách gradien axetonitril/nước.

Việc phân tích peptit có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng, phương pháp điện di, cụ thể là phương pháp điện di mao dẫn, phương pháp chiết pha rắn (CSPE), phương pháp sắc ký lỏng có hiệu năng cao pha ngược, phương pháp phân tích axit amin sau khi thủy phân bằng axit và bằng phương pháp phổ khối lượng bắn phá nguyên tử nhanh (fast atom bombardment: FAB), cũng như phương pháp phân tích phổ khối MALDI và ESI-Q-TOF.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic (ví dụ, polynucleotit) mã hóa peptit hoặc biến thể của peptit theo sáng chế. Polynucleotit này có thể là, ví dụ, ADN, ADN bổ 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, sáng chế đề xuất 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.

Tiếp đó, ADN (hoặc trong trường hợp vector retrovirus, ARN) có thể được biểu hiện ở vật chủ thích hợp để tạo ra polypeptit chứa peptit hoặc biến thể theo sáng chế. Do đó, ADN mã hóa peptit hoặc biến thể theo 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 các 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.

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 plasmid, 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 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 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 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 bằng 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 như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO), có thể mua được từ Bảo tàng ATCC Cell Biology Collection.

Sáng chế còn đề xuất 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 có nhân điển hình. Các tế bào vi khuẩn có thể là tế bào chủ không nhân 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 bao gồm tế bào nấm men, côn trùng và 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 có thể mua được 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 khi 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 vectơ biểu hiện baculovirut. 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, the textbook of Paulina Balbás and Argelia Lorence “Methods in Molecular Biology Recombinant Gene 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 vectơ được sử dụng. Liên quan đến sự biến nạp của tế bào chủ không nhân, ví dụ, xem tài liệu: Cohen et al (1972) và Sambrook et al (1989). Sự biến nạp của các tế bào nấm men được mô tả trong tài liệu: Sherman et al (1986). Các phương pháp trong tài liệu của 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, chế 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 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, 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 vectơ biểu hiện theo sáng chế.

Theo 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 ở tuyến tiền liệt (prostatic acid phosphatase: PAP) đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (Food and Drug Administration: FDA) phê chuẩn ngày 29 tháng 4 năm 2010, để điều trị HRPC di căn không có triệu chứng hoặc có triệu chứng rất nhỏ (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2005; Small et al., 2006).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất 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, peptit, axit nucleic hoặc vector biểu hiện theo 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 có thể được cho trước và sẽ phụ thuộc vào peptit hoặc ADN tương ứng, ví dụ, nằm trong khoảng từ 50µg đến 1,5mg, tốt hơn là từ 125µg đến 500µg. Các liều dùng nằm trong khoảng này đã được sử dụng thành công trong các thử nghiệm trước đó (Walter et al., 2012).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra các tế bào T hoạt hóa *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước cho các tế bào T tiếp xúc *in vitro* với kháng nguyên được tải các phân tử MHC ở người được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp trong khoảng thời gian đủ để hoạt hóa tế bào T theo cách đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này là peptit theo sáng chế. Tốt hơn nếu kháng nguyên được sử dụng với lượng đủ với tế bào trình diện kháng nguyên.

Tốt hơn nếu tế bào của động vật có vú không có hoặc có nồng độ hoặc chức năng của chất vận chuyển peptit của TAP giảm. Các tế bào thích hợp không có chất vận chuyển peptit của TAP bao gồm các tế bào T2, RMA-S và *Drosophila*. TAP là chất vận chuyển có liên quan đến việc xử lý kháng nguyên.

Dòng tế bào thiếu sự tải peptit của người T2 có thể mua được từ Bảo tàng

giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Mỹ theo Catalog số CRL 1992; dòng Schneider 2 của dòng tế bào *Drosophila* có thể mua được từ Bảo tàng ATCC theo Catalog số CRL 19863; dòng tế bào RMA-S của chuột được mô tả trong tài liệu của Karre và các đồng tác giả (Ljunggren and Karre. 1985).

Tốt hơn nếu trước khi chuyển nhiễm, tế bào chủ không biểu hiện chủ yếu các phân tử MHC nhóm I. Cũng tốt hơn nếu tế bào kích thích biểu hiện phân tử quan trọng để tạo ra tín hiệu đồng kích thích đối với tế bào T như tế bào bất kỳ trong số B7.1, B7.2, ICAM-1 và LFA 3. Trình tự axit nucleic của nhiều phân tử MHC nhóm I và của các phân tử chất đồng kích thích có thể mua được dễ dàng từ Ngân hàng gen và cơ sở dữ liệu EMBL.

Trong trường hợp epitop của MHC nhóm I được sử dụng làm kháng nguyên, các tế bào T là tế bào T dương tính với CD8.

Nếu tế bào trình diện kháng nguyên được chuyển nhiễm để biểu hiện epitop này, tốt hơn nếu tế bào này chứa vector biểu hiện có khả năng biểu hiện peptit chứa các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, hoặc trình tự axit amin biến thể của nó.

Nhiều phương pháp khác có thể được sử dụng để tạo ra tế bào T *in vitro*. Ví dụ, các tế bào lymphô thâm nhiễm khối u tự thân có thể được sử dụng để tạo ra CTL. Plebanski và các đồng tác giả (1995) sử dụng các tế bào lymphô trong máu ngoại vi (peripheral blood lymphocyte: PLB) tự thân để tạo ra các tế bào T. Ngoài ra, sự tạo ra các tế bào T tự thân bằng cách gây xung cho các tế bào đuôi gai bằng peptit hoặc polypeptit, hoặc có thể bằng cách tiêm virus tái tổ hợp. Các tế bào B cũng có thể được sử dụng để tạo ra tế bào T tự thân. Ngoài ra, các đại thực bào được gây xung bằng peptit hoặc polypeptit, hoặc được gây nhiễm bằng virus tái tổ hợp, có thể được sử dụng để tạo ra tế bào T tự thân. S. Walter và các đồng tác giả (2003) mô tả phương pháp tạo môi của các tế bào T *in vitro* bằng cách sử dụng các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (artificial antigen presenting cell: aAPC), phương pháp này cũng là cách thích hợp để tạo ra các tế bào T đối với peptit được chọn. Theo sáng chế, tế bào aAPC được tạo ra bằng cách ghép cặp phức hợp MHC:peptit đã được tạo ra từ trước với bề mặt của các hạt polystyren (vi hạt) theo hỗn hợp hóa sinh biotin:streptavidin. Hệ này cho phép kiểm soát chính xác tỷ lệ mật độ MHC trên các tế bào aAPC, điều này

cho phép tạo ra theo cách chọn lọc các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên ở mức cao hoặc thấp với hiệu quả cao từ các mẫu máu. Ngoài phức hợp MHC:peptit, các tế bào aAPC cần mang các protein khác có hoạt tính đồng kích thích như các kháng thể kháng CD28 được liên kết với bề mặt của chúng. Ngoài ra, các hệ trên cơ sở aAPC này thường cần bổ sung thêm các yếu tố hòa tan thích hợp, ví dụ, xytokin, như intolokin-12.

Các tế bào khác alen cùng loài cũng có thể được sử dụng để tạo ra tế bào T và phương pháp được mô tả chi tiết trong công bố đơn quốc tế số WO 97/26328. Ví dụ, ngoài tế bào *Drosophila* và tế bào T2, các tế bào khác có thể được sử dụng để trình diện kháng nguyên như tế bào CHO, tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng baculovirut, tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào đích được gây nhiễm bằng virut vaccinia. Ngoài ra, các virut ở thực vật có thể được sử dụng (ví dụ, xem tài liệu: Porta et al. (1994)), tài liệu này mô tả việc phát triển virut thể khảm ở cây đậu đũa làm hệ cho năng suất cao để trình diện các peptit ngoại lai.

Các tế bào T hoạt hóa được định hướng đối với peptit theo sáng chế là hữu ích trong liệu pháp. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các tế bào T hoạt hóa có thể thu được bằng các phương pháp theo sáng chế nêu trên.

Các tế bào T hoạt hóa, được tạo ra bằng phương pháp nêu trên, sẽ nhận biết chọn lọc tế bào biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin trong số các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO 300.

Tốt hơn nếu tế bào T nhận biết tế bào bằng cách tương tác qua thụ thể TCR của nó với phức hợp HLA/peptit (ví dụ, gắn kết). Các tế bào T hữu ích trong phương pháp tiêu diệt tế bào đích ở bệnh nhân có các tế bào đích biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin theo sáng chế trong đó bệnh nhân này được cho sử dụng lượng hữu hiệu của các tế bào T hoạt hóa. Các tế bào T được sử dụng cho bệnh nhân có thể có nguồn gốc từ bệnh nhân này và được hoạt hóa như đã mô tả trên đây (nghĩa là chúng là các tế bào T tự thân). Theo cách khác, các tế bào T không có nguồn gốc từ bệnh nhân nhưng có nguồn gốc từ đối tượng khác. Tất nhiên là tốt hơn nếu đối tượng này là đối tượng khỏe mạnh. Thuật ngữ “đối tượng khỏe mạnh” theo sáng chế để chỉ đối tượng thường là có sức khỏe tốt, tốt hơn là có hệ miễn dịch mạnh và tốt hơn nữa nếu đối tượng này không bị bệnh bất kỳ có thể được thử nghiệm và phát hiện dễ dàng.

Các tế bào đích *in vivo* của tế bào T dương tính với CD8 theo sáng chế có thể là

các tế bào khối u (các tế bào này đôi khi biểu hiện MHC nhóm II) và/hoặc tế bào nền bao quanh khối u (các tế bào khối u) (các tế bào này đôi khi cũng biểu hiện MHC nhóm II; (Dengjel et al., 2006)).

Các tế bào T theo sáng chế có thể được sử dụng làm hoạt chất trong chế phẩm điều trị bệnh. Theo đó, sáng chế cũng mô tả phương pháp tiêu diệt tế bào đích ở bệnh nhân có các tế bào đích biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng lượng hữu hiệu của tế bào T như được xác định trên đây.

Thuật ngữ “được biểu hiện bất thường” theo sáng chế cũng có nghĩa là polypeptit được biểu hiện quá mức so với mức biểu hiện bình thường hoặc gen này là gen câm trong mô được lấy từ khối u nhưng được biểu hiện ở khối u. Thuật ngữ “được biểu hiện quá mức” theo sáng chế có nghĩa là polypeptit có mặt với lượng cao hơn ít nhất 1,2 lần lượng có mặt trong mô bình thường; tốt hơn nếu cao hơn ít nhất 2 lần, và tốt hơn nữa nếu cao hơn ít nhất 5 lần hoặc 10 lần so với mức có mặt trong mô bình thường.

Có thể thu được các tế bào T bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, các phương pháp đã mô tả trên đây.

Quy trình của phương pháp còn được gọi là sự chuyển mượn của tế bào T là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Để biết thêm chi tiết có thể xem các tài liệu: Gattinoni et al. (2006) và Morgan et al. (2006).

Phân tử bất kỳ theo sáng chế, nghĩa là peptit, axit nucleic, kháng thể, vector biểu hiện, tế bào, tế bào T hoạt hóa, thụ thể tế bào T hoặc axit nucleic mã hóa nó là hữu ích để điều trị các rối loạn, khác biệt ở chỗ, các tế bào tránh được sự đáp ứng miễn dịch. Do đó, phân tử bất kỳ theo sáng chế có thể được dùng làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc. Phân tử này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với (các) phân tử khác theo sáng chế hoặc (các) phân tử đã biết.

Tốt hơn nếu thuốc theo sáng chế là vaccin. Vaccin này có thể được sử dụng trực tiếp cho bệnh nhân, vào cơ quan bị bệnh hoặc sử dụng qua đường toàn thân như i.d., i.m., s.c., i.p. và i.v., hoặc được sử dụng *ex vivo* cho các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân hoặc dòng tế bào của người mà sau đó được sử dụng cho bệnh nhân này, hoặc được sử dụng *in vitro* để chọn lọc tiểu quần thể của các tế bào miễn dịch có nguồn gốc từ bệnh nhân mà sau đó được sử dụng lại cho bệnh nhân này. Nếu axit

nucleic được sử dụng cho các tế bào *in vitro*, nó có thể hữu ích cho các tế bào cần được chuyển nhiễm để đồng biểu hiện các xytokin kích thích miễn dịch, như intolokin-2. Peptit có thể gần như tinh khiết, hoặc được kết hợp với tá được kích thích miễn dịch (xem phần dưới đây) hoặc được sử dụng kết hợp với các xytokin kích thích miễn dịch, hoặc được sử dụng với hệ giải phóng thích hợp, ví dụ, liposom. Peptit cũng có thể được liên hợp với chất mang thích hợp như hemoxyanin hà (keyhole limpet haemocyanin: KLH) hoặc manan (ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO 95/18145). Peptit cũng có thể được hướng đích, có thể là protein dung hợp, hoặc có thể là phân tử lai. Các peptit có trình tự được nêu trong sáng chế được dự kiến là kích thích các tế bào T CD4 hoặc CD8. Tuy nhiên, sự kích thích các tế bào T CD8 có hiệu quả hơn khi có sự trợ giúp của tế bào T hỗ trợ CD4. Do đó, đối với các epitop của MHC nhóm I kích thích tế bào T CD8, đối tác dung hợp hoặc các phân tử lai là thích hợp để tạo ra các epitop kích thích tế bào T dương tính với CD4. Các epitop kích thích CD4- và CD8- là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm các epitop đã được xác định theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, vaccin chứa ít nhất một peptit có trình tự axit amin được nêu trong các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 300, và ít nhất một peptit bổ sung, tốt hơn là chứa từ 2 đến 50, tốt hơn nữa là chứa từ 2 đến 25, thậm chí tốt hơn nữa là chứa từ 2 đến 20 và tốt nhất là chứa 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 hoặc 18 peptit. (Các) peptit này có thể có nguồn gốc từ một hoặc nhiều TAAs đặc hiệu và có thể gắn kết với các phân tử MHC nhóm I.

Theo khía cạnh khác, vaccin chứa ít nhất một peptit có trình tự axit amin nêu trong các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 300, và ít nhất một peptit bổ sung, tốt hơn là có từ 2 đến 50, tốt hơn nữa là có từ 2 đến 25, thậm chí tốt hơn nữa là có từ 2 đến 20 và tốt nhất là có 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 hoặc 18 peptit. (Các) peptit này có thể có nguồn gốc từ một hoặc nhiều TAAs đặc hiệu và có thể gắn kết với các phân tử MHC nhóm I.

Polynucleotit 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 Pascolo và các đồng tác giả (2005). Các vaccin polynucleotit được bào chế để

dạng nhưng cơ chế tác dụng của các vectơ này trong việc gây đáp ứng miễn dịch vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn. Các vectơ 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. Peptit hoặc các 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.

Các chất phụ trợ được ưu tiên là chất kháng CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, xyclophosphamid, sunitinib, bevacizumab, interferon-alpha, oligonucleotit CpG và dẫn xuất, poly-(I:C) và dẫn xuất, ARN, sildenafil, và các sản phẩm dạng hạt với PLG hoặc các thể virus.

Theo một phương án được ưu tiên của dược phẩm theo sáng chế, chất phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm các yếu tố kích thích tạo cụm, như yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt-đại thực bào (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor: GM-CSF, sargramostim), xyclophosphamid, imiquimod, resiquimod, và interferon-alpha.

Theo một phương án được ưu tiên của dược phẩm theo sáng chế, chất phụ trợ được chọn từ nhóm bao gồm các yếu tố kích thích tạo cụm, như yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt-đại thực bào (GM-CSF, sargramostim), xyclophosphamid, imiquimod và resiquimod. Theo một phương án được ưu tiên của dược phẩm theo sáng chế, chất phụ trợ là xyclophosphamide, imiquimod hoặc resiquimod. Các chất phụ trợ được đặc biệt ưu tiên là Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC (Hiltonol®) và mAB kháng CD40, hoặc hỗn hợp của chúng.

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 chất gây nở, chất pha loãng, chất tạo hương vị, chất làm trơn, v.v.. Các peptit cũng có thể được sử dụng cùng với các chất kích

thích miễn dịch như xytokin. 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, 3rd Ed., 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press. 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, ví dụ, trong Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP2112253.

Sáng chế đề xuất thuốc hữu ích để điều trị bệnh ung thư, cụ thể là HCC và các bệnh ác tính khác.

Sáng chế còn đề xuất kit bao gồm:

(a) đồ chứa để đựng dược phẩm như đã mô tả trên đây, ở dạng dung dịch hoặc dạng đông khô;

(b) tùy ý, đồ chứa thứ hai để đựng chất pha loãng hoặc dung dịch hoàn nguyên dùng cho sản phẩm dạng đông khô; và

(c) tùy ý, các hướng dẫn để (i) sử dụng dung dịch hoặc (ii) hoàn nguyên và/hoặc sử dụng sản phẩm dạng đông khô.

Kit còn có thể chứa một hoặc nhiều thành phần trong số (iii) chất đệm, (iv) chất pha loãng, (v) dụng cụ lọc, (vi) kim tiêm, hoặc (v) bơm tiêm. Tốt hơn nếu đồ chứa là chai, lọ, bơm tiêm hoặc ống thử nghiệm; và có thể là đồ chứa đa dụng. Tốt hơn nếu dược phẩm ở dạng được đông khô.

Tốt hơn nếu kit theo sáng chế chứa sản phẩm dạng đông khô của sáng chế trong đồ chứa thích hợp và hướng dẫn để hoàn nguyên và/hoặc sử dụng nó. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ (ví dụ, lọ có hai ngăn), bơm tiêm (như bơm tiêm có hai ngăn) và các ống thử nghiệm. Đồ chứa này có thể được tạo ra từ nhiều loại vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Tốt hơn nếu kit và/hoặc đồ chứa có các hướng dẫn đối với hoặc có liên quan đến đồ chứa để thể hiện các hướng dẫn hoàn nguyên và/hoặc sử dụng. Ví dụ, nhãn có thể thể hiện rằng sản phẩm dạng đông khô này cần được hoàn nguyên với nồng độ peptit như đã mô tả trên đây. Nhãn này còn có thể thể hiện rằng sản phẩm này là hữu ích hoặc dự định để sử dụng dưới da.

Đồ chứa để đựng sản phẩm có thể lọ đa dụng để cho phép lặp lại việc sử dụng (ví dụ, sử dụng từ 2 đến 6 lần) của sản phẩm được hoàn nguyên. Kit còn có thể có đồ chứa thứ hai chứa chất pha loãng thích hợp (ví dụ, dung dịch natri bicacbonat).

Khi trộn chất pha loãng và sản phẩm dạng đông khô, tốt hơn nếu nồng độ peptit

cuối trong sản phẩm được hoàn nguyên ít nhất bằng 0,15 mg/ml/peptit (=75 µg) và tốt hơn là không quá 3mg/ml/peptit (=1500µg). Kit này còn có thể chứa các chất khác mong muốn theo quan điểm về mặt thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, chất độn, kim tiêm, bơm tiêm khác, và bao gói có kèm theo hướng dẫn sử dụng.

Kit theo sáng chế có thể có một đồ chứa để đựng dạng sản phẩm của dược phẩm theo sáng chế cùng với hoặc không cùng với các thành phần khác (ví dụ, các hợp chất khác hoặc dược phẩm chứa các hợp chất khác này) hoặc có đồ chứa riêng biệt cho mỗi thành phần.

Tốt hơn nếu kit theo sáng chế chứa sản phẩm theo sáng chế được bao gói để sử dụng kết hợp với việc sử dụng đồng thời hợp chất thứ hai (như các chất phụ trợ (ví dụ, GM-CSF), chất hóa trị liệu, sản phẩm tự nhiên, hormon hoặc chất đối kháng, chất chống tạo mạch hoặc chất ức chế, chất gây chết tế bào theo chương trình hoặc chất tạo chelat) hoặc dược phẩm chứa chúng. Các thành phần của kit có thể được tạo phức từ trước hoặc mỗi thành phần có thể ở trong đồ chứa riêng biệt trước khi sử dụng cho bệnh nhân. Các thành phần của kit này có thể được tạo ra ở dạng một hoặc nhiều dung dịch lỏng, tốt hơn nếu là dung dịch nước, tốt hơn nữa nếu là dung dịch nước vô khuẩn. Các thành phần của kit cũng có thể được tạo ra dưới dạng chất rắn, chất này có thể được chuyển hóa thành chất lỏng bằng cách cho thêm các dung môi thích hợp, tốt hơn nếu các dung môi này được đựng trong đồ chứa riêng biệt khác.

Đồ chứa của kit điều trị có thể là lọ, ống thử nghiệm, bình, chai, bơm tiêm, hoặc phương tiện khác bất kỳ để đựng chất rắn hoặc chất lỏng. Thông thường, khi có nhiều hơn một thành phần, kit này sẽ chứa lọ thứ hai hoặc đồ chứa khác để cho phép tách liều dùng. Kit cũng có thể chứa đồ chứa khác để đựng chất lỏng được dùng. Tốt hơn nếu kit điều trị sẽ chứa dụng cụ (ví dụ, một hoặc nhiều kim tiêm, bơm tiêm, bình nhỏ giọt thuốc mắt, pipet, v.v.), để cho phép sử dụng các chất theo sáng chế là các thành phần của kit theo sáng chế.

Dạng của dược phẩm theo sáng chế là dạng thích hợp để sử dụng các peptit qua đường có thể chấp nhận bất kỳ như đường miệng (trong ruột), đường mũi, đường mắt, dưới da, trong da, trong cơ, trong tĩnh mạch hoặc qua da. Tốt hơn nếu việc sử dụng là qua đường dưới da (s.c.), và tốt nhất nếu việc sử dụng qua đường i.d. có thể bằng cách bơm truyền.

Do các peptit theo sáng chế được phân lập từ HCC, tốt hơn nếu thuốc theo sáng chế được sử dụng để điều trị HCC.

Điều quan trọng cần thực hiện là đáp ứng miễn dịch được kích thích bằng vacxin theo sáng chế tấn công bệnh ung thư ở các giai đoạn tế bào khác nhau và các giai đoạn phát triển khác nhau. Ngoài ra, các con đường truyền tín hiệu liên quan đến bệnh ung thư khác nhau bị tấn công. Đây là lợi thế đối với các vacxin chỉ hướng đến một hoặc vài đích, điều này có thể làm cho khối u dễ dàng thích ứng với sự tấn công (thoát khỏi khối u). Hơn nữa, không phải tất cả các khối u riêng biệt đều biểu hiện cùng kiểu kháng nguyên. Do đó, hỗn hợp của vài peptit liên quan đến khối u đảm bảo rằng mỗi khối u đơn lẻ mang ít nhất một số đích. Dược phẩm được thiết kế đặc hiệu theo cách sao cho mỗi khối u dương tính với HLA-A*02 và/hoặc HLA-A*24 đều được cho là sẽ biểu hiện một vài kháng nguyên và bao gồm một số con đường độc lập cần thiết cho sự phát triển và duy trì khối u. Đối với mỗi tiểu phần peptit đặc hiệu với hai alen HLA nhóm I (A*02 và A*24), điều này được đảm bảo độc lập trên cơ sở các phân tích thử nghiệm cơ bản. Do đó, vacxin “có sẵn” này có thể được sử dụng dễ dàng cho quần thể lớn bệnh nhân. Điều này có nghĩa là việc lựa chọn từ trước đối với các bệnh nhân cần được điều trị bằng vacxin này có thể được giới hạn với loại HLA, không cần sự đánh giá dấu ấn sinh học bổ sung bất kỳ đối với sự biểu hiện kháng nguyên mà vẫn đảm bảo được rằng một số đích được tấn công đồng thời bởi đáp ứng miễn dịch được tạo ra, điều này là quan trọng đối với hiệu quả (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Xác định và định lượng các peptit liên quan đến khối u được biểu hiện trên bề mặt tế bào

Các mẫu mô

Các mô khối u của bệnh nhân được lấy từ Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Tübingen, Đức; Istituto Nazionale Tumori "Pascale". Molecular Biology and Viral Oncology Unit, Via Mariano, Naples, Ý; Bio-Options Inc., Brea, CA, Mỹ; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, Mỹ; Asterand Europe, Royston Herts, Vương Quốc Anh. Sự đồng ý tham gia bằng văn bản của tất cả các bệnh nhân được cung cấp trước khi phẫu thuật. Các mô được đông lạnh sốc

ngay sau khi phẫu thuật và được bảo quản cho đến khi phân lập TUMAP ở nhiệt độ -70°C hoặc thấp hơn.

Phân lập các peptit của HLA ra khỏi mẫu mô

Hỗn hợp peptit của HLA từ các mẫu mô được đông lạnh sốc thu được bằng cách kết tủa miễn dịch từ các mô rắn theo quy trình được cải biến không đáng kể (Falk, K., 1991; Seeger, F.H.T., 1999) bằng cách sử dụng kháng thể BB7.2 đặc hiệu HLA-A*02, kháng thể W6/32 đặc hiệu HLA-A, -B, -C, sepharosa được hoạt hóa bằng CNBr, xử lý bằng axit, và siêu lọc.

Phân tích phổ khối lượng

Hỗn hợp peptit của HLA khi thu được được tách theo độ kỵ nước của chúng bằng phương pháp sắc ký đảo pha (hệ sắc ký nanoAcquity UPLC, Waters) và các peptit rửa giải được phân tích trong phổ khối kế fusion hybrid và LTQ-velos (ThermoElectron) được trang bị nguồn ESI. Hỗn hợp peptit được tải trực tiếp lên cột vi mao dẫn silic oxit nóng chảy để phân tích ($75\mu\text{m i.d.} \times 250\text{mm}$) được nạp vật liệu đảo pha C18 $1,7\mu\text{m}$ (Waters) với tốc độ dòng bằng 400nl/phút . Sau đó, các peptit được tách bằng cách sử dụng gradien hai thành phần trong 180 phút theo hai bước từ thành phần B có nồng độ từ 10% đến 33% với tốc độ dòng bằng 300nl/phút . Gradien này gồm dung môi A (axit formic 0,1% trong nước) và dung môi B (axit formic 0,1% trong axetonitril). Ống mao dẫn bằng thủy tinh được phủ vàng (PicoTip, New Objective) được sử dụng để đưa nguồn nanoESI vào. Phổ khối kế LTQ-Orbitrap được vận hành với chế độ phụ thuộc dữ liệu bằng cách sử dụng phương pháp TOP5. Tóm lại, chu trình quét được bắt đầu với việc quét toàn bộ với độ chính xác khối lượng cao trong thiết bị orbitrap ($R = 30000$), sau đó, các lần quét bằng phương pháp MS/MS cũng được thực hiện trong thiết bị orbitrap ($R = 7500$) trên 5 tiền chất ion dư thừa nhất với sự loại trừ động lực của các ion đã chọn trước đó. Phổ khối nối tiếp được giải thích bằng thuật toán SEQUEST và sự điều chỉnh bằng tay bổ sung. Trình tự peptit xác định được được đảm bảo bằng cách so sánh mẫu phân mảnh peptit tự nhiên được tạo ra với mẫu phân mảnh của peptit tham chiếu tổng hợp có trình tự giống hệt.

Phương pháp định lượng bằng cách sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS) tương đối không đánh dấu được thực hiện bằng cách đếm ion nghĩa là bằng cách chiết và phân tích các đặc điểm của phổ LC-MS (Mueller et al. 2007a). Phương pháp này giả định

rằng vùng tín hiệu LC-MS của peptit có tương quan với sự có mặt quá nhiều của nó trong mẫu. Các đặc điểm khi chiết được xử lý thêm bằng cách giải phóng trạng thái tích điện và đóng thẳng hàng thời gian duy trì (Mueller et al. 2007b; Sturm et al. 2008). Cuối cùng, tất cả các đặc điểm của phổ LC-MS được tham chiếu chéo với kết quả xác định trình tự để kết hợp các dữ liệu định lượng của các mẫu và mô khác nhau với profin trình diện của peptit. Các dữ liệu định lượng được chuẩn hóa theo kiểu hai bậc theo xu hướng tập trung để giải thích sự thay đổi trong các bản sao về mặt kỹ thuật và sinh học. Do đó, mỗi peptit xác định được có thể có liên quan đến dữ liệu định lượng để cho phép định lượng tương đối giữa các mẫu và mô. Ngoài ra, tất cả các dữ liệu định lượng thu được của các ứng viên peptit được kiểm tra bằng tay để đảm bảo tính nhất quán của dữ liệu và để kiểm tra độ chính xác của phương pháp phân tích tự động. Đối với mỗi peptit, profin trình diện tính được cho thấy sự biểu hiện trung bình của mẫu cũng như sự biến đổi lặp lại. Để các profin của mẫu HCC cạnh đường gốc của các mẫu mô bình thường.

Profin trình diện của các peptit được trình diện quá mức làm ví dụ được thể hiện trên Fig.1. Điểm số trình diện của các peptit làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6: Điểm số trình diện. Bảng này liệt kê các peptit được trình diện ở mức quá cao trên khối u so với nhóm các mô bình thường (+++), được trình diện ở mức quá cao trên khối u so với nhóm các mô bình thường (++) hoặc được trình diện quá mức trên khối u so với nhóm các mô bình thường (+). S* = phosphoserin

SEQ ID No.	Trình tự	Mức độ trình diện peptit
47	FLDTPIAKV	+

Ví dụ 2

Lập thông số biểu hiện của các gen mã hóa peptit theo sáng chế

Sự trình diện quá mức hoặc trình diện đặc hiệu của peptit trên các tế bào khối u được so sánh với các tế bào bình thường là đủ đối với tính hữu ích của nó trong liệu pháp miễn dịch, và một số peptit có độ đặc hiệu khối u mặc dù protein nguồn của chúng cũng xuất hiện trong các mô bình thường. Việc lập thông số biểu hiện của ARN thông tin làm tăng thêm độ an toàn khi chọn các đích peptit dùng cho liệu pháp miễn dịch. Đặc biệt là đối với các lựa chọn điều trị bệnh với nguy cơ độ an toàn cao, như

các thụ thể TCR trưởng thành ái lực, peptit đích lý tưởng sẽ có nguồn gốc từ protein đặc biệt với khối u và không được tìm thấy trên các mô bình thường.

Nguồn ARN và điều chế

Các mẫu mô được tách ra khi phẫu thuật được tạo ra theo phương pháp như đã nêu trên đây (xem Ví dụ 1) sau khi nhận được sự đồng ý tham gia bằng văn bản của mỗi bệnh nhân. Các mẫu mô khối u được đông lạnh đột ngột ngay sau khi phẫu thuật và được làm đồng nhất sau đó bằng cối và chày trong nitơ lỏng. ARN tổng số được điều chế từ các mẫu này bằng cách sử dụng chất phản ứng TRI (Ambion, Darmstadt, Đức), sau đó làm sạch bằng RNeasy (QIAGEN, Hilden, Đức); cả hai phương pháp đều được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

ARN tổng số từ các mô của người khỏe mạnh được mua trên thị trường (Ambion, Huntingdon, Vương Quốc Anh; Clontech, Heidelberg, Đức; Stratagene, Amsterdam, Hà Lan; BioChain, Hayward, CA, Mỹ). ARN từ một số đối tượng (từ 2 đến 123 đối tượng) được trộn lẫn sao cho ARN từ mỗi đối tượng được cân bằng nhau.

Lượng và chất lượng của tất cả các mẫu ARN được đánh giá trên thiết bị phân tích sinh học Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Đức) bằng cách sử dụng kit ARN 6000 Pico LabChip (Agilent).

Thử nghiệm vi mảng

Việc phân tích sự biểu hiện gen của tất cả các mẫu ARN ở khối u và mô bình thường được thực hiện bằng các vi mảng oligonucleotit Affymetrix Human Genome (HG) U133A hoặc HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, Mỹ). Tất cả các bước được tiến hành theo sách hướng dẫn của Affymetrix. Tóm lại, ADN bổ trợ sợi đơn được tổng hợp từ 5–8µg ARN tổng số, bằng cách sử dụng SuperScript RTII (Invitrogen) và đoạn môi oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Đức) như được mô tả trong sách hướng dẫn. Quá trình phiên mã *in vitro* được thực hiện với kit đánh dấu BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, Mỹ) đối với mảng U133A hoặc với kit đánh dấu GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) đối với mảng U133 Plus 2.0, sau đó, phân mảnh ARN bổ trợ, lai, và nhuộm bằng streptavidin-phycoerythrin và kháng thể biotinyl hóa kháng streptavidin (Molecular Probes, Leiden, Hà Lan). Các hình ảnh được quét bằng máy quét Agilent 2500A GeneArray (U133A) hoặc máy quét Affymetrix Gene-Chip 3000 (U133 Plus 2.0), và các dữ liệu được phân tích bằng chương trình phần mềm GCOS

(Affymetrix), bằng cách thiết lập mặc định cho tất cả các thông số. Để chuẩn hóa, 100 gen giữ nhà được cung cấp bởi Affymetrix được sử dụng. Các giá trị biểu hiện tương đối được tính từ tỷ lệ log tín hiệu được cung cấp bằng chương trình phần mềm và mẫu thận bình thường được thiết lập tùy ý đến 1,0. Các profin biểu hiện làm ví dụ của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện ở mức quá cao hoặc chỉ được biểu hiện ở HCC được thể hiện trên Fig.2. Điểm số biểu hiện của các gen làm ví dụ khác được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7: Điểm số biểu hiện. Bảng này liệt kê các peptit từ gen được biểu hiện ở mức rất cao trong khối u so với nhóm các mô bình thường (+++), được biểu hiện ở mức quá cao trong khối u so với nhóm các mô bình thường (++) hoặc được biểu hiện quá mức trong khối u so với nhóm các mô bình thường (+).

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện gen
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	++
3	ILDDNMQKL	+
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++
7	ALVDTLKFV	+++
10	SLLEEFDFHV	+
13	GLIDTETAMKAV	+++
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLNSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
31	YQMDIQQEL	+++
38	ALADVVEHA	+
39	ALDPKANFST	+
41	ALLELDEPLVL	+++
42	ALLGGNVRMML	+
44	ALQDAIRQL	+

45	ALQDQLVLV	++
46	AMAEMKVVL	++
48	FLLEQPEIQV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
50	FTIPKLYQL	+++
52	GLFNAELLEA	+++
53	GLIHLEGDTV	+++
55	GLYGRTIEL	+++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	+
66	KLHEEIDRV	+++
67	KLKETIQKL	+++
68	KLLAATVLLL	+++
73	KLTLVIISV	+++
74	KLYDLELIV	+++
76	LLADIGGDPFAA	+
81	NLASFIEQVAV	+
82	NVFDGLVRV	+++
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	++
87	RLFEENDVNL	+++
90	RLLDVLAPLV	+
93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+
95	SICNGVPMV	++
97	SLLPQLIEV	+++
100	SLVGDIGNVNM	+++
103	SMGDHLWVA	+
105	SVYDGKLLI	+
106	TLAAIIHGA	++
107	TLGQFYQEV	+++

109	TLYALSHAV	+++
110	TVGGSEILFEV	+++
113	VLMDKLVEL	+++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WVIPAISAV	++
117	YAFPKSITV	+
119	YLDKNLTVSV	++
120	YLGEEYVKA	+++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	+++
129	SQADVIPA V	++
130	ALDAGAVYTL	++
132	ALHEEVVGV	++
141	AMGEKSFSV	+
142	AVIGGLIYV	+++
145	FLIAEYFEHV	++
146	FLWTEQAHTV	++
148	GLFAPLVFL	+
149	GLLSGLDIMEV	+++
154	KLTDHLKYV	+++
157	QLLPNLRAV	+
158	RIISGLVKV	++
160	RLLAKIICL	+++
163	RLTESVLYL	++
165	RVIEHVEQV	++
168	SLAVLVPIV	+++
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
175	TLFEHLPHI	++
177	VLDEPYEKV	++
182	YLLHFPMAL	+++
183	YLYNNEEQVGL	+++
187	SYPTFFPRF	+

188	RYSAGWDAKF	+++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+
200	AYLLQPSQF	+++
204	KYRLTYAYF	+++
206	KWPETPLLL	+
215	IYTGNISF	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAI RQI	+++
228	YLITSVELL	+
233	ALLGKLD AI	+
249	LLLGERVAL	+
255	SLFGQDV KAV	+
259	TLITDGMRSV	+
263	VLYPSLKEI	+
273	AILETAPKEV	+
275	ALIEGAGILL	+
286	KVLDKVFRA	+
296	SLLSGRISTL	+
298	TMAKESSIIGV	+
301	VLADFGARV	++
302	KIQEILTQV	+
315	KVLDGSPIEV	++
318	KLNEINEKI	+++
320	GLADNTVIAKV	+
324	RLFETKITQV	++
327	GLNEEIARV	+
336	YLPTFFLTV	+
341	YLAIGIHEL	++
345	SYNPLWLRI (A*24)	++

Ví dụ 3: Sự trao đổi phối tử-UV/sự gắn kết peptit với HLA-A*02 và HLA-A*24

Các peptit ứng viên dùng cho liệu pháp trên cơ sở tế bào T theo sáng chế được thử nghiệm thêm về khả năng gắn kết với MHC (ái lực) của chúng. Các phức hợp

peptit-MHC riêng biệt được tạo ra bằng cách trao đổi UV-phối tử, trong đó peptit nhạy UV được phân giải khi chiếu UV, và được trao đổi với peptit quan tâm khi phân tích. Khi các ứng viên peptit có thể gắn kết hữu hiệu và làm ổn định các phân tử MHC nhận peptit để ngăn ngừa sự phân ly của các phức hợp MHC. Để xác định hiệu suất của phản ứng trao đổi, thử nghiệm ELISA được thực hiện dựa trên sự phát hiện chuỗi nhẹ ($\beta 2m$) của phức hợp MHC được làm ổn định. Nói chung, thử nghiệm này được thực hiện như được mô tả trong tài liệu của Rodenko và các đồng tác giả (Rodenko et al., 2006).

Đĩa MAXISorp có 96 lỗ (NUNC) được phủ qua đêm bằng streptavidin 2 μ g/ml trong PBS ở nhiệt độ trong phòng, được rửa 4 lần và phong bế trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong dung dịch đệm phong bế chứa BSA 2%. Các monome HLA-A*0201/MLA-001 cuộn gập lại được dùng làm chất chuẩn, phủ với lượng nằm trong khoảng từ 15 đến 500 ng/ml. Các monome peptit-MHC của phản ứng trao đổi UV-được pha loãng 100 lần trong dung dịch đệm phong bế. Các mẫu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, rửa 4 lần, ủ với HRP 2 μ g/ml liên hợp kháng $\beta 2m$ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, rửa lại và phát hiện bằng dung dịch TMB, làm ngừng phản ứng bằng NH_4SO_4 . Mức độ hấp thụ được xác định ở bước sóng 450nm. Các peptit ứng viên có hiệu suất trao đổi cao (tốt hơn là cao hơn 50%, tốt nhất là cao hơn 75%) thường được ưu tiên để tạo ra và sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể hoặc của nó, và/hoặc thụ thể tế bào T hoặc các đoạn của nó, do chúng có đủ ái lực với các phân tử MHC và ngăn ngừa sự phân ly của phức hệ MHC này.

Bảng 8: điểm gắn kết với MHC nhóm I

Sự gắn kết của peptit giới hạn bởi HLA-nhóm I với HLA-A*02 hoặc HLA-A*24 phụ thuộc vào trình tự peptit được phân loại theo hiệu suất trao đổi peptit: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; $\geq 50\%$ = +++; $\geq 75\%$ = +++. S* = phosphoserin.

SEQ ID No	Trình tự	Sự trao đổi peptit
47	FLDTPIAKV	"++"

Ví dụ 4

Tính sinh miễn dịch *in vitro* đối với peptit trình diện MHC nhóm I

Để thu được thông tin liên quan đến tính sinh miễn dịch của TUMAP theo sáng

chế, các tác giả sáng chế đã tiến hành đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm tạo môi trường tế bào T *in vitro* trên cơ sở sự kích thích lặp lại của các tế bào T CD8+ bằng các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (artificial antigen presenting cell: aAPC) được tải phức hợp peptit/MHC và kháng thể kháng CD28. Theo cách này, tác giả sáng chế có thể cho thấy tính sinh miễn dịch đối với TUMAP được giới hạn bởi 22 HLA-A*0201 theo sáng chế, để chứng minh rằng các peptit này là epitop của tế bào T kháng tiền tế bào T CD8+ tồn tại ở người.

Tạo môi trường các tế bào T CD8+ *in vitro*

Để thực hiện việc kích thích *in vitro* bằng các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo được tải phức hợp peptit-MHC (peptide-MHC complex : pMHC) và kháng thể kháng CD28, trước tiên, các tác giả sáng chế phân lập các tế bào T CD8+ ra khỏi các sản phẩm gạn tách bạch cầu HLA-A*02 mới bằng cách chọn lọc dương tính bằng cách sử dụng các vi hạt CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Đức) của người cho khỏe mạnh thu được từ University clinics Mannheim, Đức, sau khi đồng ý tham gia.

PBMC và các tế bào lymphô CD8+ phân lập được được ủ trong môi trường tế bào T (T-cell medium : TCM) cho đến khi sử dụng gồm RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Đức) được bổ sung thêm huyết thanh AB của người 10% được bất hoạt bằng nhiệt (PAN-Biotech, Aidenbach, Đức), Penixilin 100U/ml/Streptomycin 100µg/ml (Cambrex, Cologne, Đức), natri pyruvat 1mM (CC Pro, Oberdorla, Đức), Gentamycin 20µg/ml (Cambrex). IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Đức) và IL-2 10 U/ml (Novartis Pharma, Nürnberg, Đức) cũng được bổ sung thêm vào môi trường TCM ở bước này.

Sự tạo ra các hạt được phủ pMHC/kháng thể kháng CD28, sự kích thích tế bào T và việc đọc kết quả được thực hiện trong hệ *in vitro* được xác định ở mức cao bằng cách sử dụng 4 phân tử pMHC khác nhau cho mỗi điều kiện kích thích và 8 phân tử pMHC khác nhau cho mỗi điều kiện đọc kết quả.

IgG2a của chuột tinh khiết được đồng kích thích kháng CD28 Ab 9.3 của người (Jung et al., 1987) được biotinyl bằng phương pháp hóa học bằng cách sử dụng Sulfo-N-hydroxysuccinimidobiotin như khuyến cáo của nhà sản xuất (Perbio, Bonn, Germany). Các hạt được sử dụng là hạt polystyren được phủ streptavidin có đường kính 5,6µm (Bangs Laboratories, Illinois, Mỹ).

pMHC được sử dụng để kích thích đối chứng dương tính và âm tính là A*0201/MLA-001 (peptit ELAGIGILTV từ Melan-A/MART-1 được cải biến) và A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI từ DDX5), tương ứng.

800.000 hạt/200 μ l được phủ trong đĩa có 96 lỗ với sự có mặt của 4 x 12,5 ng biotin-pMHC khác nhau, được rửa và 600 ng biotin kháng CD28 được cho thêm sau đó với thể tích 200 μ l. Sự kích thích được khơi mào trong đĩa có 96 lỗ bằng cách ủ đồng thời 1×10^6 tế bào T CD8+ với 2×10^5 hạt được phủ đã rửa sạch trong 200 μ l TCM được bổ sung 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) trong 3 ngày ở 37°C. Sau đó, một nửa môi trường được thay bằng môi trường TCM mới được bổ sung 80U/ml IL-2 và tiếp tục ủ trong 4 ngày ở nhiệt độ 37°C. Chu trình kích thích này được thực hiện tổng cộng ba lần. Đối với kết quả đọc multime pMHC bằng cách sử dụng 8 phân tử pMHC khác nhau cho mỗi điều kiện, phương pháp mã hóa kết hợp hai chiều được sử dụng như được mô tả (Andersen et al., 2012) với sự cải biến nhỏ bằng cách liên kết với 5 chất gây huỳnh quang khác nhau. Cuối cùng, các bước phân tích multime được thực hiện bằng cách nhuộm tế bào bằng thuốc nhuộm hồng ngoại gần về tỷ lệ sống/chết (Invitrogen, Karlsruhe, Đức), dòng kháng thể CD8-FITC SK1 (BD, Heidelberg, Đức) và multime pMHC huỳnh quang. Để phân tích, thiết bị đếm tế bào BD LSRII SORP được trang bị máy phát lượng tử ánh sáng và bộ lọc thích hợp được sử dụng. Các tế bào đặc hiệu peptit được tính theo tỷ lệ % của các tế bào CD8+ toàn phần. Việc đánh giá phép phân tích multime được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình phần mềm FlowJo (Tree Star, Oregon, Mỹ). Sự tạo môi *in vitro* của các tế bào lympho multime+ CD8+ đặc hiệu được phát hiện bằng cách so sánh với sự kích thích đối chứng âm. Tính sinh miễn dịch đối với một kháng nguyên cho trước được phát hiện nếu ít nhất một lỗ được kích thích *in vitro* có thể được đánh giá của một người cho khỏe mạnh được phát hiện là chứa dòng tế bào T CD8+ đặc hiệu sau khi kích thích *in vitro* (nghĩa là lỗ này chứa ít nhất 1% tế bào T multime+ đặc hiệu trong số các tế bào T CD8+ và tỷ lệ % tế bào multime+ đặc hiệu bằng ít nhất 10 lần giá trị trung bình của kết quả kích thích đối chứng âm).

Tính sinh miễn dịch *in vitro* của peptit HCC

Đối với peptit HLA nhóm I được thử nghiệm, tính sinh miễn dịch *in vitro* có thể được chứng minh bằng cách tạo ra các dòng tế bào T đặc hiệu peptit. Kết quả đếm tế bào theo dòng chảy làm ví dụ sau khi nhuộm multime đặc hiệu TUMAP đối với ba

peptit theo sáng chế được thể hiện trên Fig.3 và Fig.4 cùng với các đối chứng âm tương ứng.

Kết quả làm ví dụ của đáp ứng của tế bào T CD8+ *in vitro* đặc hiệu với peptit của người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh (Fig.3)

Các tế bào T CD8+ được tạo môi bằng cách sử dụng tế bào APC nhân tạo được phủ mAb kháng CD28 và HLA-A*02 trong phức hợp với peptit IMA-APOB-002 (Seq ID No 7) (A, ô bên phải) hoặc IMA-APOB-003 (B, ô bên phải, Seq ID No 1), hoặc IMA-ALDH1L1-001 (C, ô bên phải, Seq ID No 2), tương ứng. Sau ba chu trình kích thích, sự phát hiện các tế bào có khả năng phản ứng với peptit được thực hiện bằng cách nhuộm multime 2D bằng A*02/ APOB-002 (A) hoặc A*02/ APOB-003 (B), hoặc A*02/ALDH1L1-001. Các ô bên trái (A, B, C) cho thấy sự nhuộm đối chứng của các tế bào được kích thích bằng phức chất A*02/peptit không liên quan. Các tế bào đơn lẻ còn sống được tạo cổng cho các tế bào lymphô CD8+. Các cổng Boolean giúp loại trừ các sự kiện dương tính giả với multime đặc hiệu đối với các peptit khác nhau. Tần suất của các tế bào multime+ đặc hiệu trong số các tế bào lymphô CD8+ được thể hiện.

Kết quả làm ví dụ của đáp ứng tế bào T CD8+ *in vitro* đặc hiệu với peptit của người cho HLA-A*24+ khỏe mạnh (Fig.4)

Các tế bào T CD8+ được tạo môi bằng cách sử dụng tế bào APC nhân tạo được phủ mAb kháng CD28 và HLA-A*24 trong phức hợp với peptit IMA-KLHL24-001 (Seq ID No 190) (hình A, ô bên phải) hoặc IMA-APOB-006 (hình B, ô bên phải, Seq ID No 218), tương ứng. Sau ba chu kỳ kích thích, việc phát hiện các tế bào phản ứng peptit được thực hiện bằng cách nhuộm multime 2D bằng A*24/ KLHL24-001 (hình A) hoặc A*24/ APOB-006 (B). Các ô bên phải (hình A và B) cho thấy sự nhuộm đối chứng của các tế bào kích thích bằng phức hợp A * 24/peptit không liên quan. Các tế bào đơn lẻ còn sống được tạo cổng cho tế bào lymphô CD8 +. Cổng Boolean đã giúp loại trừ các sự kiện dương tính giả được phát hiện với các multime đặc hiệu với các peptit khác nhau. Tần suất tế bào cụ thể multime+ đặc hiệu trong số các tế bào lymphô CD8 + được thể hiện.

Ví dụ 5: tổng hợp peptit

Tất cả các peptit được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn chuẩn và đã được thiết lập rõ ràng bằng cách sử dụng chiến lược Fmoc.

Tính đồng nhất và độ tinh khiết của mỗi peptit riêng biệt được xác định bằng phương pháp phổ khối và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đảo pha (RP-HPLC) phân tích. Các peptit thu được dưới dạng sản phẩm sản phẩm đông khô màu trắng ngà (muối triflo axetat) với độ tinh khiết > 50%. Tốt hơn nếu tất cả các peptit TUMAP được sử dụng dưới dạng muối triflo-axetat hoặc muối axetat, các dạng muối khác cũng có thể được sử dụng.

Tài liệu tham khảo

- Adler, A. S. et al., Genes Dev. **28** (2014)
- Ahn, Y. H. et al., J Proteomics. **106** (2014)
- Akiyama, H. et al., Oncol Rep. **21** (2009)
- Alam, S. M. et al., Endocr.Relat Cancer **16** (2009)
- Aleman, G. et al., Am J Physiol Endocrinol.Metab **289** (2005)
- Alexanian, A. et al., Cancer Genomics Proteomics. **9** (2012)
- Altenhofer, S. et al., J Biol.Chem. **285** (2010)
- Alvarez, C. et al., J Biol.Chem. **276** (2001)
- Ammerpohl, O. et al., Int.J Cancer **130** (2012)
- Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012)
- Arai, E. et al., Carcinogenesis **33** (2012)
- Araki, T. et al., J Biol.Chem. **286** (2011)
- Arlt, A. et al., Oncogene **28** (2009)
- Arndt, S. et al., Oncol Rep. **18** (2007)
- Arner, E. S. et al., Eur.J Biochem. **267** (2000)
- Atienza, J. M. et al., Mol Cancer Ther **4** (2005)
- Avery-Kiejda, K. A. et al., BMC.Cancer **14** (2014)
- Bachmann, S. B. et al., Mol Cancer **13** (2014)
- Balogh, K. et al., Oncogene **31** (2012)
- Bani, M. R. et al., Mol Cancer Ther **3** (2004)
- Bansal, N. et al., PLoS.One. **6** (2011)
- Barbarulo, A. et al., Oncogene **32** (2013)
- Bell, J. C. et al., Drug Metab Dispos. **40** (2012)
- Ben-Izhak, O. et al., Histopathology **41** (2002)
- Bergada, L. et al., Lab Invest **94** (2014)
- Bergeron, M. J. et al., Mol Aspects Med. **34** (2013)

- Bhattacharya, C. et al., Mol Cancer **11** (2012)
- Bhogaraju, S. et al., Science **341** (2013)
- Bidkhor, G. et al., PLoS.One. **8** (2013)
- Bieche, I. et al., Breast Cancer Res **6** (2004)
- Biswas, S. et al., Biochim.Biophys.Acta **1832** (2013)
- Blanke, K. L. et al., Cancer Causes Control **25** (2014)
- Bodine, S. C. et al., Science **294** (2001)
- Boehringer, J. et al., Biochem.J **448** (2012)
- Bojjireddy, N. et al., J Cell Sci. (2014)
- Booth, D. G. et al., EMBO J **30** (2011)
- Bouquet, C. et al., Mol Ther **14** (2006)
- Boylan, K. L. et al., Proteome.Sci. **8** (2010)
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brockmoller, S. F. et al., J Proteome.Res **11** (2012)
- Buch, S. C. et al., Mol Carcinog. **51 Suppl 1** (2012)
- Bull, C. et al., Cancer Res **74** (2014)
- Burrell, R. A. et al., Nature **494** (2013)
- Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res **12** (2006)
- Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. **9** (2003)
- Byrne, A. et al., Exp.Cell Res **316** (2010)
- Cadenas, C. et al., Cell Cycle **13** (2014)
- Cadoret, A. et al., Oncogene **21** (2002)
- Cao, H. et al., Biochemistry **41** (2002)
- Cao, Y. et al., Cancer Research **61** (2001)
- Cao-Ehlker, X. et al., J Biol.Chem. **288** (2013)
- Carroll, M. et al., J Interferon Cytokine Res **33** (2013)
- Carrouel, F. et al., J Dent.Res **87** (2008)

- Castro, M. et al., J Transl.Med. **8** (2010)
- Chae, Y. S. et al., Med.Oncol **28** (2011)
- Chang, L. O. et al., Cancer Res **33** (1973)
- Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. **59** (2007)
- Chapiro, J. et al., Radiol.Med. **119** (2014)
- Charbonneau, B. et al., Am J Hematol. **87** (2012)
- Chatterjee, M. et al., Haematologica **98** (2013)
- Chen, J. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **420** (2012a)
- Chen, M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **108** (2011a)
- Chen, R. et al., World J Gastroenterol. **17** (2011b)
- Chen, X. et al., J Dig.Dis. **12** (2011c)
- Chen, X. Q. et al., Med.Oncol **29** (2012b)
- Cheng, L. et al., Genomics **102** (2013)
- Choi, Y. W. et al., Int.J Gynecol.Cancer **17** (2007)
- Christa, L. et al., Gastroenterology **106** (1994)
- Clark, A. G. et al., Cytoskeleton (Hoboken.) **69** (2012)
- Claro da, Silva T. et al., Mol.Aspects Med. **34** (2013)
- Cohen, L. et al., Nature **395** (1998)
- Collins, C. L. et al., Surgery **122** (1997)
- Com, E. et al., J Proteomics. **75** (2012)
- Copps, K. D. et al., Diabetologia **55** (2012)
- Cornen, S. et al., PLoS.ONE. **9** (2014)
- Cornez, I. et al., Biochem.Pharmacol. **75** (2008)
- Cowling, V. H., Oncogene **29** (2010)
- Cui, T. et al., Int.J Oncol **39** (2011)
- da Silva, M. G. et al., Exp.Clin Cardiol. **17** (2012)
- Dadkhah, E. et al., Arch.Iran Med. **16** (2013)

- Darmanis, S. et al., PLoS.One. **8** (2013)
- Darvekar, S. et al., Biochem.J **442** (2012)
- Darvekar, S. R. et al., PLoS.One. **9** (2014)
- Datta, K. et al., J Biol.Chem. **284** (2009)
- David, S. et al., Front Biosci.(Elite.Ed) **5** (2013)
- de Almagro, M. C. et al., Biochem.Pharmacol. **81** (2011)
- de Groot, J. F. et al., Cancer Res **65** (2005)
- Deb, S. et al., Br.J Cancer **110** (2014)
- Debauve, G. et al., Cell Mol Life Sci. **65** (2008)
- Decker, T. et al., J Clin Invest **109** (2002)
- Decock, A. et al., Genome Biol. **13** (2012)
- Del Campo, E. M. et al., Mol Phylogenet.Evol. **66** (2013)
- Delaval, B. et al., J Cell Biol. **188** (2010)
- Deng, X. D. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **15** (2014)
- Di, Gregorio E. et al., J Med.Genet. **50** (2013)
- Diggle, C. P. et al., PLoS.Genet. **10** (2014)
- Dimitrov, A. et al., Hum.Mol Genet. **18** (2009)
- Dmitriev, O. Y., Biochem.Cell Biol. **89** (2011)
- Doherty, J. A. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **20** (2011)
- Dong, Z. et al., Crit Rev.Oncol Hematol. **59** (2006)
- Dou, R. et al., Cancer Lett. **336** (2013)
- Drazkowska, K. et al., Nucleic Acids Res **41** (2013)
- Edavana, V. K. et al., Drug Metab Dispos. **41** (2013)
- Edwards, P. A. et al., Breast Cancer Res **14** (2012)
- Elvenes, J. et al., PLoS.One. **6** (2011)
- Emaduddin, M. et al., Cell Commun.Signal. **6** (2008)
- Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. **6** (2014)

- Epelbaum, R. et al., *Pathol.Oncol Res* **4** (1998)
- Fan, T. W. et al., *Mol Cancer* **8** (2009)
- Fang, Z. Q. et al., *Genet.Mol Res* **12** (2013)
- Fassas, A. B. et al., *Leuk.Lymphoma* **45** (2004)
- Feferman, L. et al., *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* **16** (2013)
- Fei, F. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* (2014a)
- Fei, F. et al., *Ann Surg.Oncol* **21** (2014b)
- Feigelson, H. S. et al., *Breast Cancer Res* **10** (2008)
- Feng, L. et al., *Cell Biochem.Funct.* **29** (2011)
- Feng, M. et al., *J Clin Invest* **124** (2014a)
- Feng, S. et al., *Int.J Biol.Sci.* **9** (2013)
- Feng, Y. et al., *J Biol.Chem.* **289** (2014b)
- Feng, Y. et al., *Free Radic.Res* **46** (2012)
- Fernandes, C. F. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **361** (2007)
- Ferre, S. et al., *J Am Soc Nephrol.* **25** (2014)
- Ferrer-Ferrer, M. et al., *Arch.Med.Res* **44** (2013)
- Filmus, J. et al., *FEBS J* **280** (2013)
- Fiorito, V. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1839** (2014)
- Fojo, A. T. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84** (1987)
- Fonseca, A. L. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **51** (2012)
- Fossdal, G. et al., *ScientificWorldJournal.* **2012** (2012)
- Fournier, T. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1482** (2000)
- Fu, W. et al., *J Cell Sci.* **123** (2010)
- Fujitomo, T. et al., *Cancer Res* **72** (2012)
- Furukawa, T. et al., *Sci.Rep.* **1** (2011)
- Furutani, M. et al., *Hepatology* **24** (1996)
- Gadd, S. et al., *Lab Invest* **90** (2010)

- Gailani, D., Trends Cardiovasc.Med. **10** (2000)
- Galamb, O. et al., Helicobacter. **13** (2008)
- Galazis, N. et al., Gynecol.Endocrinol. **29** (2013)
- Gandhi, A. V. et al., Ann Surg.Oncol **20 Suppl 3** (2013)
- Gao, L. et al., Mol Oncol **6** (2012)
- Garcia-Baquero, R. et al., Tumour.Biol. **35** (2014)
- Gardner-Stephen, D. A. et al., Drug Metab Dispos. **35** (2007)
- Garg, M. et al., Cancer **116** (2010a)
- Garg, M. et al., Eur.J Cancer **46** (2010b)
- Gburcik, V. et al., Mol Cell Biol. **25** (2005)
- Gergely, F. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **97** (2000)
- Gervasini, G. et al., Cancer **107** (2006)
- Getty, A. L. et al., Cell Mol Life Sci. **68** (2011)
- Gilabert, M. et al., J Cell Physiol **228** (2013)
- Gilkes, D. M. et al., Mol Cancer Res **11** (2013)
- Giovannetti, E. et al., J Natl.Cancer Inst. **106** (2014)
- Gokmen-Polar, Y. et al., Mod.Pathol. (2014)
- Goldstein, I. et al., Carcinogenesis **34** (2013)
- Gong, Y. et al., Genet.Mol Res **12** (2013)
- Goode, E. L. et al., Clin Cancer Res **16** (2010)
- Gordon, E. M. et al., Am.J Pediatr.Hematol.Oncol **15** (1993)
- Gotzmann, J. et al., Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr. **9** (1999)
- Gray, L. R. et al., Cell Mol Life Sci. **71** (2014)
- Gregory, P. A. et al., J Biol.Chem. **278** (2003)
- Greif, P. A. et al., Leukemia **25** (2011)
- Gu, W. et al., PLoS.One. **7** (2012)
- Guo, L. et al., Cancer Sci. **103** (2012)

- Halon, A. et al., Arch.Gynecol.Obstet. **287** (2013)
- Hamamoto, R. et al., Cancer Sci. **97** (2006)
- Hamilton, S. R. et al., Glycobiology **15** (2005)
- Hamm, A. et al., BMC.Cancer **8** (2008)
- Hanioka, N. et al., Basic Clin Pharmacol.Toxicol. **110** (2012)
- Harris, M. et al., Pharmacogenet.Genomics **24** (2014)
- Hatakeyama, H. et al., Proteomics. **6** (2006)
- Havens, M. A. et al., PLoS.Genet. **10** (2014)
- He, P. et al., Hum.Pathol. **35** (2004)
- He, X. et al., Neoplasma **61** (2014a)
- He, Y. et al., Mol Carcinog. (2014b)
- Hellwinkel, O. J. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **14** (2011)
- Hemmingsson, O. et al., Oncol Rep. **22** (2009)
- Hidalgo-Curtis, C. et al., Br.J Haematol. **148** (2010)
- Hider, J. L. et al., BMC.Evol.Biol. **13** (2013)
- Hinsch, N. et al., BMC.Cancer **9** (2009)
- Hirota, Y. et al., Nucleic Acids Res **28** (2000)
- Hlavata, I. et al., Mutagenesis **27** (2012)
- Hoelz, D. J. et al., Proteomics. **6** (2006)
- Holden, H. M. et al., Cell Mol Life Sci. **61** (2004)
- Honda, K. et al., PLoS.One. **7** (2012)
- Hong, Y. et al., J Biol.Chem. **274** (1999)
- Hood, F. E. et al., Bioarchitecture. **1** (2011)
- Hood, F. E. et al., J Cell Biol. **202** (2013)
- Hopfer, O. et al., Br.J Cancer **93** (2005)
- Horani, A. et al., Am J Hum.Genet. **91** (2012)
- Hou, M. et al., Int.J Mol Med. **33** (2014)

- Hu, D. G. et al., *Drug Metab Rev.* **46** (2014)
- Hua, D. et al., *Int.J Mol Med.* **30** (2012a)
- Hua, T. et al., *J Biol.Chem.* **287** (2012b)
- Huang, O. et al., *Jpn.J Clin Oncol* **43** (2013)
- Huang, S. et al., *Oncogene* **21** (2002)
- Huang, Y. et al., *Oncotarget.* **5** (2014)
- Hughes, H. et al., *J Cell Sci.* **123** (2010)
- Hunecke, D. et al., *J Pathol.* **228** (2012)
- Huopaniemi, L. et al., *Glycobiology* **14** (2004)
- Hyung, S. W. et al., *Mol Cell Proteomics.* **10** (2011)
- Iannitti, T. et al., *Mar.Drugs* **8** (2010)
- Ichida, K. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **282** (2001)
- Ignatova, I. D. et al., *Am J Physiol Endocrinol.Metab* **296** (2009)
- Ikedo, R. et al., *Int.J Oncol* **38** (2011)
- Inuzuka, M. et al., *J Biol.Chem.* **280** (2005)
- Ishiguro, H. et al., *Oncogene* **21** (2002)
- Ishizaki, F. et al., *Sci.Rep.* **3** (2013)
- Ivashchenko, A. T. et al., *Biomed.Res Int.* **2013** (2013)
- Jacquemier, J. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
- Jacques, C. et al., *Br.J Cancer* **101** (2009)
- Jaffe, E. K. et al., *Arch.Biochem.Biophys.* **530** (2013)
- Jakobsson, A. et al., *Prog.Lipid Res* **45** (2006)
- Jamroziak, K. et al., *Eur.J Haematol.* **72** (2004)
- Jeung, H. C. et al., *Oncologist.* **12** (2007)
- Jia, Y. et al., *Br.J Cancer* **110** (2014)
- Jiang, J. G. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
- Jiang, X. et al., *Histol.Histopathol.* **25** (2010)

- Jiang, X. et al., *Mol Carcinog.* (2014)
- Jin, Z. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014)
- Jockusch, H. et al., *Proteomics.* **14** (2014)
- Johnson, M. A. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **1012** (2004)
- Jose-Eneriz, E. S. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008)
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987)
- Jung, H. J. et al., *J Mol Med.(Berl)* **91** (2013)
- Kaira, K. et al., *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.* **13** (2014)
- Kalsotra, A. et al., *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **199** (2004)
- Kalthoff, S. et al., *J Biol.Chem.* **285** (2010)
- Kamiyama, S. et al., *Glycobiology* **21** (2011)
- Kamiyama, S. et al., *J Biol.Chem.* **281** (2006)
- Kandil, D. H. et al., *Adv.Anat.Pathol.* **16** (2009)
- Kandimalla, R. et al., *Nat Rev.Urol.* **10** (2013)
- Karvonen, U. et al., *J Mol Biol.* **382** (2008)
- Kelleher, D. J. et al., *Glycobiology* **16** (2006)
- Khan, A. P. et al., *Neoplasia.* **15** (2013)
- Kim, Y. et al., *Hum.Pathol.* **46** (2015)
- Kim, Y. W. et al., *PLoS.One.* **7** (2012)
- Klein, C. J. et al., *Neurology* **82** (2014)
- Kobayashi, T. et al., *Biochem.J* **400** (2006)
- Kollmann, K. et al., *Cancer Cell* **24** (2013)
- Komatsu, M. et al., *Pharmacol.Res* **66** (2012)
- Kong, S. Y. et al., *Cancer Sci.* **99** (2008)
- Kovacevic, Z. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1783** (2008)
- Kracmarova, A. et al., *Leuk.Lymphoma* **49** (2008)
- Kraemer, N. et al., *Cell Mol Life Sci.* **68** (2011)

- Kress, T. R. et al., Mol Cell **41** (2011)
- Krohn, A. et al., J Pathol. **231** (2013)
- Krupenko, S. A. et al., Cell Growth Differ. **13** (2002)
- Kubota, H. et al., Cell Stress.Chaperones. **15** (2010)
- Kummel, D. et al., EMBO Rep. **6** (2005)
- Kunutsor, S. K. et al., Int.J Cancer (2014)
- Kuriyama, H. et al., Gene **253** (2000)
- Laezza, F. et al., Mol Cell Neurosci. **34** (2007)
- Lahiri, S. et al., PLoS.Biol. **12** (2014)
- Lando, M. et al., J Pathol. **230** (2013)
- Lapucci, A. et al., FASEB J **24** (2010)
- Lascorz, J. et al., BMC.Med.Genet. **13** (2012)
- Lauffart, B. et al., BMC.Womens Health **5** (2005)
- Laverdiere, I. et al., Endocr.Relat Cancer (2014)
- Leasure, C. D. et al., Plant Physiol **150** (2009)
- Lee, C. H. et al., Hum.Reprod. **24** (2009)
- Lee, K. W. et al., J Biol.Chem. **288** (2013)
- Lee, S. J. et al., Toxicol.Lett. (2014)
- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005)
- Lee, Y. C. et al., Int.J Cancer **122** (2008)
- Lekva, T. et al., PLoS.One. **8** (2013)
- LeRoy, P. J. et al., Cancer Res **67** (2007)
- Leung, T. et al., Breast Cancer Res **15** (2013)
- Levenson, V. V. et al., Somat.Cell Mol Genet. **25** (1999)
- Levi, S. et al., Front Pharmacol. **5** (2014)
- Li, D. et al., Protein Cell **5** (2014a)
- Li, N. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **455** (2014)

- Li, X. et al., *Med.Oncol* **31** (2014b)
- Li, Y. et al., *Mol Cell Biol.* **29** (2009)
- Li, Y. H. et al., *World J Gastroenterol.* **18** (2012)
- Liang, J. et al., *PLoS.One.* **3** (2008)
- Lillig, C. H. et al., *Antioxid.Redox.Signal.* **9** (2007)
- Lin, C. H. et al., *J Cell Biol.* **189** (2010)
- Lin, M. C. et al., *Oral Oncol* **50** (2014)
- Lin, S. H. et al., *Oncogene* **23** (2004)
- Lin, Z. et al., *Cell Rep.* **5** (2013)
- Linderorth, J. et al., *Br.J Haematol.* **141** (2008)
- Line, A. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **51** (2002)
- Ling, C. et al., *EMBO J* **26** (2007)
- Linge, A. et al., *J Proteome.Res* **13** (2014)
- Lioutas, A. et al., *EMBO Rep.* **14** (2013)
- Liu, C. et al., *Nat Med.* **20** (2014)
- Liu, C. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **105** (2013a)
- Liu, H. et al., *Carcinogenesis* **34** (2013b)
- Liu, T. W. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106** (2009a)
- Liu, W. et al., *J Biol.Chem.* **279** (2004)
- Liu, Y. et al., *Curr.Drug Targets.* **13** (2012)
- Liu, Y. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **18** (2009b)
- Liu, Y. et al., *Oncol Rep.* **18** (2007)
- Ljungberg, B., *Curr.Opin.Urol.* **17** (2007)
- Llovet, J. M. et al., *N.Engl.J Med.* **359** (2008)
- Lo Re, A. E. et al., *J Biol.Chem.* **287** (2012)
- Lo, W. Y. et al., *J Proteome.Res* **6** (2007)
- Lombardo, Y. et al., *Breast Cancer Res* **16** (2014)

- Lourenco, G. J. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **100** (2006)
- Lovelace, L. L. et al., *J Biol.Chem.* **286** (2011)
- Lung, H. L. et al., *Int J Cancer* **127** (2010)
- Lutcke, H., *Eur.J Biochem.* **228** (1995)
- Ma, X. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003)
- Mackiewicz, A. et al., *Glycoconj.J* **12** (1995)
- Mahajan, K. et al., *Cancer Lett.* **338** (2013)
- Mamtani, M. et al., *BMC.Res Notes* **5** (2012)
- Mariani, L. et al., *Clin Cancer Res* **7** (2001)
- Marina, M. et al., *Front Biosci.(Landmark.Ed)* **19** (2014)
- Markiewski, M. M. et al., *Nat Immunol* **9** (2008)
- Martin, T. A. et al., *Eur.J Cancer* **40** (2004)
- Martinez, H. D. et al., *Genes Cancer* **2** (2011)
- Mathison, J. et al., *Pathobiology* **59** (1991)
- Matsubara, J. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **20** (2011)
- Matusiak, D. et al., *J Histochem.Cytochem.* **55** (2007)
- McGuire, T. A., *Md Med.J* **40** (1991)
- Medjkane, S. et al., *Cell Cycle* **11** (2012)
- Meijers, J. C. et al., *Br.J Haematol.* **108** (2000)
- Mercer, C. A. et al., *Autophagy.* **5** (2009)
- Mercurio, F. A. et al., *Biochemistry* **51** (2012)
- Midorikawa, Y. et al., *Jpn.J Cancer Res.* **93** (2002)
- Miled, C. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
- Milkereit, P. et al., *J Biol.Chem.* **278** (2003)
- Miller, J. C. et al., *Mol Carcinog.* **48** (2009)
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Pancreas* **42** (2013)
- Monaco, M. E. et al., *Transl.Oncol* **3** (2010)

- Morandi, F. et al., PLoS.One. **7** (2012)
- Morrissey, J. J. et al., Urology **83** (2014)
- Mu, J. et al., J Biol.Chem. **272** (1997)
- Murray, D. W. et al., Br.J Cancer **110** (2014)
- Murray, J. I. et al., Mol Biol.Cell **15** (2004)
- Murrin, L. C. et al., J Neuroimmune.Pharmacol. **2** (2007)
- Murthy, K. G. et al., Genes Dev. **9** (1995)
- Mydlikova, Z. et al., Neoplasma **57** (2010)
- Narita, T. et al., Mol Cell Biol. **23** (2003)
- Narjoz, C. et al., PLoS.One. **9** (2014)
- Nelson, E. R. et al., Science **342** (2013)
- Ngeow, J. et al., Cancer Discov. **4** (2014)
- Nibbe, R. K. et al., Mol.Cell Proteomics. **8** (2009)
- Nielsen, M. J. et al., Blood **108** (2006)
- Noda, T. et al., Hepatology **55** (2012)
- Noh, C. K. et al., Clin Biochem. **47** (2014)
- Ntikoudi, E. et al., Cancer Treat.Rev. **40** (2014)
- Nwosu, V. et al., Hum.Mol Genet. **10** (2001)
- Obholz, K. L. et al., Dev.Biol. **298** (2006)
- Oeffner, F. et al., Am J Hum.Genet. **84** (2009)
- Ofman, R. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **281** (2001)
- Ohshima, K. et al., Mol Biol.Evol. **27** (2010)
- Oiso, S. et al., Oncol Rep. **31** (2014)
- Oji, Y. et al., Int.J Oncol **44** (2014)
- Osada, H. et al., Int.J Cancer **112** (2004)
- Otero-Rey, E. M. et al., Oral Oncol **44** (2008)
- Palmer, D. H. et al., Hepatology **49** (2009)

- Panico, F. et al., *Adv.Cancer Res* **105** (2009)
- Park, B. L. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **363** (2007)
- Patel, M. R. et al., *Laryngoscope* **121** (2011)
- Patel, S. A. et al., *Br.J Cancer* (2014)
- Pattani, K. M. et al., *PLoS.ONE.* **7** (2012)
- Pavelec, D. M. et al., *Genetics* **183** (2009)
- Pawlowska, M. et al., *Drug Metab Dispos.* **41** (2013)
- Pehlivan, D. et al., *Eur.J Hum.Genet.* **22** (2014)
- Pei, Z. et al., *PLoS.One.* **8** (2013)
- Pellanda, H. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol.* **44** (2012)
- Peng, R. et al., *J Cell Biol.* **157** (2002)
- Perera, S. et al., *J Muscle Res Cell Motil.* **33** (2012)
- Persaud-Sawin, D. A. et al., *Hum.Mol Genet.* **11** (2002)
- Peters, D. G. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14** (2005)
- Pizon, V. et al., *J Cell Sci.* **115** (2002)
- Placke, T. et al., *Blood* **124** (2014)
- Plebani, R. et al., *Neoplasia.* **14** (2012)
- Poh, W. et al., *Mol Cancer* **11** (2012)
- Porkka, K. P. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **39** (2004)
- Pylypenko, O. et al., *Mol Cell* **11** (2003)
- Qi, L. et al., *Cancer Res* **74** (2014)
- Qin, Y. et al., *Pigment Cell Melanoma Res* **26** (2013)
- Quayle, S. N. et al., *Neuro Oncol* **14** (2012)
- Quek, H. H. et al., *DNA Cell Biol.* **16** (1997)
- Quidville, V. et al., *Cancer Res* **73** (2013)
- Rajadhyaksha, A. M. et al., *Am.J Hum.Genet.* **87** (2010)
- Rajasekaran, A. K. et al., *Nucleic Acids Res* **23** (1995)

- Rajendran, M. et al., *Cancer Metastasis Rev.* **29** (2010)
- Rakheja, D. et al., *Mol Genet.Metab* **93** (2008)
- Ramana, C. V. et al., *EMBO J* **19** (2000)
- Rashad, N. M. et al., *Cytokine* **68** (2014)
- Rath, N. et al., *EMBO Rep.* **13** (2012)
- Recupero, D. et al., *Rom.J Morphol.Embryol.* **51** (2010)
- Reinisch, W. et al., *J Immunother.* **25** (2002)
- Rekdal, C. et al., *J Biol.Chem.* **275** (2000)
- Ren, Y. G. et al., *Mol Biol.Cell* **15** (2004)
- Rennoll, S. A. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **443** (2014)
- Rifas, L. et al., *Arthritis Rheum.* **60** (2009)
- Riihila, P. M. et al., *J Invest Dermatol.* **134** (2014)
- Rodriguez, F. J. et al., *J Neuropathol.Exp.Neurol.* **67** (2008)
- Rogov, V. et al., *Mol Cell* **53** (2014)
- Romanuik, T. L. et al., *BMC.Genomics* **10** (2009)
- Roodman, G. D., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **1192** (2010)
- Rosado, I. V. et al., *RNA.* **10** (2004)
- Rose, A. E. et al., *Cancer Res* **71** (2011)
- Ross, H. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* **136** (2012)
- Rossi, M. R. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* **161** (2005)
- Rotondo, R. et al., *Int.J Cancer* **125** (2009)
- Rucksaken, R. et al., *Cancer Biomark.* **12** (2012)
- Ruiz, F. X. et al., *Biochem.J* **440** (2011)
- Ruiz, F. X. et al., *Front Pharmacol.* **3** (2012)
- Rutkowski, M. J. et al., *Mol Cancer Res* **8** (2010)
- Rylova, S. N. et al., *Cancer Res* **62** (2002)
- Sahm, F. et al., *Cancer Res* **73** (2013)

- Sahu, A. et al., Immunol Res **17** (1998)
- Saito, T. et al., J Biol.Chem. **278** (2003)
- Salahshor, S. et al., J Clin Pathol. **58** (2005)
- Sang, W. et al., Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi. **42** (2013)
- Sangro, B. et al., J Clin Oncol **22** (2004)
- Sanz, L. et al., Mol Cell Biol. **15** (1995)
- Saponaro, C. et al., Cancer Biomark. **14** (2014)
- Sarajlic, A. et al., Breast Cancer Res Treat. **143** (2014)
- Sasahira, T. et al., Eur.J Cancer **50** (2014)
- Schneider, E. et al., Clin Chim.Acta **374** (2006)
- Schofield, A. V. et al., Crit Rev.Biochem.Mol Biol. **48** (2013)
- Schulz, E. G. et al., Immunity. **30** (2009)
- Seifert, M. et al., J Pathol. **205** (2005)
- Senchenko, V. et al., Oncogene **22** (2003)
- Shaughnessy, J. D., Jr. et al., Blood **118** (2011)
- Shen, F. et al., J Cell Biochem. **112** (2011)
- Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004a)
- Shi, Y. et al., Exp.Cell Res **296** (2004b)
- Shi, Z. Z. et al., Clin Transl.Oncol **16** (2014)
- Shinji, S. et al., Oncol Rep. **15** (2006)
- Shodeinde, A. et al., J Mol Biochem. **2** (2013)
- Shubbar, E. et al., BMC.Cancer **13** (2013)
- Shurbaji, M. S. et al., Am J Clin Pathol. **96** (1991)
- Sillars-Hardebol, A. H. et al., Gut **61** (2012)
- Singh, S. et al., Tumour.Biol. (2014)
- Smith, P. et al., Clin Cancer Res **13** (2007)
- Song, C. et al., J Biol.Chem. **288** (2013)

- Srivenugopal, K. S. et al., *Cancer Lett.* **117** (1997)
- Staal-van den Brekel AJ et al., *Br.J Cancer* **76** (1997)
- Steen, H. C. et al., *J Interferon Cytokine Res.* **32** (2012)
- Stefanska, B. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014)
- Strassburg, C. P. et al., *J Biol.Chem.* **273** (1998)
- Strassburg, C. P. et al., *Mol Pharmacol.* **52** (1997)
- Sudo, H. et al., *Genomics* **95** (2010)
- Sugihara, T. et al., *J Biol.Chem.* **276** (2001)
- Sun, C. et al., *Pathol.Res Pract.* **210** (2014)
- Sun, X. et al., *J Pathol.* **226** (2012)
- Sun, X. et al., *Protein Cell* **4** (2013)
- Sun, X. J. et al., *Zhonghua Yi.Xue.Yi.Chuan Xue.Za Zhi.* **22** (2005)
- Supernat, A. et al., *Oncol Lett.* **4** (2012)
- Surmacz, E., *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **18** (2013)
- Suzuki, K. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **368** (2008)
- Swallow, C. J. et al., *Oncogene* **24** (2005)
- Tabuchi, K. et al., *J Neurosci.* **22** (2002)
- Taguchi, O. et al., *Clin Chim.Acta* **244** (1996)
- Takayama, T. et al., *Cancer* **68** (1991)
- Takayama, T. et al., *Lancet* **356** (2000)
- Takeda, Y. et al., *Glycobiology* **24** (2014)
- Takemasa, I. et al., *Int.J Oncol* **40** (2012)
- Takeuchi, A. et al., *Mol Cell Endocrinol.* **384** (2014)
- Tan, L. Z. et al., *Am J Pathol.* **183** (2013)
- Tan, M. K. et al., *Mol Cell Biol.* **31** (2011)
- Tanahashi, N. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **243** (1998)
- Tanaka, M. et al., *Mol Med.Rep.* **7** (2013)

- Tang, L. et al., Arch.Med.Res **43** (2012)
- Tang, X. H. et al., Annu.Rev.Pathol. **6** (2011)
- Tao, J. et al., Sci.Transl.Med. **3** (2011)
- Tao, R. H. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **341** (2006)
- Tao, T. et al., Cell Res **23** (2013)
- Tarao, K. et al., Cancer **86** (1999)
- Tarao, K. et al., Cancer **79** (1997)
- Tasker, P. N. et al., Osteoporos.Int. **17** (2006)
- Telikicherla, D. et al., Clin Proteomics. **9** (2012)
- Tian, T. et al., Eur.J Cancer **48** (2012)
- Tian, Y. et al., BMC.Cancer **14** (2014)
- Tomiyama, K. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **107** (2010)
- Tomoda, T. et al., J Gastroenterol.Hepatol. **27** (2012)
- Tong, J. et al., PLoS.One. **8** (2013)
- Tortorella, S. et al., J Membr.Biol. **247** (2014)
- Tran, E. et al., Science **344** (2014)
- Trougakos, I. P., Gerontology **59** (2013)
- Tsai, H. Y. et al., Oncogene **32** (2013)
- Uddin, S. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **4** (2011)
- Uehara, Y. et al., Cancer Res **43** (1983)
- Urig, S. et al., Semin.Cancer Biol. **16** (2006)
- Vainio, P. et al., Am.J Pathol. **178** (2011)
- van der Spek, P. J. et al., Genomics **31** (1996)
- van Zuylen, W. J. et al., PLoS.Pathog. **8** (2012)
- van, den Broek, I et al., Proteomics.Clin Appl. **4** (2010)
- van, Duin M. et al., Haematologica **96** (2011)
- Vejda, S. et al., Mol Cell Proteomics. **1** (2002)

- Vincent, F. et al., Cancer Res **69** (2009)
- Wang, B. S. et al., Cell Stress.Chaperones. **18** (2013a)
- Wang, D. et al., J Biol.Chem. **277** (2002)
- Wang, J. et al., Eur.J Cancer Prev. **22** (2013b)
- Wang, J. et al., J Clin Invest **112** (2003)
- Wang, J. et al., Cancer Prev.Res (Phila) **6** (2013c)
- Wang, J. C. et al., Oncology **81** (2011)
- Wang, M. et al., Chin J Physiol **55** (2012)
- Wang, S. K. et al., PLoS.Genet. **9** (2013d)
- Wang, S. S. et al., PLoS.One. **5** (2010)
- Wang, X. et al., Urol.Int. **92** (2014)
- Wang, Y. et al., J Biol.Chem. **274** (1999)
- Wang, Y. et al., Med.Oncol **32** (2015)
- Wazir, U. et al., Cell Mol Biol.Lett. **18** (2013)
- Wazir, U. et al., Anticancer Res **32** (2012)
- Weiss, J. et al., Int.J Antimicrob.Agents **41** (2013)
- Welsh, M. M. et al., Carcinogenesis **29** (2008)
- Wieser, R., Leuk.Lymphoma **43** (2002)
- Wilhelm, S. M. et al., Cancer Res. **64** (2004)
- Williams, A. L. et al., Nature **506** (2014)
- Witte, I. et al., Cell Death.Dis. **2** (2011)
- Wong, K. K. et al., Leukemia **28** (2014)
- Wong, N. et al., J Hepatol. **38** (2003)
- Wu, L. et al., Ann Hematol. **91** (2012)
- Wu, N. et al., Int.J Mol Sci. **14** (2013a)
- Wu, W. et al., Sci.China Life Sci. **56** (2013b)
- Wu, X. et al., Am.J Clin Exp.Urol. **2** (2014)

- Wu, Y. M. et al., Cancer Res **71** (2011)
- Xiao, J. et al., J Biol.Chem. **276** (2001)
- Xie, F. W. et al., Neoplasma **61** (2014)
- Xu, H. et al., Cell Rep. **9** (2014)
- Xu, X. et al., Proteomics. **10** (2010)
- Yan, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001)
- Yang, C. et al., Virchows Arch. **463** (2013)
- Yang, C. Y. et al., J Immunol **192** (2014a)
- Yang, H. et al., Oncol Rep. **24** (2010)
- Yang, H. W. et al., Oncogene **0** (2014b)
- Yang, R. et al., Mol Cell Biol. **31** (2011a)
- Yang, Z. J. et al., Mol Cancer Ther **10** (2011b)
- Yau, C. et al., Breast Cancer Res **12** (2010)
- Ye, X. H. et al., Mol Genet.Genomics (2014)
- Yoon, J. K. et al., J Transl.Med. **12** (2014)
- Yoshimura, S. et al., J Cell Biol. **191** (2010)
- Yoshizuka, N. et al., Mol Cancer Res **10** (2012)
- Yosten, G. L. et al., Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol **303** (2012)
- Yu, J. H. et al., RNA. **11** (2005)
- Yu, K. et al., PLoS.Genet. **4** (2008)
- Yue, C. et al., Int.J Cancer **136** (2015)
- Zamanian-Daryoush, M. et al., J Biol.Chem. **288** (2013)
- Zarling, A. L. et al., Cancer Res **74** (2014)
- Zekri, A. R. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **13** (2012)
- Zelcer, N. et al., Mol Cell Biol. **34** (2014)
- Zhang, D. et al., Pak.J Med.Sci. **29** (2013a)
- Zhang, H. et al., Oncotarget. **4** (2013b)

- Zhang, H. T. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1839** (2014a)
- Zhang, J. et al., *Drug Metab Dispos.* **34** (2006)
- Zhang, S. et al., *BMC.Cancer* **11** (2011)
- Zhang, X. et al., *PLoS.One.* **7** (2012)
- Zhang, X. D. et al., *Int.J Clin Exp.Med.* **7** (2014b)
- Zhao, Y. et al., *Cell Death.Dis.* **4** (2013)
- Zhou, B. et al., *Cancer Biol.Ther* **13** (2012)
- Zhou, D. et al., *PLoS.One.* **8** (2013a)
- Zhou, J. et al., *Oncol Rep.* **30** (2013b)
- Zhou, J. et al., *Lung Cancer* **14** (1996)
- Zhu, H. et al., *Cell Stress.Chaperones.* (2014a)
- Zhu, W. L. et al., *Anticancer Res* **29** (2009)
- Zhu, X. et al., *Biomed.Pharmacother.* **68** (2014b)
- Zhuang, Z. et al., *J Neurosurg.* **115** (2011)
- Zietek, Z. et al., *Pol.Tyg.Lek.* **51** (1996)
- Zou, W. et al., *Cancer Sci.* **101** (2010)
- Zu, X. et al., *Molecules.* **18** (2013)
- Zu, X. Y. et al., *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* **7** (2012)
- Zynda, E. R. et al., *Cell Cycle* **13** (2014)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 47, hoặc muối được dụng của nó, trong đó peptit này có chiều dài tối đa 30 axit amin, và trong đó peptit này có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex: MHC) ở người nhóm I.
2. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit này có chiều dài tối đa 16 axit amin, và tốt hơn là trong đó peptit này gồm trình tự amin amin theo SEQ ID No. 47.
3. Peptit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó peptit này bao gồm các liên kết không peptit và/hoặc trong đó peptit này là một phần của protein dung hợp chứa các axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii).
4. Kháng thể hòa tan hoặc liên kết màng, trong đó kháng thể này nhận biết đặc hiệu peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, tốt hơn nếu peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 được gắn kết với phân tử MHC.
5. Thụ thể tế bào T (T-cell receptor: TCR), hòa tan hoặc liên kết màng, có khả năng phản ứng với phối tử HLA, trong đó phối tử này có tính đồng nhất ít nhất 88% với, và tốt hơn là bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 47, và trong đó tùy ý, thụ thể TCR này được tạo ra dưới dạng phân tử hòa tan và tùy ý mang thêm chức năng hiệu ứng khác như miền kích thích miễn dịch hoặc độc tố.
6. Axit nucleic mã hóa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, kháng thể theo điểm 4, thụ thể TCR theo điểm 5.
7. Vector biểu hiện biểu hiện axit nucleic theo điểm 6.
8. Tế bào chủ chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc axit nucleic theo điểm 6 hoặc vector biểu hiện theo điểm 7, trong đó tốt hơn là tế bào chủ nêu trên là tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào đuôi gai, hoặc tế bào T

hoặc tế bào NK.

9. Phương pháp tạo ra peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, kháng thể theo điểm 4, hoặc thụ thể TCR theo điểm 5, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 8 chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc biểu hiện axit nucleic theo điểm 6 hoặc vector biểu hiện theo điểm 7, và phân lập peptit nêu trên, kháng thể nêu trên hoặc thụ thể TCR nêu trên ra khỏi tế bào chủ và/hoặc môi trường nuôi cấy của nó.
10. Phương pháp tạo ra tế bào lymphô T hoạt hóa *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước cho các tế bào T tiếp xúc *in vitro* với kháng nguyên được tải các phân tử MHC nhóm I của người được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp hoặc cấu trúc nhân tạo bất chước tế bào trình diện kháng nguyên trong khoảng thời gian đủ để hoạt hóa các tế bào T này theo cách đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này là peptit theo điểm 1 hoặc 2.
11. Tế bào T hoạt hóa được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 10, trong đó tế bào này nhận biết chọn lọc tế bào chứa polypeptit có trình tự axit amin được nêu trong điểm 1 hoặc 2.
12. Dược phẩm chứa ít nhất một hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, kháng thể theo điểm 4, hoặc thụ thể TCR theo điểm 5, axit nucleic theo điểm 6 hoặc vector biểu hiện theo điểm 7, tế bào chủ chứa vector biểu hiện theo điểm 8, tế bào lymphô T hoạt hóa theo điểm 11, và chất mang dược dụng, và tùy ý, tá dược và/hoặc chất ổn định dược dụng
13. Kit bao gồm:
 - (a) đồ chứa để đựng dược phẩm theo điểm 12 ở dạng dung dịch hoặc dạng đông khô;
 - (b) tùy ý, đồ chứa thứ hai để đựng chất pha loãng hoặc dung dịch hoàn nguyên dùng cho chế phẩm dạng đông khô;
 - (c) tùy ý, hướng dẫn để (i) sử dụng dung dịch hoặc (ii) hoàn nguyên và/hoặc

sử dụng sản phẩm dạng đông khô, và, tùy ý;

(d) kit này còn chứa một hoặc nhiều thành phần trong số (iii) chất đệm, (iv) chất pha loãng, (v) dụng cụ lọc, (vi) kim tiêm, hoặc (vii) bơm tiêm.

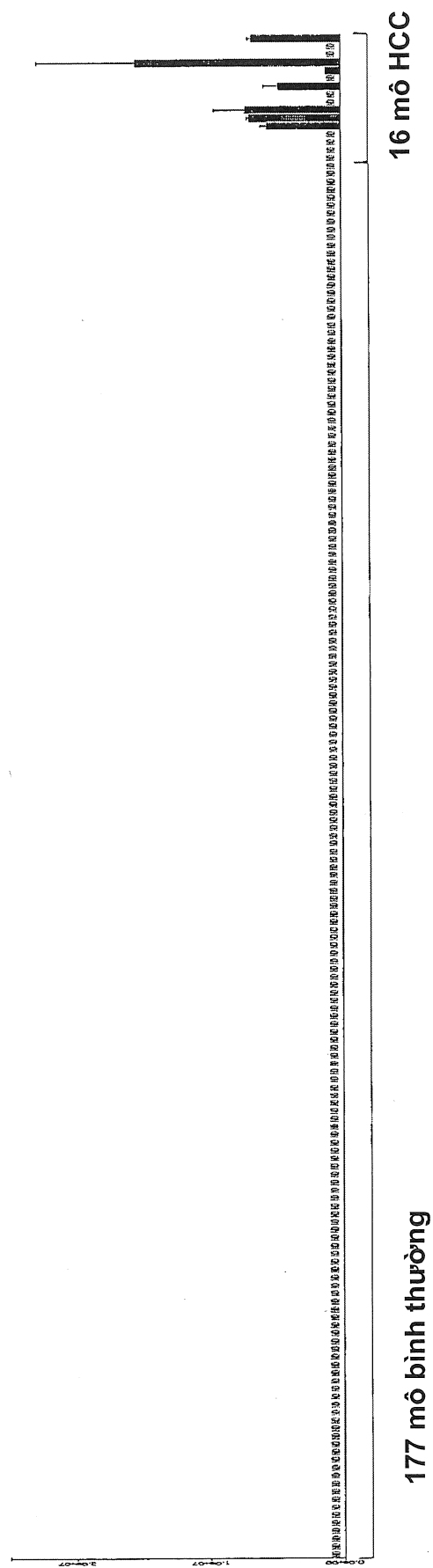
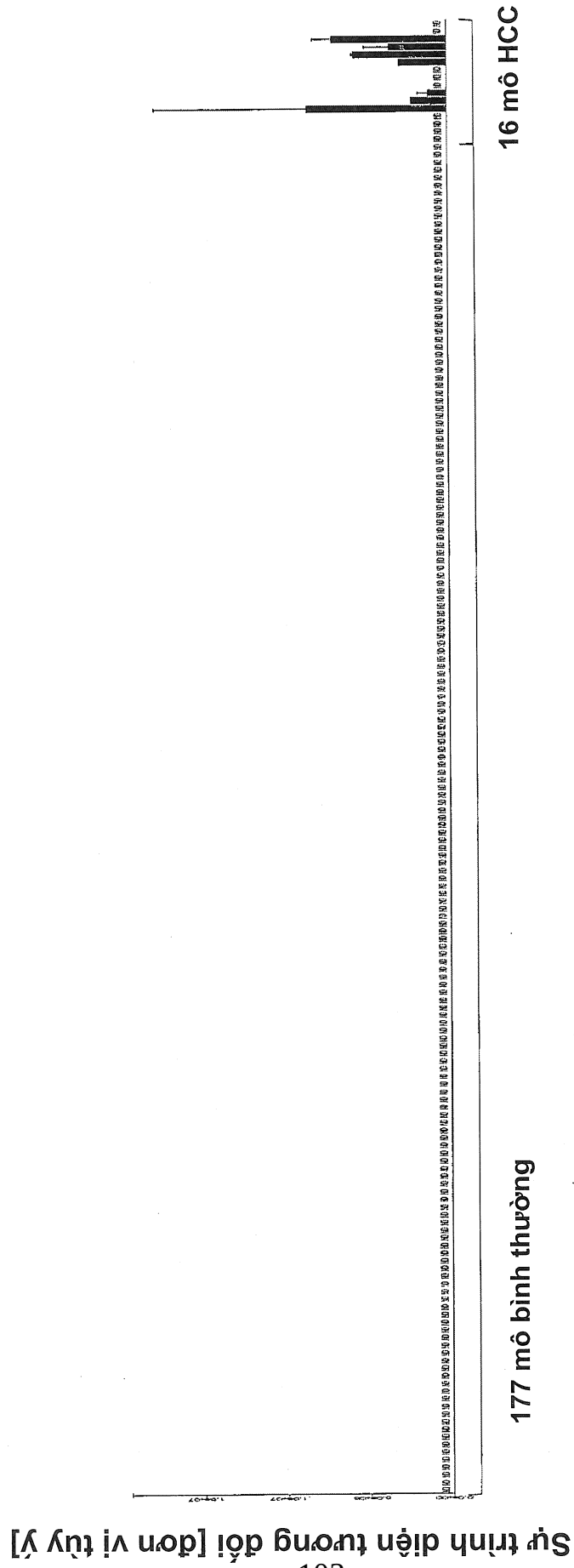


Fig.1A

Peptit: ALVDTLKFV (A*02)

Fig.1B

Peptit: KLQAGTVFV (A*02)



Peptit: AYLLQPSQF(A*24)

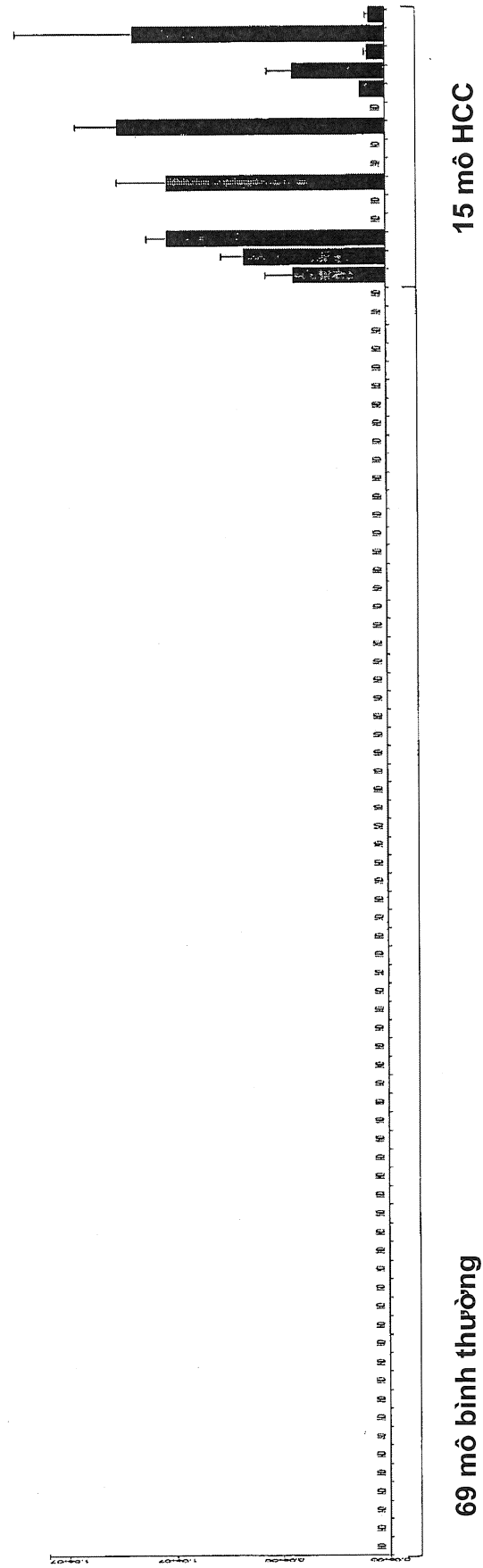


Fig.1D

Peptit: KIDEKNFVV (A*02)

Seq ID: 63

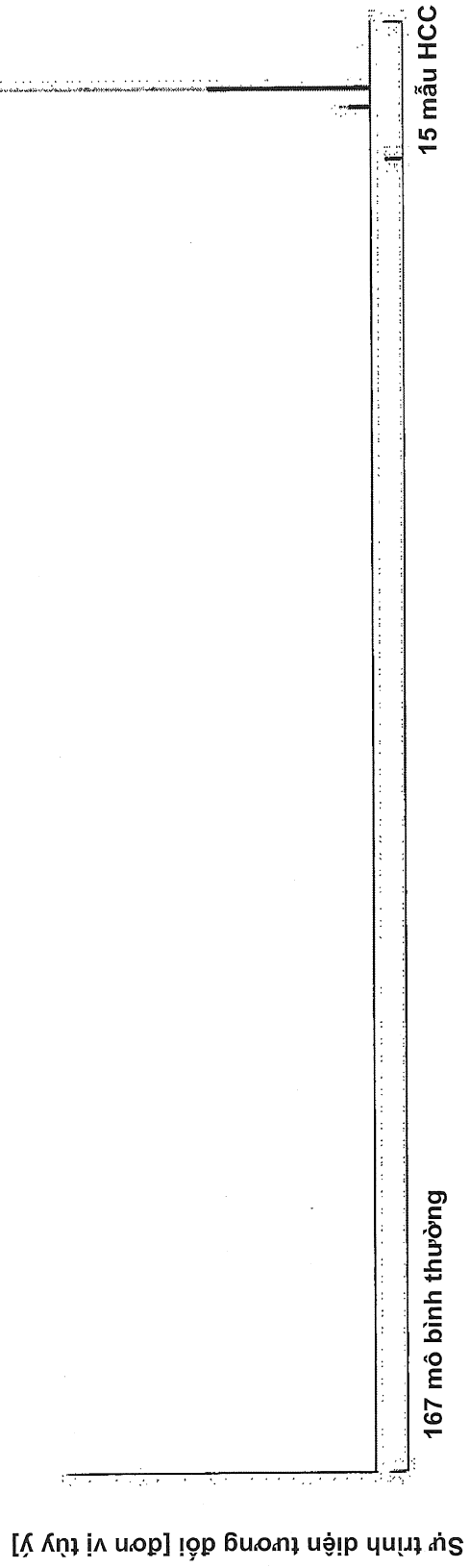


Fig.1E

Peptit: KIDEKNFVV (A*02)

SEQ ID: 63

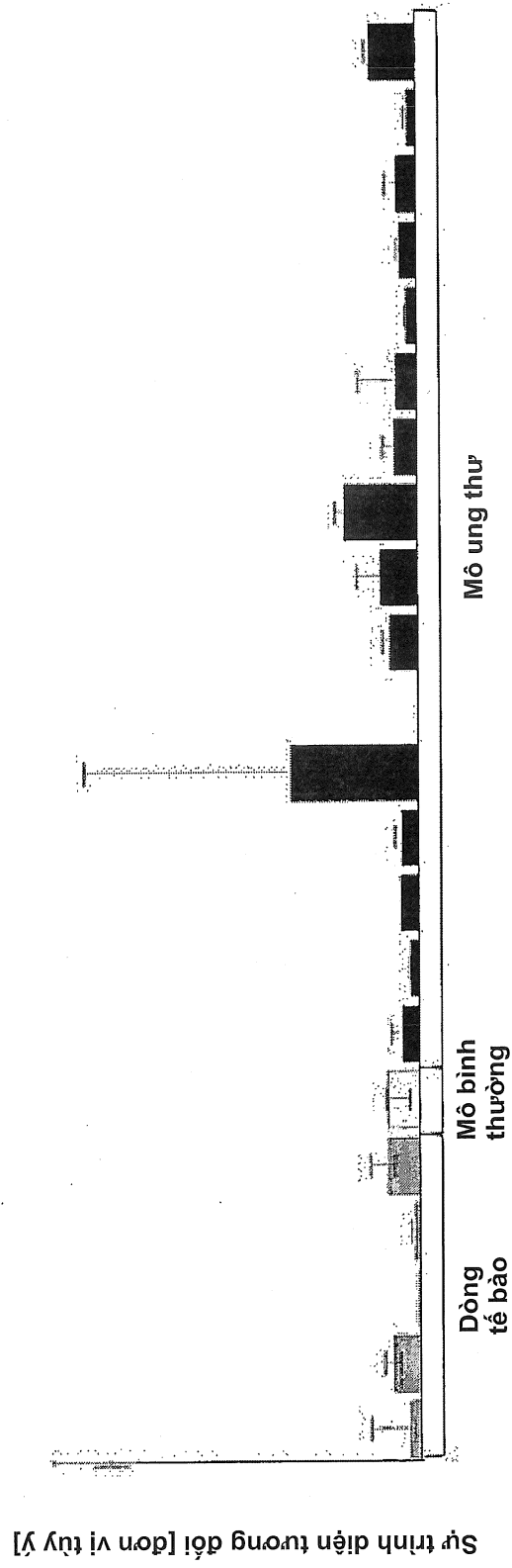


Fig.1F

Peptit: RLPPDTLLQQV (A*02)

Seq ID: 92

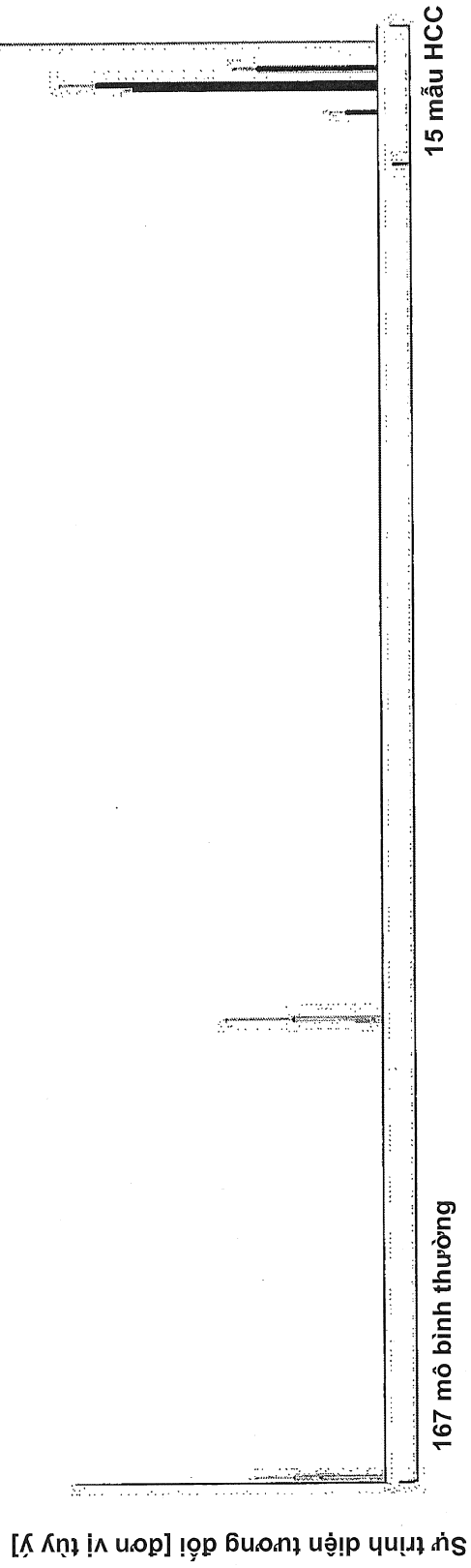


Fig.1G

Peptit: RLPPDTLLQQV (A*02)

SEQ.ID: 92

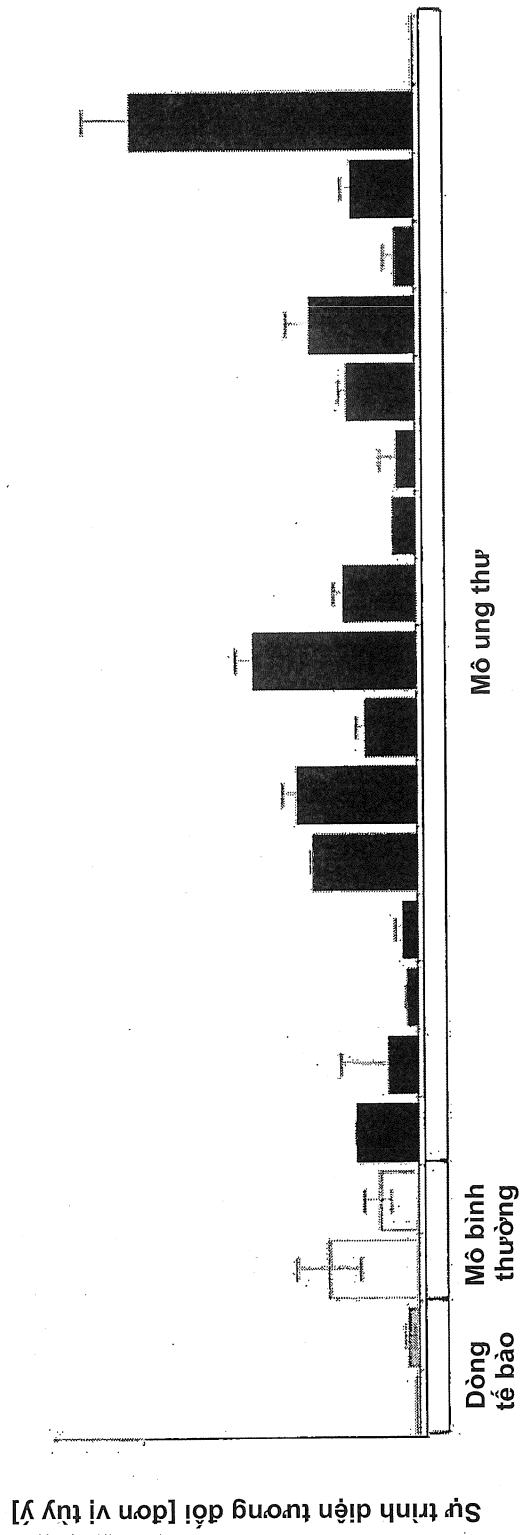


Fig.1H

Peptit: SVWFGPKEV (A*02)

Seq ID: 104

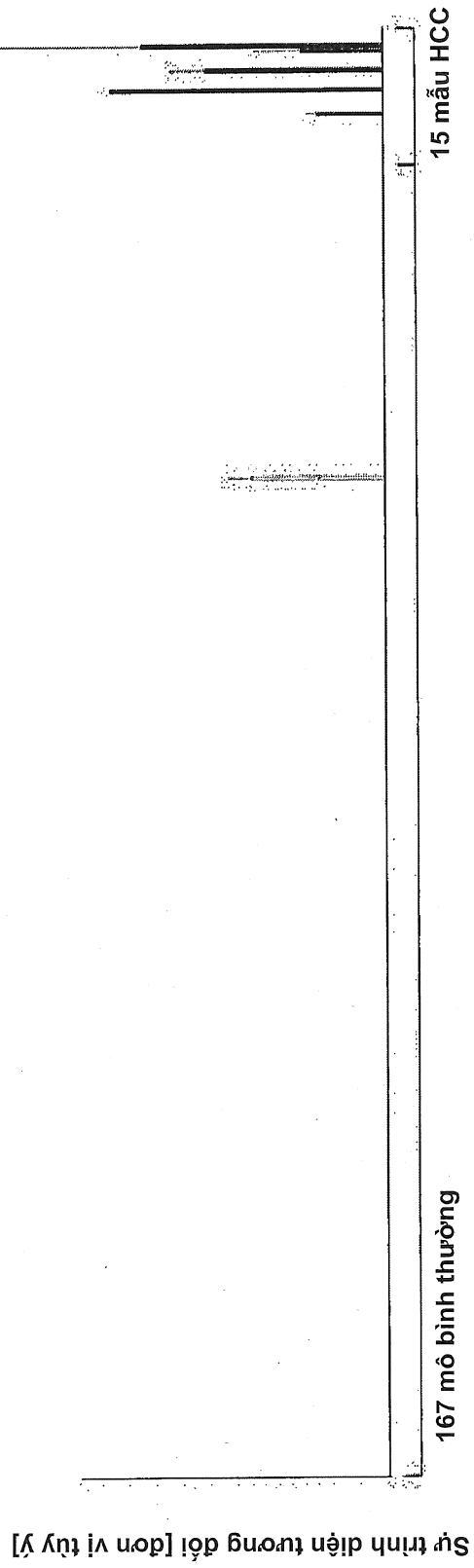


Fig.1I

Peptit: SVWFGPKV (A*02)
SEQ ID: 104

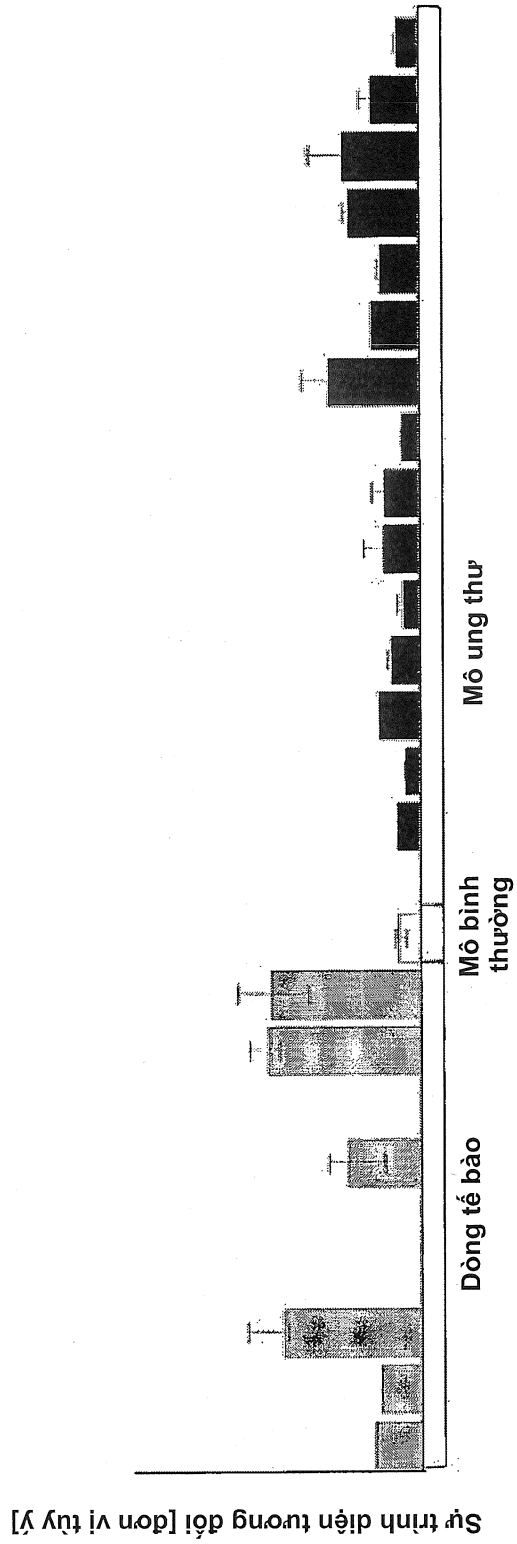


Fig.1J

Peptit: LLFPHPVNQV (A*02)

Seq ID: 156

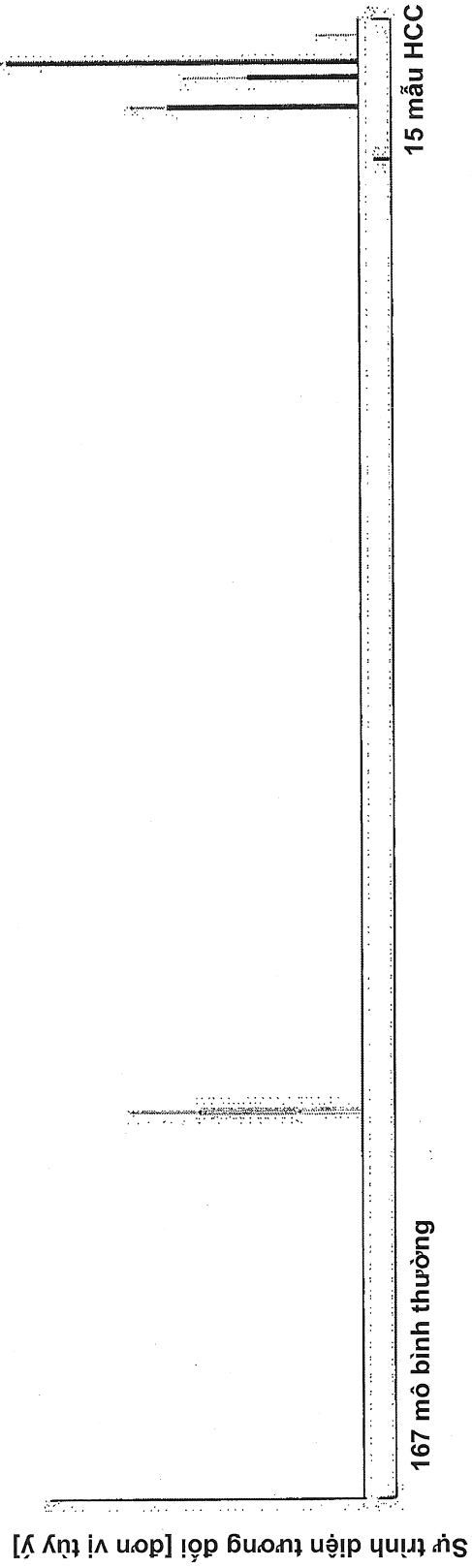


Fig.1K

Peptit: LLFPHPVNQV (A*02)
SEQ ID: 156

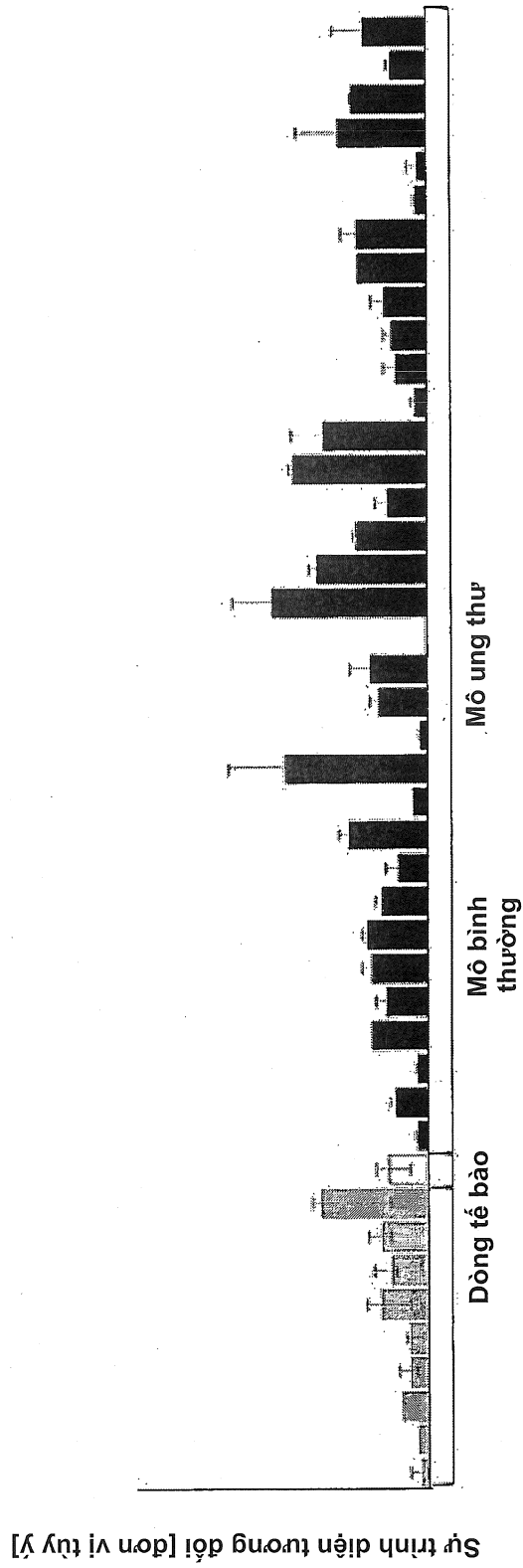
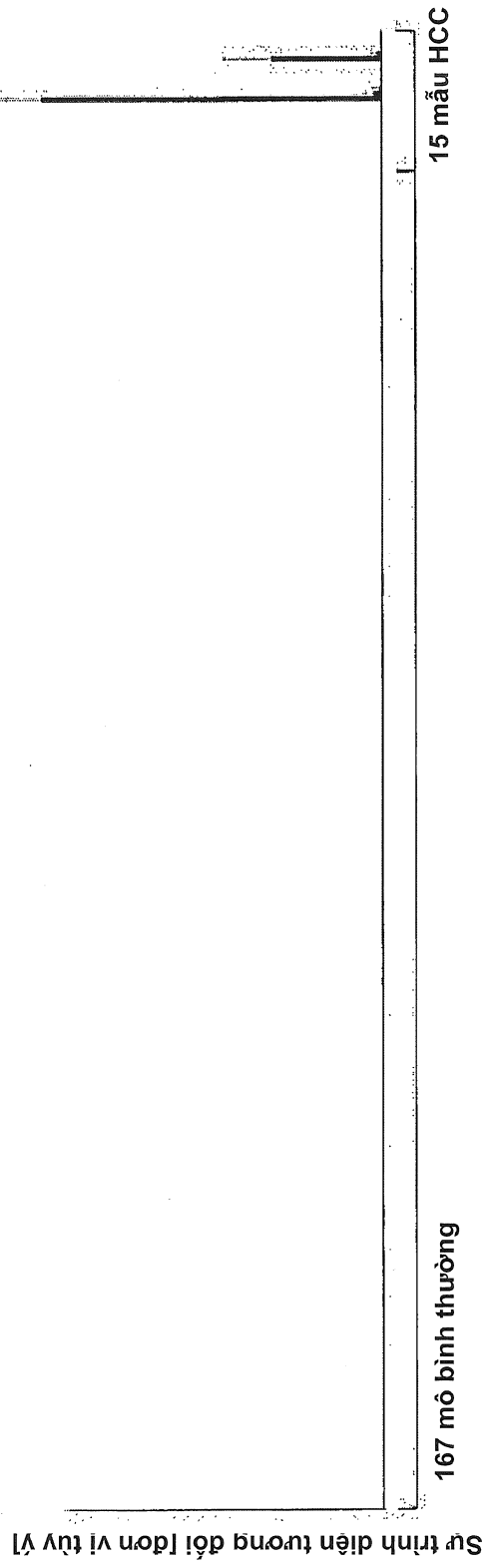


Fig.1L

Peptit: FLDTPIAKV (A*02)

Seq ID: 47



Peptit: FLDTPIAKV (A*02)
SEQ ID: 47

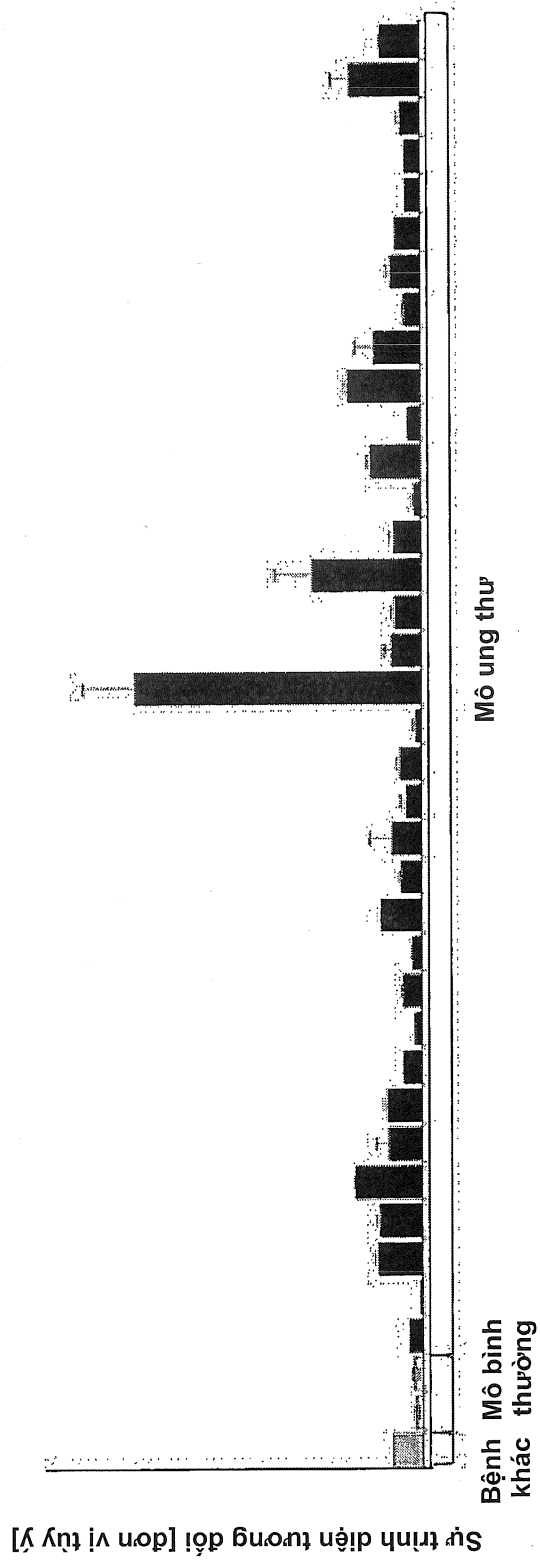


Fig.2A

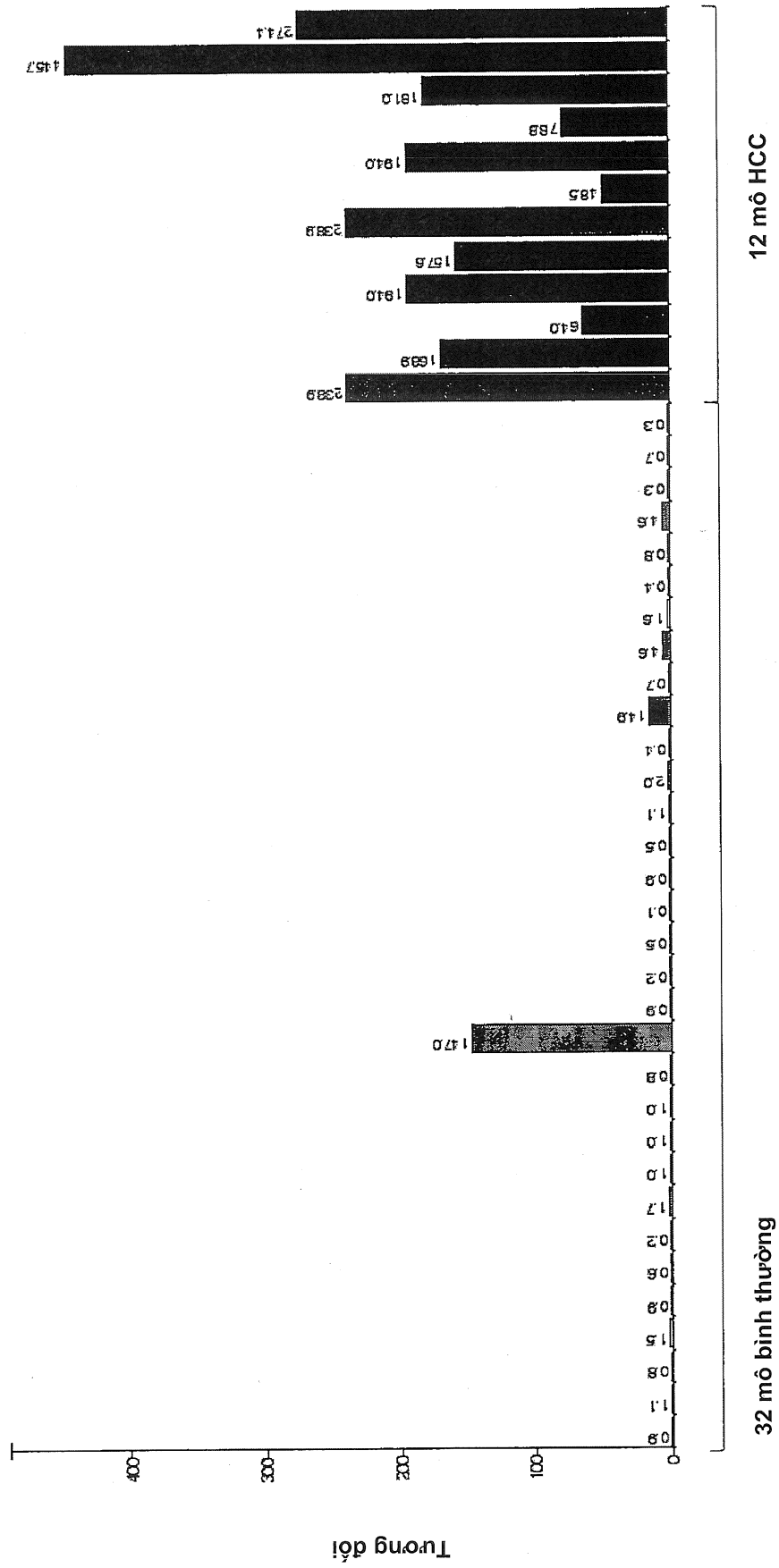


Fig.2B

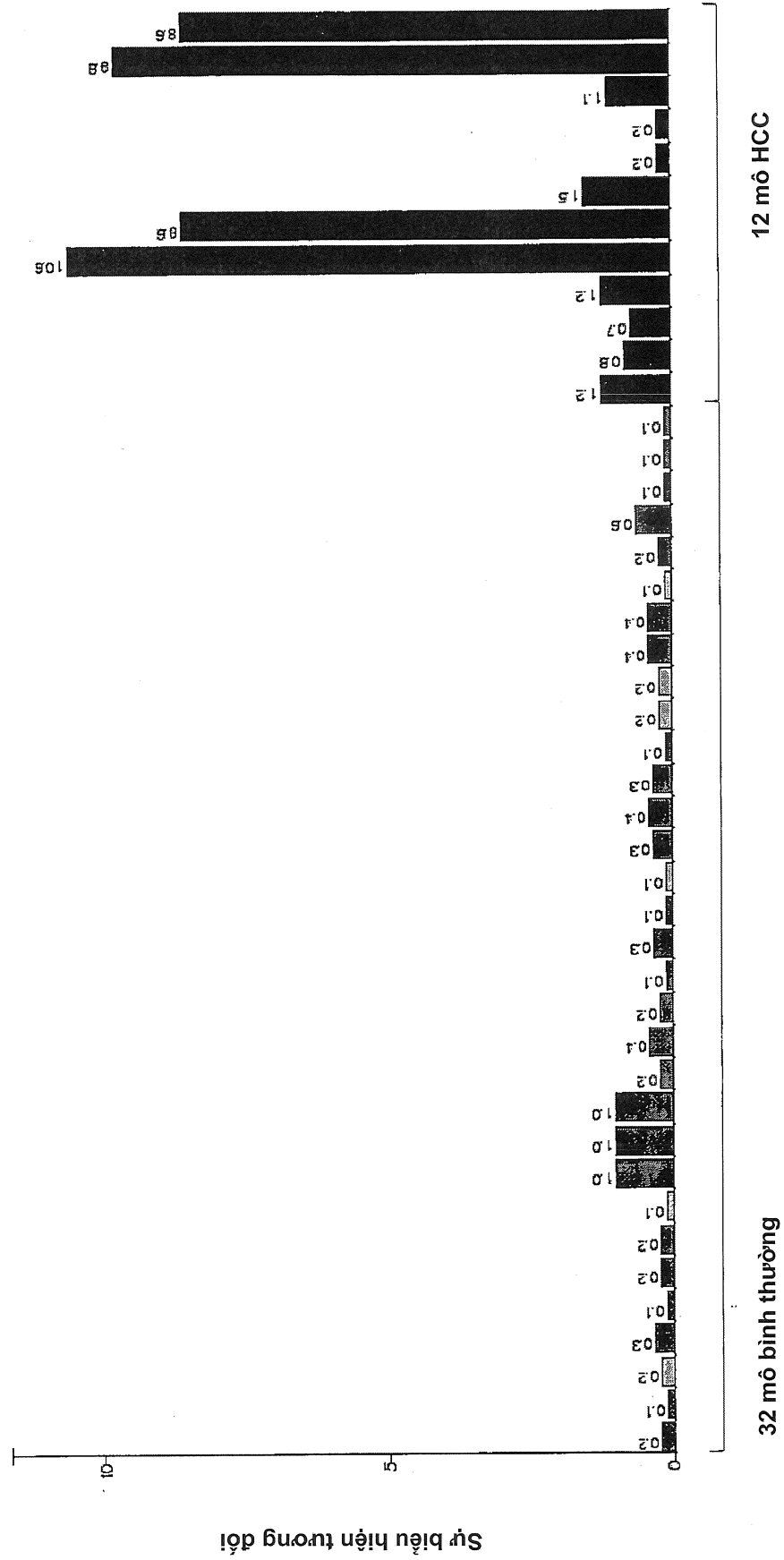


Fig.2C

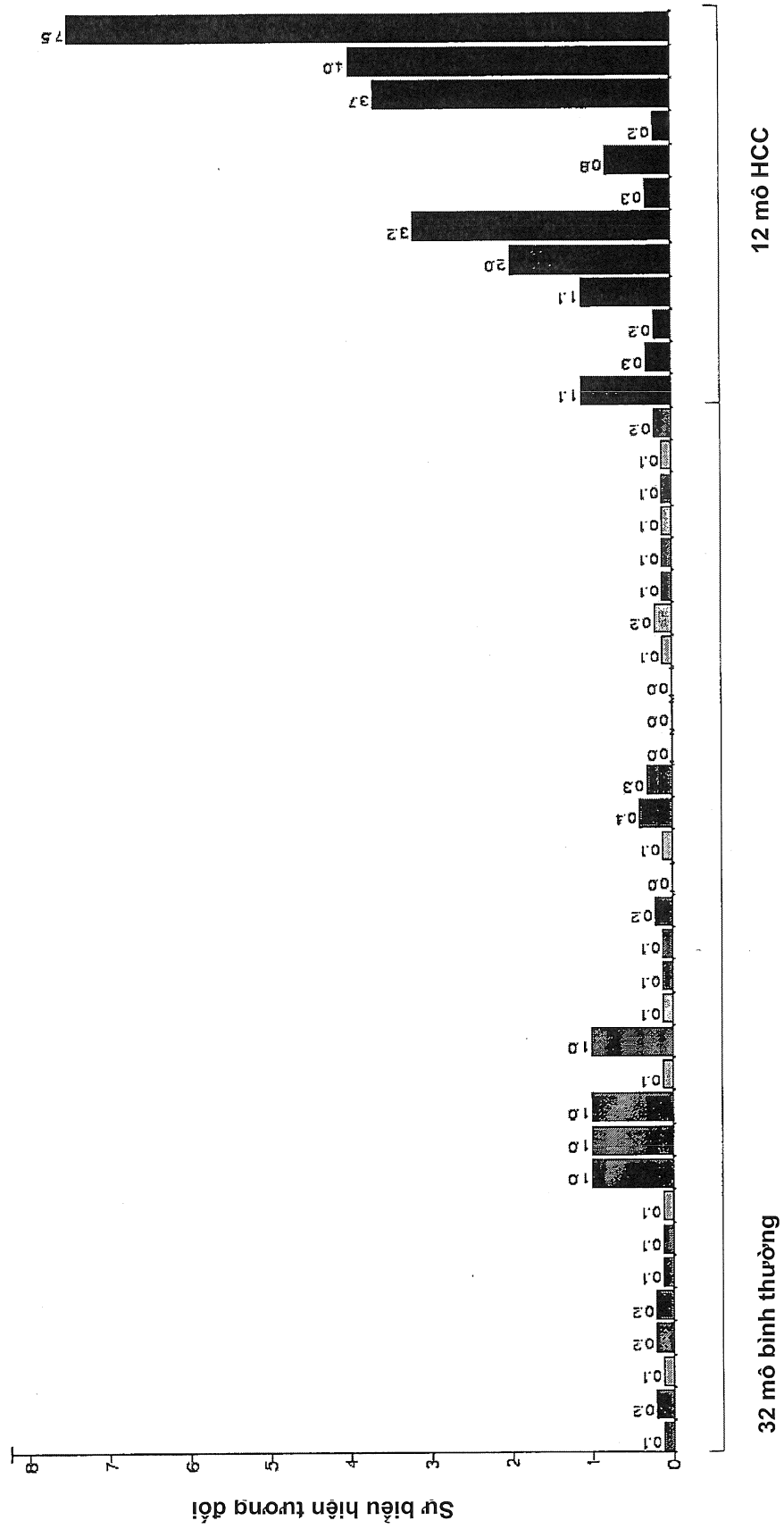


Fig.2D

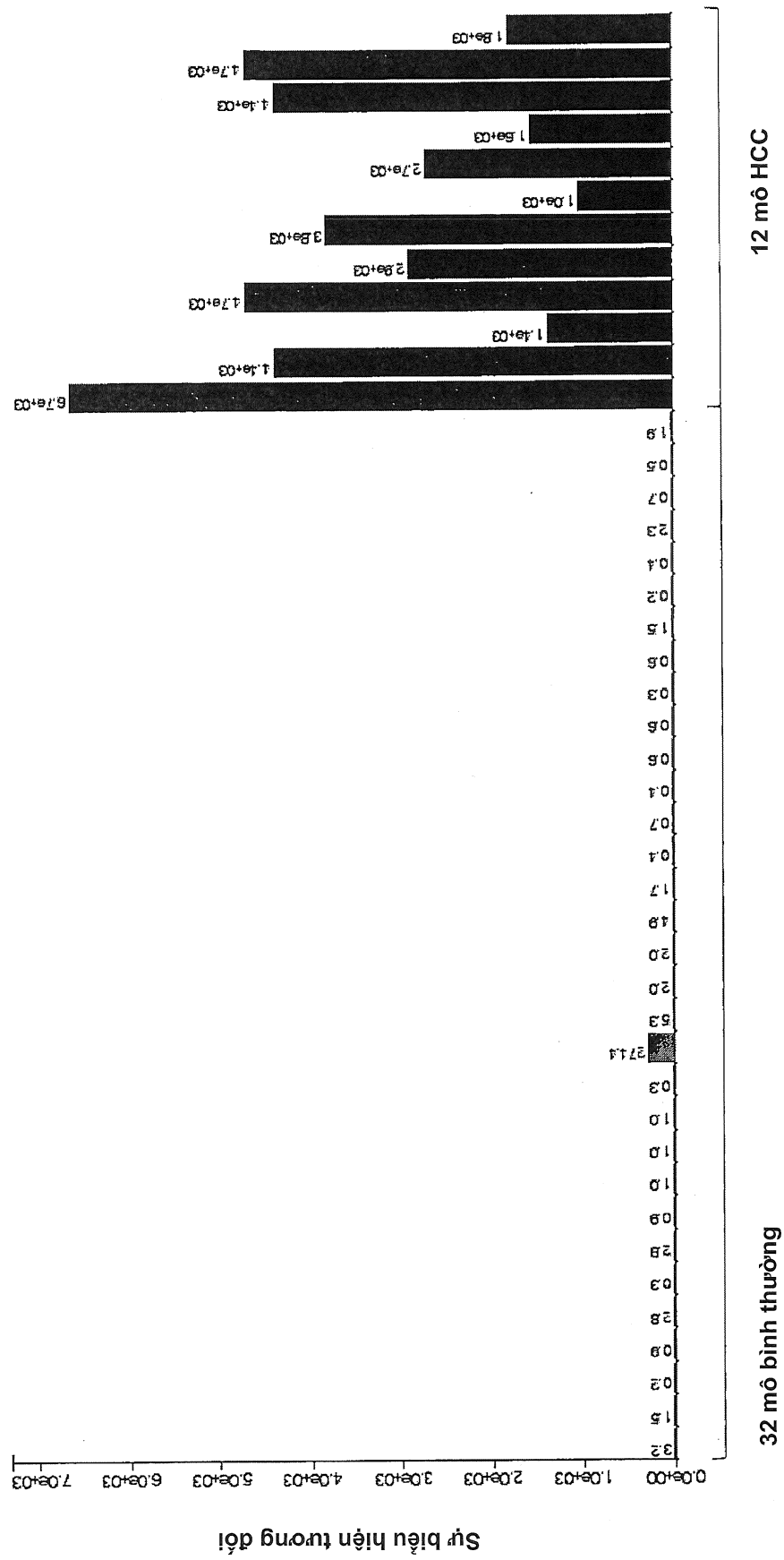
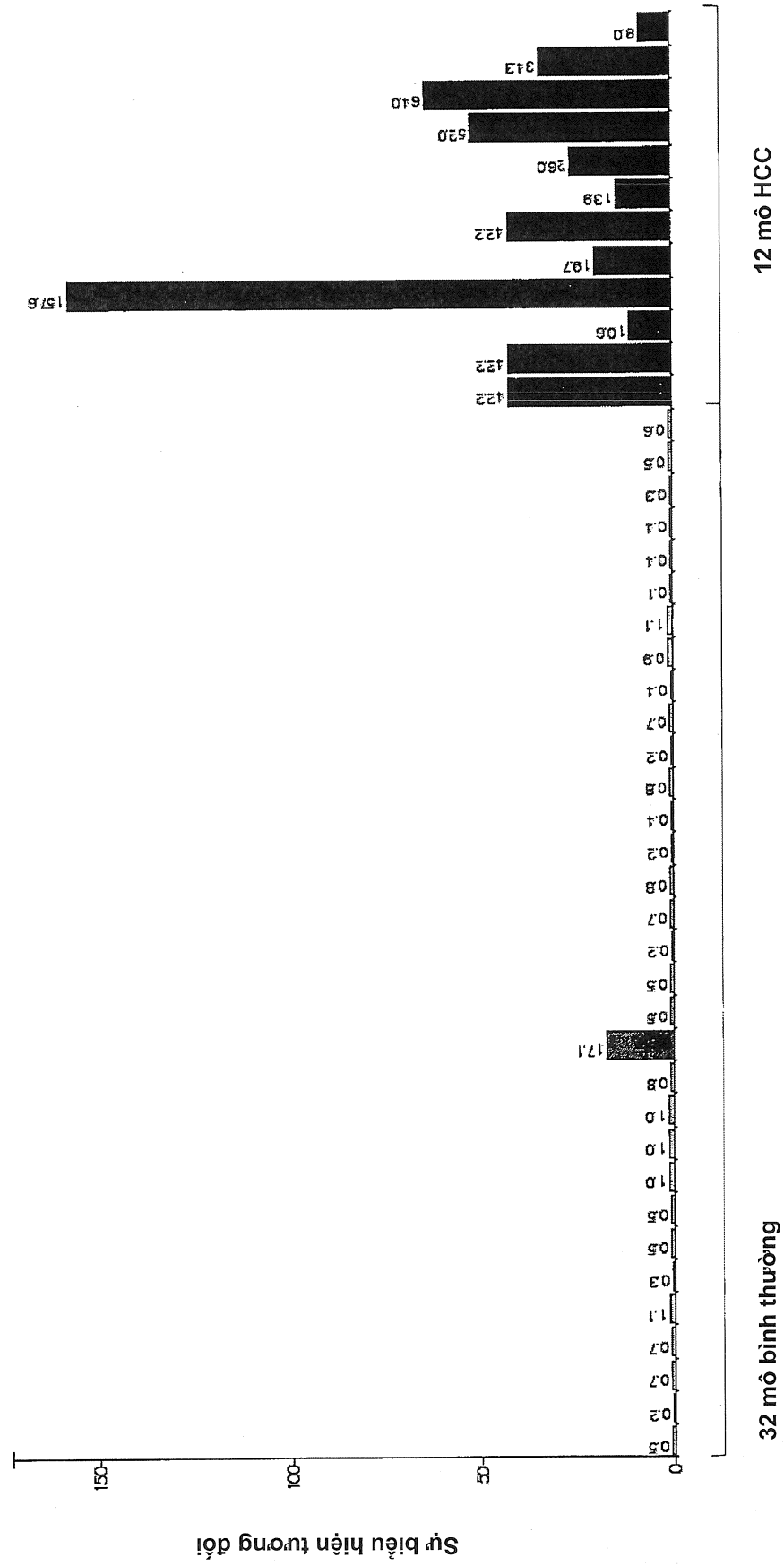


Fig.2E



Sự biến hiện tương đối



Fig.3

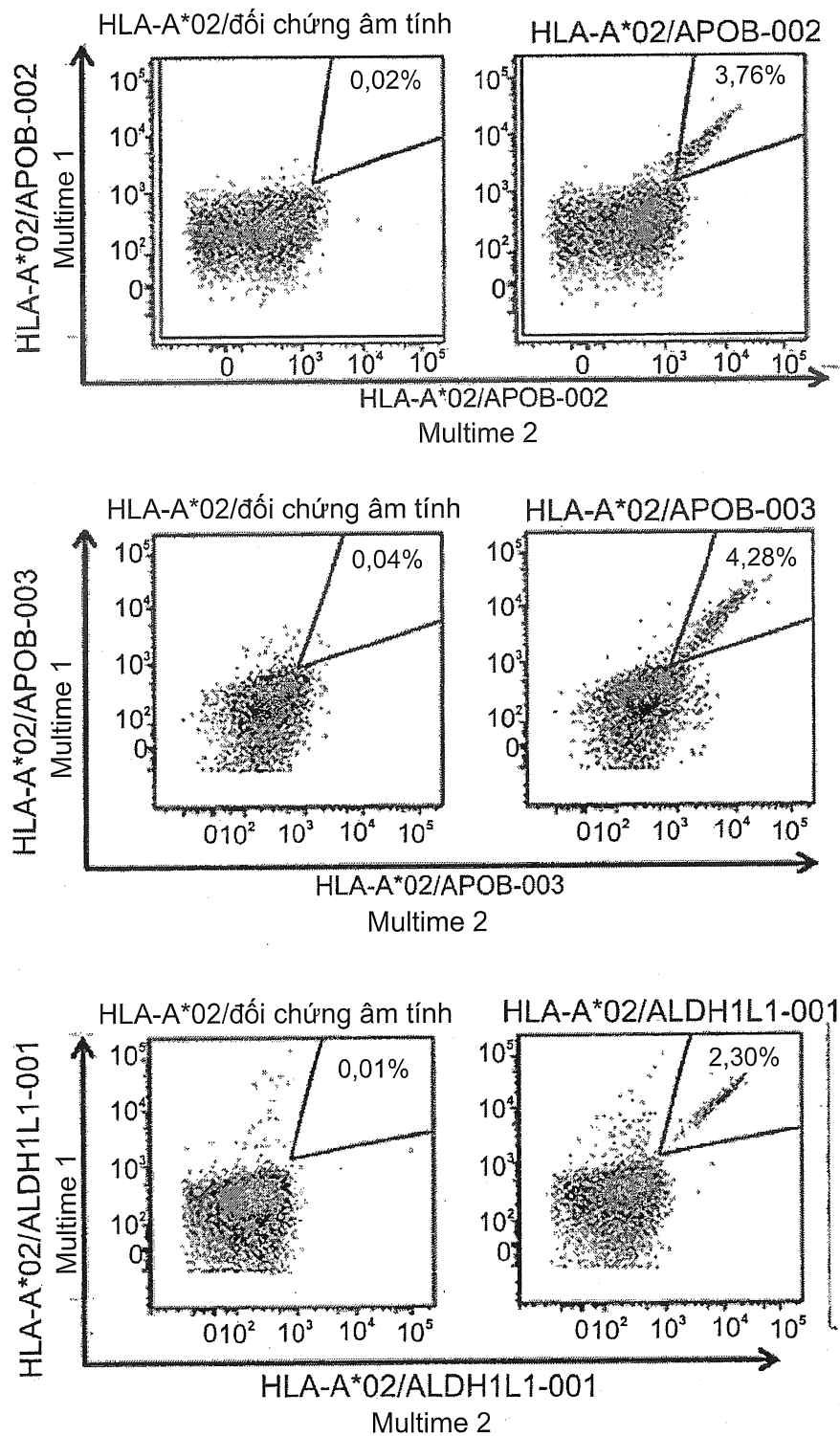
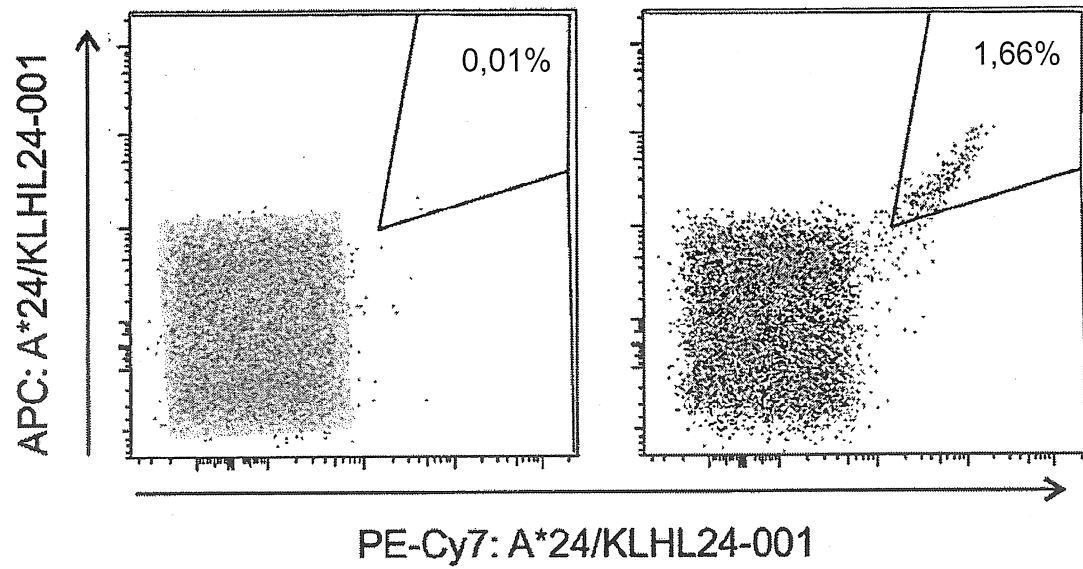
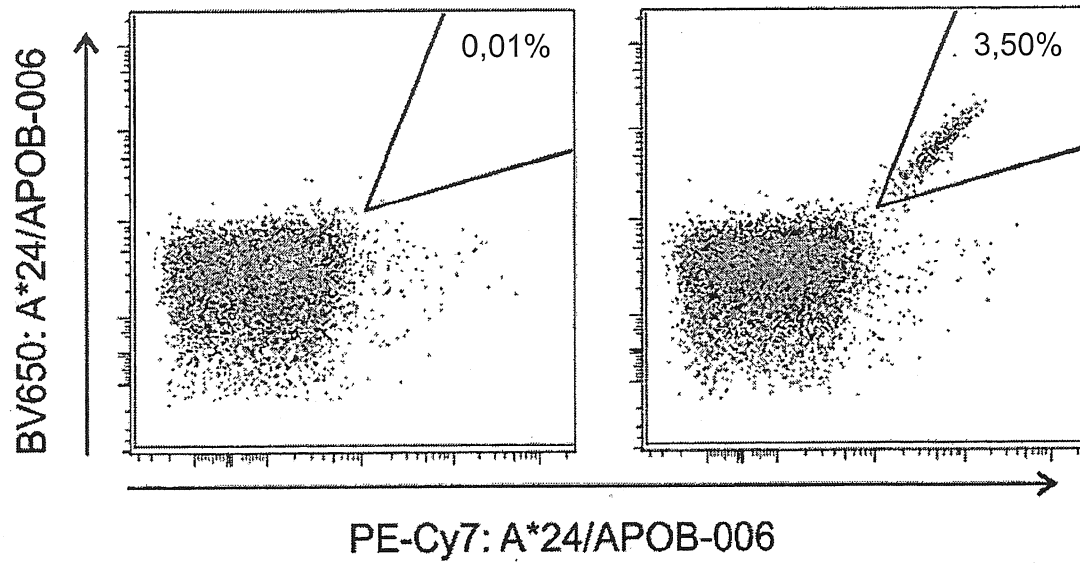


Fig.4

A



B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics biotechnologies GmbH
 <20> Peptit có khả năng gắn kết với phân tử phức hợp tương thích mô chính, kháng thể hòa tan hoặc liên kết màng, dược phẩm chứa chúng và phương pháp tạo ra tế bào hoạt hóa lympho T
 <130> I32728WO
 <150> GB1423016.3
 <151> 2014-12-23
 <150> US62/096,165
 <151> 2014-12-23
 <150> GB1501017.6
 <151> 2015-01-21
 <160> 348
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 1
 Val Met Ala Pro Phe Thr Met Thr Ile
 1 5
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 2
 Lys Leu Gln Ala Gly Thr Val Phe Val
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 3
 Ile Leu Asp Asp Asn Met Gln Lys Leu
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 4

Lys Leu Gln Asp Phe Ser Asp Gln Leu
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 5

Ala Leu Val Glu Gln Gly Phe Thr Val
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 6

Lys Leu Ser Pro Thr Val Val Gly Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 7

Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Phe Val
1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 8

Lys Leu Leu Glu Glu Ala Thr Ile Ser Val
1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 9

Ala Leu Ala Asn Gln Lys Leu Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 10

Ser Leu Leu Glu Glu Phe Asp Phe His Val
 1 5 10

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 11

Ser Leu Ser Gln Glu Leu Val Gly Val
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 12

Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu
 1 5

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 13

Gly Leu Ile Asp Thr Glu Thr Ala Met Lys Ala Val
 1 5 10

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 14

Ala Leu Ala Asp Leu Thr Gly Thr Val Val
 1 5 10

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 15

Leu Leu Tyr Gly His Thr Val Thr Val
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 16

Ser Leu Leu Gly Gly Asn Ile Arg Leu
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 17

Arg Val Ala Ser Pro Thr Ser Gly Val
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 18

Ala Leu Tyr Gly Lys Thr Glu Val Val
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 19

Phe Leu Glu Glu Thr Lys Ala Thr Val
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 20

Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln Gln Val
 1 5

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 21

Gln Leu Ile Glu Val Ser Ser Pro Ile Thr Leu

1 5 10
 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 22
 Arg Ile Ala Gly Ile Arg Gly Ile Gln Gly Val
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 23
 Arg Leu Tyr Asp Pro Ala Ser Gly Thr Ile Ser Leu
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 24
 Ser Leu Ala Glu Glu Lys Leu Gln Ala Ser Val
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 25
 Ser Leu Asp Gly Lys Ala Ala Leu Thr Glu Leu
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 26
 Ser Leu Leu His Thr Ile Tyr Glu Val
 1 5
 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 27

Thr Leu Pro Asp Phe Arg Leu Pro Glu Ile
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 28

Thr Leu Gln Asp His Leu Asn Ser Leu
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 29

Tyr Ile Gln Asp Glu Ile Asn Thr Ile
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 30

Tyr Leu Gly Glu Gly Pro Arg Met Val
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 31

Tyr Gln Met Asp Ile Gln Gln Glu Leu
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 32

Ala Leu Asn Ala Val Arg Leu Leu Val
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 33

Leu Leu His Gly His Ile Val Glu Leu
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 34

Ser Leu Ala Glu Gly Thr Ala Thr Val
1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 35

Ser Leu Gln Glu Ser Ile Leu Ala Gln Val
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 36

Ile Leu Asn Val Asp Gly Leu Ile Gly Val
1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 37

Leu Leu Leu Pro Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro
1 5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 38

Ala Leu Ala Asp Val Val His Glu Ala
1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 39

Ala Leu Asp Pro Lys Ala Asn Phe Ser Thr
 1 5 10

<210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 40

Ala Leu Leu Ala Glu Gly Ile Thr Trp Val
 1 5 10

<210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 41

Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu
 1 5 10

<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 42

Ala Leu Leu Gly Gly Asn Val Arg Met Met Leu
 1 5 10

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

<400> 43

Ala Leu Leu Gly Val Trp Thr Ser Val
 1 5

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

<400> 44

Ala Leu Gln Asp Ala Ile Arg Gln Leu
 1 5

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

<400> 45

Ala Leu Gln Asp Gln Leu Val Leu Val
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 46

Ala Met Ala Glu Met Lys Val Val Leu
 1 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 47

Phe Leu Asp Thr Pro Ile Ala Lys Val
 1 5

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 48

Phe Leu Leu Glu Gln Pro Glu Ile Gln Val
 1 5 10

<210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 49

Phe Leu Tyr Pro Glu Lys Asp Glu Pro Thr
 1 5 10

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 50

Phe Thr Ile Pro Lys Leu Tyr Gln Leu

1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 51

Gly Leu Ala Glu Glu Leu Val Arg Ala
 1 5

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 52

Gly Leu Phe Asn Ala Glu Leu Leu Glu Ala
 1 5 10

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 53

Gly Leu Ile His Leu Glu Gly Asp Thr Val
 1 5 10

<210> 54
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 54

Gly Leu Leu Asp Pro Asn Val Lys Ser Ile Phe Val
 1 5 10

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 55

Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu
 1 5

<210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 56

Gly Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Val
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 57

His Leu Thr Glu Ala Ile Gln Tyr Val
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 58

Ile Leu Ala Asp Leu Asn Leu Ser Val
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 59

Ile Leu Ala Asp Thr Phe Ile Gly Val
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 60

Ile Leu Ser Pro Leu Ser Val Ala Leu
1 5

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 61

Lys Ile Ala Asp Phe Glu Leu Pro Thr Ile
1 5 10

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 62

Lys Ile Ala Gly Thr Asn Ala Glu Val
1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 63

Lys Ile Asp Glu Lys Asn Phe Val Val
1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 64

Lys Ile Leu Glu Glu Thr Leu Tyr Val
1 5

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 65

Lys Leu Phe Ser Gly Asp Glu Leu Leu Glu Val
1 5 10

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 66

Lys Leu His Glu Glu Ile Asp Arg Val
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 67

Lys Leu Lys Glu Thr Ile Gln Lys Leu
1 5

<210> 68

<211> 10

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 68

Lys Leu Leu Ala Ala Thr Val Leu Leu Leu
 1 5 10

<210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 69

Lys Leu Leu Asp Glu Val Thr Tyr Leu Glu Ala
 1 5 10

<210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 70

Lys Leu Leu Asp Leu Glu Thr Glu Arg Ile Leu Leu
 1 5 10

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 71

Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val
 1 5

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 72

Lys Leu Ser Glu Ala Val Thr Ser Val
 1 5

<210> 73
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 73

Lys Leu Thr Leu Val Ile Ile Ser Val
 1 5

<210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 74

Lys Leu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Val
 1 5

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 75

Lys Gln Met Glu Pro Leu His Ala Val
 1 5

<210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 76

Leu Leu Ala Asp Ile Gly Gly Asp Pro Phe Ala Ala
 1 5 10

<210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 77

Leu Leu His Glu Glu Asn Phe Ser Val
 1 5

<210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 78

Leu Leu Ile Asp Asp Glu Tyr Lys Val
 1 5

<210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 79

Leu Leu Leu Ser Thr Gly Tyr Glu Ala
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 80

Leu Leu Tyr Glu Gly Lys Leu Thr Leu
1 5

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 81

Asn Leu Ala Ser Phe Ile Glu Gln Val Ala Val
1 5 10

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 82

Asn Val Phe Asp Gly Leu Val Arg Val
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 83

Gln Leu His Asp Phe Val Met Ser Leu
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 84

Gln Leu Thr Pro Val Leu Val Ser Val
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 85

Arg Ile Leu Pro Lys Val Leu Glu Val
1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 86

Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Val
1 5

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 87

Arg Leu Phe Glu Glu Asn Asp Val Asn Leu
1 5 10

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 88

Arg Leu Ile Asp Arg Ile Lys Thr Val
1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 89

Arg Leu Ile Glu Glu Ile Lys Asn Val
1 5

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 90

Arg Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val
1 5 10

<210> 91

<211> 10

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 91

Arg Leu Pro Asp Ile Pro Leu Arg Gln Val
 1 5 10

<210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 92

Arg Leu Pro Pro Asp Thr Leu Leu Gln Gln Val
 1 5 10

<210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 93

Arg Leu Tyr Thr Met Asp Gly Ile Thr Val
 1 5 10

<210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 94

Arg Met Ser Asp Val Val Lys Gly Val
 1 5

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 95

Ser Ile Cys Asn Gly Val Pro Met Val
 1 5

<210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 96

Ser Leu Leu Glu Glu Pro Asn Val Ile Arg Val
 1 5 10

<210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 97

Ser Leu Leu Pro Gln Leu Ile Glu Val
 1 5

<210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 98

Ser Leu Leu Ser Pro Glu His Leu Gln Tyr Leu
 1 5 10

<210> 99
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 99

Ser Leu Ser Ala Phe Leu Pro Ser Leu
 1 5

<210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 100

Ser Leu Val Gly Asp Ile Gly Asn Val Asn Met
 1 5 10

<210> 101
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 101

Ser Leu Trp Glu Gly Gly Val Arg Gly Val
 1 5 10

<210> 102
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 102

Ser Leu Trp Ser Val Ala Arg Gly Val

1 5

<210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 103

Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala
 1 5

<210> 104
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 104

Ser Val Trp Phe Gly Pro Lys Glu Val
 1 5

<210> 105
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 105

Ser Val Tyr Asp Gly Lys Leu Leu Ile
 1 5

<210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 106

Thr Leu Ala Ala Ile Ile His Gly Ala
 1 5

<210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 107

Thr Leu Gly Gln Phe Tyr Gln Glu Val
 1 5

<210> 108
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 108

Thr Leu Leu Lys Lys Ile Ser Glu Ala
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 109

Thr Leu Tyr Ala Leu Ser His Ala Val
1 5

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 110

Thr Val Gly Gly Ser Glu Ile Leu Phe Glu Val
1 5 10

<210> 111
<211> 13
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 111

Thr Val Met Asp Ile Asp Thr Ser Gly Thr Phe Asn Val
1 5 10

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 112

Val Leu Gly Glu Val Lys Val Gly Val
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 113

Val Leu Met Asp Lys Leu Val Glu Leu
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 114

Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Val
1 5

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 115

Val Val Leu Asp Asp Lys Asp Tyr Phe Leu
1 5 10

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 116

Trp Val Ile Pro Ala Ile Ser Ala Val
1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 117

Tyr Ala Phe Pro Lys Ser Ile Thr Val
1 5

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 118

Tyr Leu Asp Asp Glu Lys Asn Trp Gly Leu
1 5 10

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 119

Tyr Leu Asp Lys Asn Leu Thr Val Ser Val
1 5 10

<210> 120

<211> 9

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 120

Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala
 1 5

<210> 121
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 121

Tyr Leu Ile Thr Gly Asn Leu Glu Lys Leu
 1 5 10

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

<400> 122

Tyr Leu Ser Gln Ala Ala Asp Gly Ala Lys Val Leu
 1 5 10

<210> 123
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 123

Tyr Leu Trp Asp Leu Asp His Gly Phe Ala Gly Val
 1 5 10

<210> 124
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 124

Leu Leu Ile Asp Val Val Thr Tyr Leu
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 125

Ala Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Val Val
 1 5

<210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 126

Thr Leu Leu Asp Ser Pro Ile Lys Val
 1 5

<210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 127

Val Leu Ile Gly Ser Asn His Ser Leu
 1 5

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 128

Gly Leu Ala Phe Ser Leu Asn Gly Val
 1 5

<210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 129

Ser Gln Ala Asp Val Ile Pro Ala Val
 1 5

<210> 130
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 130

Ala Leu Asp Ala Gly Ala Val Tyr Thr Leu
 1 5 10

<210> 131
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 131

Ala Leu Asp Ser Gly Ala Phe Gln Ser Val

1 5 10

<210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 132

Ala Leu His Glu Glu Val Val Gly Val
 1 5

<210> 133
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 133

Ala Leu Leu Glu Met Asp Ala Arg Leu
 1 5

<210> 134
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 134

Ala Leu Leu Glu Thr Asn Pro Tyr Leu Leu
 1 5 10

<210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 135

Ala Leu Leu Gly Lys Ile Glu Lys Val
 1 5

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 136

Ala Leu Leu Asn Gln His Tyr Gln Val
 1 5

<210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 137

Ala Leu Pro Thr Val Leu Val Gly Val
1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 138

Ala Leu Ser Gln Val Thr Leu Leu Leu
1 5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 139

Ala Leu Ser Ser Lys Pro Ala Glu Val
1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 140

Ala Leu Thr Ser Ile Ser Ala Gly Val
1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 141

Ala Met Gly Glu Lys Ser Phe Ser Val
1 5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 142

Ala Val Ile Gly Gly Leu Ile Tyr Val
1 5

<210> 143

<211> 12

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 143

Phe Ile Leu Pro Asp Ser Leu Pro Leu Asp Thr Leu
1 5 10

<210> 144

<211> 8

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 144

Phe Ile Gln Leu Ile Thr Gly Val
1 5

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 145

Phe Leu Ile Ala Glu Tyr Phe Glu His Val
1 5 10

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 146

Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val
1 5 10

<210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 147

Gly Leu Ala Pro Gly Gly Leu Ala Val Val
1 5 10

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 148

Gly Leu Phe Ala Pro Leu Val Phe Leu
1 5

<210> 149

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

<400> 149

Gly Leu Leu Ser Gly Leu Asp Ile Met Glu Val
 1 5 10

<210> 150
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 150

Gly Leu Ser Asn Leu Gly Ile Lys Ser Ile
 1 5 10

<210> 151
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 151

His Leu Ala Lys Val Thr Ala Glu Val
 1 5

<210> 152
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 152

Lys Leu Asp Asn Asn Leu Asp Ser Val
 1 5

<210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 153

Lys Leu Ile Glu Val Asn Glu Glu Leu
 1 5

<210> 154
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 154

Lys Leu Thr Asp His Leu Lys Tyr Val
 1 5

<210> 155
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 155

Leu Leu Glu Pro Tyr Lys Pro Pro Ser Ala Gln
 1 5 10

<210> 156
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 156

Leu Leu Phe Pro His Pro Val Asn Gln Val
 1 5 10

<210> 157
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 157

Gln Leu Leu Pro Asn Leu Arg Ala Val
 1 5

<210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 158

Arg Ile Ile Ser Gly Leu Val Lys Val
 1 5

<210> 159
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 159

Arg Leu Phe Pro Asp Gly Ile Val Thr Val
 1 5 10

<210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 160

Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu
1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 161

Arg Leu Leu Asp Glu Gln Phe Ala Val
1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 162

Arg Leu Met Ser Ala Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 163

Arg Leu Thr Glu Ser Val Leu Tyr Leu
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 164

Arg Met Leu Ile Lys Leu Leu Glu Val
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 165

Arg Val Ile Glu His Val Glu Gln Val
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 166

Ser Ile Leu Asp Ile Val Thr Lys Val
1 5

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 167

Ser Leu Ala Glu Ser Ser Phe Asp Val
1 5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 168

Ser Leu Ala Val Leu Val Pro Ile Val
1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 169

Ser Leu Phe Glu Trp Phe His Pro Leu
1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 170

Ser Leu His Asn Gly Val Ile Gln Leu
1 5

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 171

Ser Leu Ile Pro Ala Val Leu Thr Val
1 5

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 172

Ser Leu Leu Asn Phe Leu Gln His Leu
1 5

<210> 173

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 173

Ser Leu Thr Ser Glu Ile His Phe Leu
1 5

<210> 174

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 174

Thr Leu Ala Glu Leu Gly Ala Val Gln Val
1 5 10

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 175

Thr Leu Phe Glu His Leu Pro His Ile
1 5

<210> 176

<211> 8

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 176

Thr Leu Gly Gln Ile Trp Asp Val
5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 177

Val Leu Asp Glu Pro Tyr Glu Lys Val
1 5

<210> 178

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

<400> 178

Tyr Ile Phe Thr Thr Pro Lys Ser Val
 1 5

<210> 179
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 179

Tyr Ile His Asn Ile Leu Tyr Glu Val
 1 5

<210> 180
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 180

Tyr Leu Gly Pro His Ile Ala Ser Val Thr Leu
 1 5 10

<210> 181
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 181

Tyr Leu Leu Glu Lys Phe Val Ala Val
 1 5

<210> 182
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 182

Tyr Leu Leu His Phe Pro Met Ala Leu
 1 5

<210> 183
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 183

Tyr Leu Tyr Asn Asn Glu Glu Gln Val Gly Leu
 1 5 10

<210> 184
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 184

Val Val Leu Asp Gly Gly Gln Ile Val Thr Val
 1 5 10

<210> 185
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 185

Ala Leu Phe Pro Ala Leu Arg Pro Gly Gly Phe Gln Ala
 1 5 10

<210> 186
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 186

Val Leu Leu Ala Gln Ile Ile Gln Val
 1 5

<210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 187

Ser Tyr Pro Thr Phe Phe Pro Arg Phe
 1 5

<210> 188
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 188

Arg Tyr Ser Ala Gly Trp Asp Ala Lys Phe
 1 5 10

<210> 189
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 189

Ala Phe Ser Pro Asp Ser His Tyr Leu Leu Phe
1 5 10

<210> 190
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 190

Arg Tyr Asn Glu Lys Cys Phe Lys Leu
1 5

<210> 191
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 191

Lys Tyr Pro Asp Ile Ile Ser Arg Ile
1 5

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 192

Ser Tyr Ile Thr Lys Pro Glu Lys Trp
1 5

<210> 193
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 193

Ile Tyr Pro Gly Ala Phe Val Asp Leu
1 5

<210> 194
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 194

Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu
1 5

<210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 195

Arg Tyr Ala Pro Pro Pro Ser Phe Ser Glu Phe
1 5 10

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 196

Ala Tyr Leu Lys Trp Ile Ser Gln Ile
1 5

<210> 197

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 197

Arg Trp Pro Lys Lys Ser Ala Glu Phe
1 5

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 198

Leu Tyr Trp Ser His Pro Arg Lys Phe
1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 199

Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe
1 5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 200

Ala Tyr Leu Leu Gln Pro Ser Gln Phe
1 5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 201

Ala Tyr Val Asn Thr Phe His Asn Ile
1 5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 202

Ala Tyr Gly Thr Tyr Arg Ser Asn Phe
1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 203

Tyr Tyr Gly Ile Leu Gln Glu Lys Ile
1 5

<210> 204

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 204

Lys Tyr Arg Leu Thr Tyr Ala Tyr Phe
1 5

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 205

Val Tyr Gly Leu Gln Arg Asn Leu Leu
1 5

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 206

Lys Trp Pro Glu Thr Pro Leu Leu Leu
1 5

<210> 207

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

<400> 207

Ile Tyr Leu Glu Arg Phe Pro Ile Phe
 1 5

<210> 208
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 208

Ser Tyr Asn Pro Ala Glu Asn Ala Val Leu Leu
 1 5 10

<210> 209
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 209

Val Phe His Pro Arg Gln Glu Leu Ile
 1 5

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

<400> 210

Ala Tyr Pro Ala Ile Arg Tyr Leu Leu
 1 5

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

<400> 211

Ile Tyr Ile Pro Ser Tyr Phe Asp Phe
 1 5

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

<400> 212

Val Tyr Gly Asp Val Ile Ser Asn Ile
 1 5

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

<400> 213

Tyr Tyr Asn Lys Val Ser Thr Val Phe
 1 5

<210> 214
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 214

Ile Tyr Val Thr Ser Ile Glu Gln Ile
 1 5

<210> 215
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 215

Ile Tyr Thr Gly Asn Ile Ser Ser Phe
 1 5

<210> 216
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 216

Ile Tyr Ala Asp Val Gly Glu Glu Phe
 1 5

<210> 217
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 217

Asp Tyr Ile Pro Tyr Val Phe Lys Leu
 1 5

<210> 218
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 218

Val Tyr Gln Gly Ala Ile Arg Gln Ile
1 5

<210> 219
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 219

Gly Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 220

Ser Leu Leu Glu Lys Glu Leu Glu Ser Val
1 5 10

<210> 221
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 221

Ala Leu Cys Glu Glu Asn Met Arg Gly Val
1 5 10

<210> 222
<211> 8
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 222

Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val
1 5

<210> 223
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 223

Phe Leu Phe Asn Thr Glu Asn Lys Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 224

Ala Leu Ala Ser Val Ile Lys Glu Leu
1 5

<210> 225

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 225

Lys Met Asp Pro Val Ala Tyr Arg Val
1 5

<210> 226

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 226

Ala Val Leu Gly Pro Leu Gly Leu Gln Glu Val
1 5 10

<210> 227

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 227

Ala Leu Leu Lys Val Asn Gln Glu Leu
1 5

<210> 228

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 228

Tyr Leu Ile Thr Ser Val Glu Leu Leu
1 5

<210> 229

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 229

Lys Met Phe Glu Ser Phe Ile Glu Ser Val
1 5 10

<210> 230

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 230

Val Leu Thr Glu Phe Thr Arg Glu Val
1 5

<210> 231

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 231

Arg Leu Phe Asn Asp Pro Val Ala Met Val
1 5 10

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 232

Lys Leu Ala Glu Ile Val Lys Gln Val
1 5

<210> 233

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 233

Ala Leu Leu Gly Lys Leu Asp Ala Ile
1 5

<210> 234

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 234

Tyr Leu Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Val
1 5

<210> 235

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 235

Lys Leu Phe Glu Glu Ile Arg Glu Ile
1 5

<210> 236

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

<400> 236

Ala Leu Ala Asp Lys Glu Leu Leu Pro Ser Val
 1 5 10

<210> 237
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 237

Ala Leu Arg Gly Glu Ile Glu Thr Val
 1 5

<210> 238
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 238

Ala Met Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gly Val
 1 5 10

<210> 239
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 239

Phe Leu Leu Gly Phe Ile Pro Ala Lys Ala
 1 5 10

<210> 240
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 240

Phe Leu Trp Glu Arg Pro Thr Leu Leu Val
 1 5 10

<210> 241
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 241

Phe Val Leu Pro Leu Leu Gly Leu His Glu Ala
 1 5 10

<210> 242
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 242

Gly Leu Phe Ala Pro Val His Lys Val
 1 5

<210> 243
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 243

Gly Leu Leu Asp Asn Pro Glu Leu Arg Val
 1 5 10

<210> 244
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 244

Lys Ile Ala Glu Leu Leu Glu Asn Val
 1 5

<210> 245
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 245

Lys Leu Gly Ala Val Phe Asn Gln Val
 1 5

<210> 246
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 246

Lys Leu Ile Ser Ser Tyr Tyr Asn Val
 1 5

<210> 247
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 247

Lys Leu Leu Asp Thr Met Val Asp Thr Phe Leu
1 5 10

<210> 248
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 248

Lys Leu Asn Asp Leu Ile Gln Arg Leu
1 5

<210> 249
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 249

Leu Leu Leu Gly Glu Arg Val Ala Leu
1 5

<210> 250
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 250

Asn Leu Ala Glu Val Val Glu Arg Val
1 5

<210> 251
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 251

Arg Leu Phe Ala Asp Ile Leu Asn Asp Val
1 5 10

<210> 252
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 252

Arg Thr Ile Glu Tyr Leu Glu Glu Val
1 5

<210> 253
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 253

Arg Val Pro Pro Pro Pro Gln Ser Val
1 5

<210> 254

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 254

Arg Val Gln Glu Ala Ile Ala Glu Val
1 5

<210> 255

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 255

Ser Leu Phe Gly Gln Asp Val Lys Ala Val
1 5 10

<210> 256

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 256

Ser Leu Phe Gln Gly Val Glu Phe His Tyr Val
1 5 10

<210> 257

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 257

Ser Leu Leu Glu Lys Ala Gly Pro Glu Leu
1 5 10

<210> 258

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 258

Ser Leu Met Gly Pro Val Val His Glu Val
1 5 10

<210> 259

<211> 10

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 259

Thr Leu Ile Thr Asp Gly Met Arg Ser Val
 1 5 10

<210> 260
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 260

Thr Leu Met Asp Met Arg Leu Ser Gln Val
 1 5 10

<210> 261
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 261

Val Leu Phe Gln Glu Ala Leu Trp His Val
 1 5 10

<210> 262
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 262

Val Leu Pro Asn Phe Leu Pro Tyr Asn Val
 1 5 10

<210> 263
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 263

Val Leu Tyr Pro Ser Leu Lys Glu Ile
 1 5

<210> 264
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 264

Val Met Gln Asp Pro Glu Phe Leu Gln Ser Val
 1 5 10

<210> 265
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 265

Trp Leu Ile Glu Asp Gly Lys Val Val Thr Val
 1 5 10

<210> 266
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 266

Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu
 1 5 10

<210> 267
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 267

Ala Leu Asn Glu Asn Ile Asn Gln Val
 1 5

<210> 268
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 268

Lys Leu Tyr Gln Glu Val Glu Ile Ala Ser Val
 1 5 10

<210> 269
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 269

Tyr Leu Met Glu Gly Ser Tyr Asn Lys Val
 1 5 10

<210> 270
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 270

Ser Val Leu Asp Gln Lys Ile Leu Leu

1 5

<210> 271
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 271

Leu Leu Leu Asp Lys Leu Ile Leu Leu
 1 5

<210> 272
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 272

Gln Gln Leu Asp Ser Lys Phe Leu Glu Gln Val
 1 5 10

<210> 273
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 273

Ala Ile Leu Glu Thr Ala Pro Lys Glu Val
 1 5 10

<210> 274
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 274

Ala Leu Ala Glu Ala Leu Lys Glu Val
 1 5

<210> 275
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 275

Ala Leu Ile Glu Gly Ala Gly Ile Leu Leu
 1 5 10

<210> 276
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 276

Ala Leu Leu Glu Ala Asp Val Asn Ile Lys Leu
 1 5 10

<210> 277
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 277

Ala Leu Leu Glu Glu Asn Ser Thr Pro Gln Leu
 1 5 10

<210> 278
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 278

Ala Leu Thr Ser Val Val Val Thr Leu
 1 5

<210> 279
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 279

Ala Leu Trp Thr Gly Met His Thr Ile
 1 5

<210> 280
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 280

Ala Thr Leu Asn Ile Ile His Ser Val
 1 5

<210> 281
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 281

Gly Leu Leu Ala Gly Asp Arg Leu Val Glu Val
 1 5 10

<210> 282
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 282

Gly Gln Phe Pro Ser Tyr Leu Glu Thr Val
1 5 10

<210> 283

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 283

Ile Leu Ser Gly Ile Gly Val Ser Gln Val
1 5 10

<210> 284

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 284

Lys Leu Asp Ala Phe Val Glu Gly Val
1 5

<210> 285

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 285

Lys Leu Leu Asp Leu Ser Asp Ser Thr Ser Val
1 5 10

<210> 286

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 286

Lys Val Leu Asp Lys Val Phe Arg Ala
1 5

<210> 287

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 287

Leu Ile Gly Glu Phe Leu Glu Lys Val
1 5

<210> 288

<211> 9

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 288

Leu Leu Asp Asp Ser Leu Val Ser Ile
 1 5

<210> 289
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 289

Leu Leu Leu Glu Glu Gly Gly Leu Val Gln Val
 1 5 10

<210> 290
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 290

Asn Leu Ile Asp Leu Asp Asp Leu Tyr Val
 1 5 10

<210> 291
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 291

Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu
 1 5

<210> 292
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 292

Arg Ile Pro Ala Tyr Phe Val Thr Val
 1 5

<210> 293
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 293

Phe Leu Ala Ser Glu Ser Leu Ile Lys Gln Ile
 1 5 10

<210> 294
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 294

Arg Leu Ile Asp Leu His Thr Asn Val
 1 5

<210> 295
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 295

Ser Leu Phe Ser Ser Pro Pro Glu Ile
 1 5

<210> 296
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 296

Ser Leu Leu Ser Gly Arg Ile Ser Thr Leu
 1 5 10

<210> 297
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 297

Thr Leu Phe Tyr Ser Leu Arg Glu Val
 1 5

<210> 298
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 298

Thr Met Ala Lys Glu Ser Ser Ile Ile Gly Val
 1 5 10

<210> 299
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 299

Ala Leu Leu Arg Val Thr Pro Phe Ile
1 5

<210> 300
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 300

Thr Leu Ala Gln Gln Pro Thr Ala Val
1 5

<210> 301
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 301

Val Leu Ala Asp Phe Gly Ala Arg Val
1 5

<210> 302
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 302

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 303
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 303

Gly Val Tyr Asp Gly Glu Glu His Ser Val
1 5 10

<210> 304
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 304

Ser Leu Ile Asp Gln Phe Phe Gly Val
1 5

<210> 305
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 305

Gly Val Leu Glu Asn Ile Phe Gly Val
1 5

<210> 306

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 306

Lys Leu Val Glu Phe Asp Phe Leu Gly Ala
1 5 10

<210> 307

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 307

Ala Val Val Glu Phe Leu Thr Ser Val
1 5

<210> 308

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 308

Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val
1 5

<210> 309

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 309

Gly Leu Ile Glu Ile Ile Ser Asn Ala
1 5

<210> 310

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 310

Ser Leu Trp Gly Gly Asp Val Val Leu
1 5

<210> 311

<211> 9

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 311

Phe Leu Ile Pro Ile Tyr His Gln Val
 1 5

<210> 312
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 312

Arg Leu Gly Ile Lys Pro Glu Ser Val
 1 5

<210> 313
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 313

Leu Thr Ala Pro Pro Glu Ala Leu Leu Met Val
 1 5 10

<210> 314
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 314

Tyr Leu Ala Pro Phe Leu Arg Asn Val
 1 5

<210> 315
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 315

Lys Val Leu Asp Gly Ser Pro Ile Glu Val
 1 5 10

<210> 316
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 316

Leu Leu Arg Glu Lys Val Glu Phe Leu
 1 5

<210> 317
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 317

Lys Leu Pro Glu Lys Trp Glu Ser Val
 1 5

<210> 318
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 318

Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys Ile
 1 5

<210> 319
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 319

Lys Leu Phe Asn Glu Phe Ile Gln Leu
 1 5

<210> 320
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 320

Gly Leu Ala Asp Asn Thr Val Ile Ala Lys Val
 1 5 10

<210> 321
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 321

Gly Val Ile Ala Glu Ile Leu Arg Gly Val
 1 5 10

<210> 322
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 322

Ile Leu Tyr Asp Ile Pro Asp Ile Arg Leu

1 5 10

<210> 323
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 323

Lys Ile Ile Asp Glu Asp Gly Leu Leu Asn Leu
 1 5 10

<210> 324
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 324

Arg Leu Phe Glu Thr Lys Ile Thr Gln Val
 1 5 10

<210> 325
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 325

Arg Leu Ser Glu Ala Ile Val Thr Val
 1 5

<210> 326
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 326

Ala Leu Ser Asp Gly Val His Lys Ile
 1 5

<210> 327
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 327

Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val
 1 5

<210> 328
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 328

Arg Leu Glu Glu Asp Asp Gly Asp Val Ala Met
1 5 10

<210> 329
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 329

Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu
1 5

<210> 330
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 330

Ser Met Ser Ala Asp Val Pro Leu Val
1 5

<210> 331
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 331

Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu
1 5 10

<210> 332
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 332

Ala Met Leu Ala Val Leu His Thr Val
1 5

<210> 333
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 333

Gly Leu Ala Glu Asp Ile Asp Lys Gly Glu Val
1 5 10

<210> 334
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 334

Ser Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val
1 5 10

<210> 335

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 335

Ser Leu Leu Pro Val Asp Ile Arg Gln Tyr Leu
1 5 10

<210> 336

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 336

Tyr Leu Pro Thr Phe Phe Leu Thr Val
1 5

<210> 337

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 337

Thr Leu Leu Ala Ala Glu Phe Leu Lys Gln Val
1 5 10

<210> 338

<211> 12

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 338

Lys Leu Phe Asp Ser Asp Pro Ile Thr Val Thr Val
1 5 10

<210> 339

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 339

Arg Leu Ile Ser Lys Phe Asp Thr Val
1 5

<210> 340

<211> 9

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 340

Lys Val Phe Asp Glu Val Ile Glu Val
 1 5

<210> 341
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 341

Tyr Leu Ala Ile Gly Ile His Glu Leu
 1 5

<210> 342
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 342

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val
 1 5

<210> 343
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 343

Leu Leu Leu Pro Asp Tyr Tyr Leu Val
 1 5

<210> 344
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 344

Val Tyr Ile Ser Ser Leu Ala Leu Leu
 1 5

<210> 345
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 345

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile
 1 5

<210> 346
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 346

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe
 1 5 10

<210> 347
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 347

Ala Leu Asn Pro Ala Asp Ile Thr Val
 1 5

<210> 348
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 348

Ala Tyr Lys Pro Gly Ala Leu Thr Phe
 1 5

1