



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0034981

(51)⁸ C07K 7/06; C12N 5/0783; A61K 38/17; (13) B
A61K 39/00

-
- (21) 1-2018-04405 (22) 02/03/2017
(86) PCT/EP2017/054908 02/03/2017 (87) WO 2017/153247 A1 14/09/2017
(30) 62/305,222 08/03/2016 US; 1603987.7 08/03/2016 GB
(45) 27/03/2023 420 (43) 25/12/2018 369A
(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)
Paul-Ehrlich-Straße 15, 72076 Tübingen, Germany
(72) MAHR, Andrea (DE); WEINSCHENK, Toni (DE); SONG, Colette (DE); SCHOOR,
Oliver (DE); FRITSCH, Jens (DE); SINGH, Harpreet (DE).
(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)
-

(54) PEPTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP ĐỂ SỬ DỤNG TRONG LIỆU PHÁP MIỄN DỊCH VÀ
PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến peptit được phân lập chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID
NO: 12. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kháng thể được phân lập, thụ thể tế bào T được
phân lập, aptame nhận biết đặc hiệu peptit, axit nucleic mã hóa peptit, tế bào chủ tái tổ hợp
chứa peptit, tế bào lymphô T hoạt hóa và phương pháp tạo ra tế bào này *in vitro*, được
phẩm và kit bao gồm đồ chứa để đựng được 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 đối với bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến epitop peptit của tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác để có thể dùng làm, ví dụ, thành phần 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.

Sáng chế đề cập đến một số trình tự peptit mới 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 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 và tế bào có hoạt tính được học/miễn dịch học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư tử cung – bệnh ung thư thân tử cung (bệnh ung thư màng trong tử cung) là bệnh ung thư phổ biến thứ sáu ở phụ nữ. Bệnh này được chẩn đoán trên toàn cầu với tỷ lệ mắc bệnh bằng 8,2/100000 phụ nữ, chiếm 4,8% trong tổng số ca mắc bệnh ung thư ở phụ nữ. Năm 2012, 320000 phụ nữ được chẩn đoán mắc bệnh ung thư màng trong tử cung. Tỷ lệ tử vong bằng 1,8/100000 phụ nữ là thấp hơn đáng kể so với tỷ lệ mắc bệnh. Liên quan đến bệnh ung thư cổ tử cung, là bệnh ung thư phổ biến thứ tư ở phụ nữ, có 528000 ca mắc bệnh được chẩn đoán năm 2012, tương ứng với tỷ lệ mắc bệnh bằng 14/100000 phụ nữ hoặc 7,9% trong tổng số ca mắc bệnh ung thư ở phụ nữ. Ngoài ra, với tỷ lệ tử vong của bệnh ung thư cổ tử cung bằng 6,8/100000, tỷ lệ này thấp hơn rõ ràng so với tỷ lệ mắc bệnh (World Cancer Report, 2014).

Tỷ lệ mắc bệnh ung thư màng trong tử cung thay đổi rất lớn giữa các nước; gần hai phần ba số ca mắc bệnh mới được ước tính xuất hiện ở các nước có chỉ số phát

triển con người cao hoặc rất cao. Theo đó, tỷ lệ mắc bệnh tăng lên ở Bắc Âu và Đông Âu và Bắc Mỹ (tỷ lệ mắc bệnh được chuẩn hóa theo độ tuổi (age-standardized rate: ASR)) tương ứng bằng 14 và 19/100000 phụ nữ), và tỷ lệ này có xu hướng thấp ở Bắc Phi và Tây Á (ASR = 5/100000 phụ nữ) (World Cancer Report, 2014).

Bệnh ung thư cổ tử cung ảnh hưởng chủ yếu đến phụ nữ ở các nước có nguồn lực thấp; gần 70% gánh nặng toàn cầu xuất hiện ở các vùng có chỉ số phát triển con người thấp hoặc trung bình, và hơn một phần năm số ca mắc mới của bệnh ung thư cổ tử cung được chẩn đoán ở Ấn Độ. Đây là bệnh ung thư phổ biến nhất ở phụ nữ ở 39 trong số 184 nước trên thế giới, và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do bệnh ung thư ở phụ nữ của 45 nước. Các nước này chủ yếu ở vùng châu Phi hạ Saharan (tỷ lệ ASR = 35/100000 phụ nữ), các nước châu Á, và một số nước ở Trung Mỹ và Nam Mỹ (ASR = 21/100000 phụ nữ). Tỷ lệ mắc bệnh thấp nhất có xu hướng ở Tây Âu (ASR = 11/100000 phụ nữ), Bắc Mỹ, Úc và New Zealand, và Đông Địa Trung Hải (World Cancer Report, 2014).

Tỷ lệ sống thêm 1 năm đối với bệnh ung thư màng trong tử cung là khoảng 92% trong khi tỷ lệ này bằng khoảng 87% đối với bệnh ung thư cổ tử cung (SEER Stat facts, 2014). Tỷ lệ sống thêm 5 năm đối với bệnh ung thư màng trong tử cung là 82% và 68% đối với bệnh ung thư cổ tử cung. Như với nhiều bệnh ung thư, bệnh ung thư màng trong tử cung là bệnh liên quan đến độ tuổi. Khả năng tử vong do bệnh ung thư màng trong tử cung là <0,1% ở độ tuổi dưới 50, 0,2% ở độ tuổi từ 50 đến 70 và 0,5% đối với phụ nữ trên 70 tuổi. Trái lại, nguy cơ tử vong do bệnh ung thư cổ tử cung cao nhất ở cả nhóm phụ nữ dưới 50 tuổi cũng như trên 70 tuổi (American Cancer Society, 2015).

Trên 80% bệnh ung thư màng trong tử cung xuất hiện dưới dạng caxinom tuyến nội mạc tử cung (typ I), dạng có liên quan với sự tiếp xúc với estrogen và dạng này được biệt hóa ở mức cao đến vừa phải. Béo phì là một trong số các yếu tố nguy cơ của bệnh ung thư nội mạc tử cung, được ước tính chiếm đến 40% số ca mắc bệnh trên toàn thế giới (World Cancer Report, 2014). Các yếu tố nguy cơ khác là tình trạng huyết áp cao và đái tháo đường (National Cancer Institute, 2015). Các thuốc tránh thai dùng qua đường miệng chứa progestogen làm giảm nguy cơ. Các tổn thương di truyền chính bao gồm tính bất ổn định vi vệ tinh và các đột biến của gen PTEN, PIK3CA, ARID1A, KRAS, và CTNNB1 (β -catenin) (World Cancer Report, 2014).

Bên cạnh caxinom tuyến nội mạc tử cung, các bệnh caxinom màng trong tử cung ở mức cao không liên quan đến estrogen (caxinom tuyến thể thanh dịch không phải nội mạc tử cung và caxinom tuyến tế bào sáng, typ II) có liên quan với sự tiên lượng xấu. Caxinom không phải nội mạc tử cung có liên quan với sự đột biến TP53 và PPP2R1A, sự mất E-cadherin, sự khuếch đại HER2/neu, và sự mất tính dị hợp ở nhiều locus (World Cancer Report, 2014).

Bệnh ung thư cổ tử cung xuất hiện ở cả hai loại mô chính: caxinom tế bào vảy (85-90%) và caxinom tuyến (10-15%), các bệnh này có liên quan chặt chẽ với sự nhiễm virus gây u nhú ở người (human papillomavirus: HPV), yếu tố nguy cơ chính của bệnh ung thư cổ tử cung. Virus HPV gây ra các tổn thương tiền ung thư có thể được phát hiện và điều trị. Độ tuổi trung bình xuất hiện các tổn thương mức độ thấp là từ 24 đến 27 và từ 35 đến 42 tuổi đối với tổn thương mức độ cao. Ít nhất 20% các tổn thương mức độ cao tiến triển thành caxinom xâm lấn trong vòng 10 năm. Việc tiêm phòng virus HPV tạo ra lực chọn phòng bệnh. Phát hiện được các đột biến sinh dưỡng phổ biến nhất ở bệnh ung thư cổ tử cung đối với PIK3CA, và có liên quan với thời gian sống thêm ngắn (World Cancer Report, 2014).

Việc điều trị caxinom màng trong tử cung phụ thuộc vào giai đoạn. Phần lớn các bệnh caxinom màng trong tử cung bao gồm caxinom tuyến nội mạc tử cung được biệt hóa ở mức cao đến vừa phải, các bệnh này thường giới hạn ở thân tử cung khi chẩn đoán và có thể được chữa khỏi bằng cách cắt bỏ tử cung (World Cancer Report, 2014). Theo cách khác, để duy trì khả năng sinh sản ở bệnh nhân mắc caxinom màng trong tử cung giai đoạn sớm và mong muốn có con, liệu pháp bảo tồn với thuốc Megesterolacetat có thể là một lựa chọn. Tuy nhiên, tỷ lệ tái phát cao cần được tính đến. Đối với các bệnh nhân mắc caxinom màng trong tử cung tiến triển, các phương pháp làm thuyên giảm tạm thời khác trước khi cắt bỏ tử cung có thể cải thiện chất lượng cuộc sống cũng như việc chẩn đoán. Phương pháp này thường được kết hợp với liệu pháp xạ trị hỗ trợ. Các bệnh nhân không thể phẫu thuật được điều trị bằng liệu pháp xạ trị làm liệu pháp chính. Nếu không thể cắt bỏ cũng như chiếu xạ, caxinom dương tính với thụ thể progesteron được điều trị bằng gestagene hoặc tamoxifen. Trong trường hợp bệnh tiến triển khi sử dụng liệu pháp nội tiết hoặc bệnh caxinom âm tính với thụ thể progesteron, các bệnh nhân được cho sử dụng Adriamycin, Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel, hoặc Docetaxel (Leitlinie Endometriumkarzinom, 2008).

Ngoài ra, thuốc Megestrol Acetate đã được Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (Food and Drug Administration: FDA) chấp thuận để điều trị làm giảm tạm thời bệnh ung thư màng trong tử cung tiến triển (National Cancer Institute, 2015). Các bệnh nhân có sự đột biến PTEN được điều trị bằng các chất ức chế PARP (Dedes et al., 2010).

Các liệu pháp điều trị bệnh ung thư cổ tử cung cũng phụ thuộc vào giai đoạn bệnh. Ở giai đoạn sớm, phẫu thuật cắt bỏ là liệu pháp chuẩn, liệu pháp này có thể được kết hợp với liệu pháp xạ trị-(hóa trị). Liệu pháp xạ trị-(hóa trị) làm liệu pháp chính được chọn khi bệnh ở giai đoạn muộn (giai đoạn III hoặc muộn hơn), trong các trường hợp có sự thâm nhiễm hạch bạch huyết hoặc trong trường hợp không thể cắt bỏ khối u. Việc xác định vị trí xạ trị được chọn theo mức độ thâm nhiễm hạch bạch huyết và việc chiếu xạ được hỗ trợ bởi Cisplatin (S3-Leitlinie Zervixkarzinom, 2014). Đã chứng minh được rằng liệu pháp xạ trị-(hóa trị) kết hợp với Cisplatin là có lợi về thời gian sống thêm toàn bộ (overall survival: OS) và thời gian sống thêm không có sự tiến triển của bệnh (progression free survival: PFS) so với khi chỉ sử dụng liệu pháp xạ trị. Cần lưu ý rằng việc kết hợp với các thuốc khác không cải thiện thời gian OS hoặc PFS so với khi chỉ sử dụng trong khi độc tính lại tăng lên (Green et al., 2005; Wang et al., 2011; Lukka et al., 2002). Để điều trị bệnh tái phát cục bộ, sự kết hợp Cisplatin với các dược chất khác đã được thử nghiệm và chỉ sự kết hợp với Topotecan tạo ra thời gian OS được cải thiện so với khi chỉ sử dụng Cisplatin (S3-Leitlinie Zervixkarzinom, 2014).

Hiện nay, cũng có một số phương pháp điều trị miễn dịch được thử nghiệm. Trong thử nghiệm lâm sàng pha I/II, các bệnh nhân mắc bệnh ung thư tử cung được tiêm vaxcin chứa các tế bào đuôi gai (dendritic cell: DC) tự thân được gây xung điện bằng ARN thông tin của gen khối u Wilms 1 (WT1). Ngoài một trường hợp có phản ứng dị ứng tại chỗ với liệu pháp bổ trợ, không quan thấy tác dụng phụ có hại và 3 trong số 6 bệnh nhân có sự đáp ứng miễn dịch (Coosemans et al., 2013).

Như đã nêu trên đây, bệnh nhiễm virus HPV gây ra các tổn thương mà cuối cùng có thể dẫn đến bệnh ung thư cổ tử cung. Do đó, các protein gây ung thư E6 và E7 của virus HPV được biểu hiện chủ yếu trong các tổn thương ở mức cao và bệnh ung thư và là các protein cần thiết cho sự khởi phát và duy trì kiểu hình ác tính được cho là các đích hứa hẹn của phương pháp điều trị miễn dịch (Hung et al., 2008; Vici et

al., 2014). Một nghiên cứu thực hiện liệu pháp tế bào T thích ứng (Adoptive T-cell therapy: ACT) ở các bệnh nhân mắc bệnh ung thư cổ tử cung di căn. Các bệnh nhân được tiêm truyền tế bào T thâm nhiễm khối u (tumor-infiltrating T cell: TIL) có khả năng phản ứng với E6 và E7 tạo ra sự thoái triển bệnh hoàn toàn ở 2 bệnh nhân và sự đáp ứng một phần ở 1 trong số 9 bệnh nhân (Stevanovic et al., 2015). Ngoài ra, kháng thể trong tế bào hướng đích E7 đã được thông báo là ức chế sự phát triển khối u ở chuột (Accardi et al., 2014). Ngoài ra, các vaccin trên cơ sở peptit, ADN và tế bào DC hướng đích là E6 và E7 của HPV đang được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng (Vici et al., 2014).

Khi tính đến các tác dụng phụ nghiêm trọng và chi phí liên quan đến việc điều trị bệnh ung thư, cần xác định các yếu tố có thể được sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư nói chung và bệnh ung thư tử cung nói riêng. Cũng cần xác định các yếu tố thể hiện dấu ấn sinh học của bệnh ung thư nói chung và bệnh ung thư tử cung nói riêng, để chẩn đoán bệnh ung thư, đánh giá tiên lượng, và dự đoán thành công điều trị tốt hơn.

Liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư là lựa chọn hướng đích đặc hiệu của các tế bào ung thư trong khi làm giảm đến mức tối thiểu các tác dụng phụ. Liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư sử dụng sự tồn tại của các kháng nguyên liên quan đến khối u.

Sự phân loại hiện nay của các kháng nguyên liên quan đến khối u (TAAs) 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 về nhóm này, lúc đầu các kháng nguyên này được gọi là kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư 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 của HLA nhóm I và II, các kháng nguyên này không thể được nhận biết bởi tế bào T trong các 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 các 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: đã phát hiện được các gen mã hoá TAA được biểu hiện rộng rãi 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, telomerase 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. 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 liên quan) của peptit cũng có thể xuất hiện nếu peptit này có nguồn gốc từ exon của khối u (-có liên quan) trong trường hợp các protein có các đồng dạng đặc hiệu khối u (-có liên quan).

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 của 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.

Liệu pháp miễn dịch trên cơ sở tế bào T hướng đích là các epitop peptit có nguồn gốc từ các protein liên quan đến khối u hoặc đặc hiệu khối u, được biểu hiện bởi các phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC). Các kháng nguyên được nhận biết bởi các tế bào lymphô T 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.

Có hai nhóm phân tử của MHC là MHC nhóm I và MHC nhóm II. Các phân tử của MHC nhóm I gồm chuỗi nặng alpha và beta-2-microglobulin, các phân tử của MHC nhóm II gồm chuỗi alpha và chuỗi beta. 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 của 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. Tuy nhiên, các peptit có nguồn gốc từ các ngăn thể nhân hoặc nguồn ngoại sinh cũng thường được tìm thấy trên các phân tử của 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 (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Các phân tử của 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 ví dụ, 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 tế bào T (T-cell receptor: TCR) thích hợp, trong khi các phức hợp của peptit và phân tử MHC nhóm II được nhận biết bởi các tế bào T hỗ trợ dương tính với CD4 mang thụ thể TCR thích hợp. 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 (TAA) là điều quan trọng nhất để phát triển các sản phẩm được đề kích thích đáp ứng miễn dịch kháng khối u (Gnjatic et al., 2003). Ở vị trí khối u, các tế bào T hỗ trợ kích thích xytokin 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, đã phát hiện được các tế bào khối u 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 của 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 khối u. Các epitop của tế bào T hỗ trợ kích thích đáp ứng của tế bào T hỗ trợ về chức năng hiệu ứng kích thích 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 được chất có hoạt tính của chế phẩm vaccin để kích thích các đáp ứng miễn dịch kháng khối 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) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). 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).

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 vacxin từ 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.

Đối với các protein cần được nhận biết bởi các tế bào lymphô T 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 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 sinh miễn dịch”), có nguồn gốc từ kháng nguyên liên quan với khối u, và 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 thường 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 protein 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 như vậy 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 hướng đích peptit-MHC bằng các thụ thể TCR đặc hiệu (ví dụ, các thụ thể TCR hòa tan) và kháng thể hoặc các phân tử gắn kết khác (khung) theo

sáng chế, tính sinh miễn dịch của các peptit cơ sở là thứ yếu. Trong các trường hợp này, sự biểu hiện là yếu tố quyết định.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến peptit chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54 hoặc trình tự biến thể của nó có mức độ tương đồng ít nhất 77%, tốt hơn là ít nhất 88% (tốt hơn là có mức độ giống ít nhất 77% hoặc ít nhất 88%) với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54, 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 cơ sở có chiều dài đầy đủ.

Sáng chế còn đề cập đến peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54 hoặc biến thể của nó, có mức độ tương đồng ít nhất 77%, tốt hơn là ít nhất 88% (tốt hơn là có mức độ giống ít nhất 77% hoặc ít nhất 88%) với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54, trong đó peptit này hoặc biến thể của nó có từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là có từ 8 đến 30 axit amin, và được ưu tiên nhất là có từ 8 đến 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch.

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

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

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể đặc hiệu với các 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 cập đến tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế hoặc vector biểu hiện như được mô tả trên đây. Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ theo sáng chế là tế bào trình diện kháng nguyên, và tốt hơn nếu là tế bào đuôi gai.

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

Sáng chế còn đề cập đến kit bao gồm:

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

(b) tùy ý, đồ chứa thứ hai để đựng chất pha loãng hoặc dung dịch hoàn nguyên

dùng cho chế phẩm dạng đông khô nhanh; và

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1I thể hiện sự biểu hiện quá mức của các peptit khác nhau ở mô bình thường (cột màu trắng) và mô ung thư tử cung (cột màu đen). Fig.1A) Ký hiệu gen: PIGR, Peptit: RLDIQGTGQLL (SEQ ID NO.: 4), Các mô từ trái sang phải: 3 mô mỡ, 4 tuyến thượng thận, 16 tế bào máu, 15 mạch máu, 9 tủy xương, 10 não, 7 vú, 6 thực quản, 2 mắt, 3 túi mật, 8 tim, 12 thận, 19 đại tràng, 19 gan, 46 phổi, 7 hạch bạch huyết, 8 dây thần kinh, 3 buồng trứng, 8 tụy, 3 tuyến cận giáp, 1 màng bụng, 5 tuyến yên, 6 nhau thai, 3 màng phổi, 3 tuyến tiền liệt, 7 tuyến nước bọt, 5 cơ vân, 12 da, 3 ruột non, 11 lách, 5 dạ dày, 4 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 2 tuyến giáp, 10 khí quản, 6 niệu quản, 8 bàng quang, 5 tử cung, 15 mẫu bệnh ung thư tử cung. Fig.1B) Ký hiệu gen: STX18, Peptit: SLFDEVRI (SEQ ID NO.:5), Các mô từ trái sang phải: 3 mô mỡ, 4 tuyến thượng thận, 16 tế bào máu, 15 mạch máu, 9 tủy xương, 10 não, 7 vú, 6 thực quản, 2 mắt, 3 túi mật, 8 tim, 12 thận, 19 đại tràng, 19 gan, 46 phổi, 7 hạch bạch huyết, 8 dây thần kinh, 3 buồng trứng, 8 tụy, 3 tuyến cận giáp, 1 màng bụng, 5 tuyến yên, 6 nhau thai, 3 màng phổi, 3 tuyến tiền liệt, 7 tuyến nước bọt, 5 cơ vân, 12 da, 3 ruột non, 11 lách, 5 dạ dày, 4 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 2 tuyến giáp, 10 khí quản, 6 niệu quản, 8 bàng quang, 5 tử cung, 15 mẫu bệnh ung thư tử cung. Peptit được phát hiện bổ sung trên 1/84 mẫu bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ; Fig.1C) Ký hiệu gen: LIG3, Peptit: VLLDIFTGV (SEQ ID NO.: 2), Các mô từ trái sang phải: 3 mô mỡ, 4 tuyến thượng thận, 16 tế bào máu, 15 mạch máu, 9 tủy xương, 10 não, 7 vú, 6 thực quản, 2 mắt, 3 túi mật, 8 tim, 12 thận, 19 đại tràng, 19 gan, 46 phổi, 7 hạch bạch huyết, 8 dây thần kinh, 3 buồng trứng, 8 tụy, 3 tuyến cận giáp, 1 màng bụng, 5 tuyến yên, 6 nhau thai, 3 màng phổi, 3 tuyến tiền liệt, 7 tuyến nước bọt, 5 cơ vân, 12 da, 3 ruột non, 11 lách, 5 dạ dày, 4 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 2 tuyến giáp, 10 khí quản, 6 niệu quản, 8 bàng quang, 5 tử cung, 15 mẫu bệnh ung thư tử cung. Peptit được phát hiện bổ sung trên 4/18 mẫu bạch cầu tủy bào cấp tính, 4/14 mẫu bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 3/18 mẫu bệnh ung thư vú, 2/17 mẫu bệnh bạch cầu lymphô bào mạn tính, 1/17 mẫu bệnh ung thư kết-trực tràng, 1/17 mẫu bệnh ung thư

túi mật và ống mật chủ, 2/19 mẫu bệnh ung thư tế bào gan, 3/17 mẫu u melanin, 4/20 mẫu u lymphô, 4/20 mẫu bệnh ung thư buồng trứng, 1/17 mẫu bệnh ung thư thực quản, 1/19 mẫu bệnh ung thư tụy, 3/31 mẫu bệnh ung thư não, 2/15 mẫu bệnh ung thư bàng quang và 3/84 mẫu bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ. Fig.1D) Ký hiệu gen: SEMA4C, Peptit: GLDGATYTV (SEQ ID NO.: 3), Các mẫu từ trái sang phải: 3 dòng tế bào (1 tế bào máu, 1 tụy, 1 da), 2 mô bình thường (1 nhau thai, 1 tử cung), 20 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư thận, 1 bệnh ung thư gan, 5 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 2 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 3 u melanin, 1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang, 3 bệnh ung thư tử cung). Fig.1E: Ký hiệu gen: TRIM5; Peptit: SVMELLQGV (SEQ ID NO.: 8); Các mô từ trái sang phải: 4 dòng tế bào (4 tế bào lymphô), 8 mô bình thường (1 thận, 1 gan, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 ruột non, 1 tuyến giáp, 2 tử cung), 32 mô ung thư (3 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 3 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư tế bào tụy, 1 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 1 bệnh ung thư túi mật, 3 bệnh ung thư gan, 5 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 3 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư dạ dày, 6 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư bàng quang, 3 bệnh ung thư tử cung); Fig.1F: Ký hiệu gen: GLYATL2; Peptit: VLGPEGQLV (SEQ ID NO.: 21); Các mô từ trái sang phải: 1 mô bình thường (1 khí quản), 12 mô ung thư (1 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 2 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 bệnh ung thư phổi, 6 bệnh ung thư tử cung); Fig.1G: Ký hiệu gen: FRG1B; Peptit: TLLDRVAVI (SEQ ID NO.: 30); Các mô từ trái sang phải: 2 dòng tế bào (1 bạch cầu, 1 thận), 5 mô bình thường (1 ruột kết, 1 gan, 1 hạch bạch huyết, 1 ruột non, 1 lách), 27 mô ung thư (1 bệnh ung thư tế bào tụy, 2 bệnh ung thư vú, 3 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 1 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư trực tràng, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 1 bệnh ung thư túi mật, 2 bệnh ung thư gan, 1 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 4 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 2 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư não, 3 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư thận, 1 bệnh ung thư bàng quang, 2 bệnh ung thư tử cung); Fig.1H: Ký hiệu gen: RNF145; Peptit: NMDDVIYYV (SEQ ID NO.: 46); Các mô từ trái sang phải: 1 dòng tế bào (1 tụy), 5 mô bình thường (2 tuyến thượng thận, 1 lách, 2 khí quản), 37 mô ung thư (3 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 3 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 1 bệnh ung thư túi mật, 1 bệnh ung thư gan, 3 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 4 bệnh ung thư da, 4 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 2

bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư tụy, 2 bệnh ung thư dạ dày, 5 bệnh ung thư phổi, 2 bệnh ung thư bàng quang, 4 bệnh ung thư tử cung); Fig.1I: Ký hiệu gen: ADNP2; Peptit: VMHDSSFSV (SEQ ID NO.: 53); Các mô từ trái sang phải: 8 dòng tế bào (1 bàng quang, 1 tế bào lymphô, 1 bạch cầu, 1 da, 2 tuyến tiền liệt, 2 tụy), 24 mô bình thường (2 tuyến thượng thận, 1 thực quản, 1 mắt, 1 vùng đầu và cổ, 1 thận, 1 trực tràng, 2 phổi, 2 hạch bạch huyết, 1 tụy, 1 màng bụng, 4 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 2 ruột non, 2 tuyến giáp, 2 tử cung), 98 mô ung thư (3 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 6 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 4 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư kết-trực tràng, 1 bệnh ung thư ruột kết, 3 bệnh ung thư trực tràng, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 2 bệnh ung thư túi mật, 3 bệnh ung thư gan, 4 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 5 bệnh ung thư da, 5 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 4 bệnh ung thư buồng trứng, 5 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư tụy, 11 bệnh ung thư não, 25 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư thận, 7 bệnh ung thư bàng quang, 5 bệnh ung thư tử cung).

Các hình vẽ từ Fig.2A đến Fig.2D thể hiện các profin biểu hiện làm ví dụ của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện cao quá mức hoặc chỉ được biểu hiện trong bệnh ung thư tử cung trong tập hợp các mẫu mô bình thường (cột màu trắng) và 10 mẫu ung thư tử cung (cột màu đen). Các mô từ trái sang phải: 6 động mạch, 2 tế bào máu, 2 não, 1 tim, 2 gan, 3 phổi, 2 tĩnh mạch, 1 mô mỡ, 1 tuyến thượng thận, 5 tủy xương, 1 sụn, 1 ruột kết, 1 thực quản, 2 mắt, 2 túi mật, 1 thận, 6 hạch bạch huyết, 4 tụy, 2 dây thần kinh ngoại biên, 2 tuyến yên, 1 trực tràng, 2 tuyến nước bọt, 2 cơ vân, 1 da, 1 ruột non, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tuyến giáp, 7 khí quản, 1 bàng quang, 1 vú, 5 buồng trứng, 5 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tử cung, 10 mẫu bệnh ung thư tử cung. Fig.2A) Ký hiệu gen: MSX1, Fig.2B) Ký hiệu gen: NXNL2, Fig 2C) Ký hiệu gen: TMEM101, và Fig.2D) Ký hiệu gen: STX18.

Fig.3 thể hiện số liệu về tính sinh miễn dịch làm ví dụ: kết quả đếm tế bào theo dòng sau khi nhuộm multime đặc hiệu peptit.

Fig.4 thể hiện kết quả làm ví dụ của các đáp ứng của tế bào T CD8+ *in vitro* đặc hiệu peptit của người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh. Các tế bào T CD8+ được tạo môi bằng cách sử dụng các tế bào APC nhân tạo được phủ kháng thể đơn dòng mAb kháng CD28 và HLA-A*02 trong phức hợp với peptit có trình tự SeqID No.2 (hình A, ô bên trái), peptit có trình tự SeqID No.7 (hình B, ô bên trái) và peptit có trình tự SeqID No.23 (hình C, ô bên trái), tương ứng. Sau ba chu trình kích thích, phát hiện

các tế bào có khả năng phản ứng với peptit bằng cách nhuộm multime 2D bằng A*02/SeqID No.2 (hình A), A*02/SeqID No. 7 (hình B) hoặc A*02/SeqID No.23 (hình C). Các ô bên phải (hình A, B và C) thể hiện kết quả nhuộm đối chứng của các tế bào được kích thích bằng phức hợp 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.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các bảng sau đây thể hiện các peptit theo sáng chế, các số trình tự nhận biết tương ứng của chúng, và gen nguồn (cơ sở) triển vọng của các peptit này. Tất cả các peptit trong Bảng 1 và Bảng 2 đều gắn kết với HLA-A*02. Các peptit trong Bảng 2 đã được bộc lộ trước đó trong danh mục lớn theo kết quả của công nghệ cho phép sàng lọc thông lượng cao với tỷ lệ sai số cao hoặc được tính toán bằng cách sử dụng các thuật toán, nhưng không hề liên quan đến bệnh ung thư trước đó. Các peptit trong Bảng 3 là các peptit bổ sung có thể hữu ích khi kết hợp với các peptit khác của sáng chế. Ngoài ra, các peptit trong Bảng 4 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 các polypeptit cơ sở tương ứng.

Bảng 1: Các peptit theo sáng chế.

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
1	KLLDNLHDL	5241	PGR
2	VLLDIFTGV	3980	LIG3
3	GLDGATYTV	54910	SEMA4C
4	RLDIQGTGQLL	5284	PIGR
5	SLFDEVRQI	53407	STX18
6	SLLSELVEA	57542	KLHDC5
7	SILSLLIKL	130507	UBR3
8	SVMELLQGV	85363	TRIM5
9	SLYPGTETM	6840	SVIL
10	AILDVVVNL	5991	RFX3

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
11	ALDPIIHGL	5793	PTPRG
12	ALAPSEGVQAA	4487	MSX1
13	ALQNKVVAL	158046	NXNL2
14	FLVDSLISA	3236	HOXD10
15	GLLSVELRV	54798	DCHS2
16	KLNSSIQYV	93035	PKHD1L1
17	KLWEESTAQV	127254	C1orf173
18	SLLRCPAKA	1409	CRYAA
19	YLETMNITL	283209	PGM2L1
20	ALLGFVTDL	493	ATP2B4
21	VLGPEGQLV	219970	GLYATL2
22	VLVSSVLGV	59307	SIGIRR
23	GLGPNLVGV	55186, 653698, 84275	SLC25A36, SLC25A33
24	ILDAQTAfV	4363	ABCC1
25	ILLELFTHV	26270, 93611	FBXO6, FBXO44
26	SVLAGVVGv	2977	GUCY1A2
27	VLNPETTVV	9061	PAPSS1
28	GLDEAIRKV	219970	GLYATL2
29	IGIGPVLNI	55217	TMLHE
30	TLLDRVAVI	100996779, 283788, 284802	FRG1B
31	ALLTAVTNV	221496	LEMD2
32	GLIENTYQL	285533	RNF175
33	SMTTNLDLKV	338949	TMEM202
34	AIAGRLLGV	1184	CLCN5
35	TLLPTLYEI	285671	RNF180
36	SLLSDIHAL	9091	PIGQ
37	VLLATVTEL	79939	SLC35E1
38	RILDIDIPLSV	29842	TFCP2L1
39	ALDGKIYEL	394	ARHGAP5
40	GLLGGVIMMV	7922	SLC39A7
41	YIDDIFSGV	374618	TEX9

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
42	FLSGYYVTL	84336	TMEM101
43	VIANEIEKV	80832	APOL4
44	FLNGLEILL	23195	MDN1
45	VLLHVSVLL	254359	ZDHHC24

Bảng 2: Các peptit bổ sung theo sáng chế không liên quan đến bệnh ung thư đã biết trước đó

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
46	NMDDVIYYV	153830	RNF145
47	GLVEQLYDL	26155, 401010	NOC2L
48	ILAETQPEL	53407	STX18
49	ALLELLHEL	221496	LEMD2
50	TLSTVIATV	1822	ATN1
51	TVPPVFVSV	3778	KCNMA1
52	ALISEKLETL	54431	DNAJC10
53	VMHDSSFVS	22850	ADNP2
54	TLSDVVVGL	26610	ELP4

Bảng 3: Các peptit hữu ích, ví dụ, đối với liệu pháp điều trị ung thư được cá nhân hóa

J = phospho-serin

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
55	KIDEKNFVV	5887	RAD23B
56	LLLEILHEI	30001	ERO1L
57	ALADLTGTVV	23385	NCSTN
58	GVLENIFGV	399909	PCNXL3
59	QLLAGVFLA	3371	TNC
60	KLFNEFIQL	10885	WDR3
61	ILSGIGVSQV	3703	STT3A
62	SLWGGDVVL	157680	VPS13B
63	RLLJAAENFL	64092	SAMSN1
64	ALYDSVILL	1734	DIO2

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
65	GLAPGGGLAVV	58525	WIZ
66	SLFSSPPEI	252983	STXBP4
67	ALQPLLHTV	54756	IL17RD
68	SLAEVNTQL	11190	CEP250
69	VLTEFTREV	55705	IPO9
70	KLGAVFNQV	23450	SF3B3
71	SLHNGVIQL	1314	COPA

Nói chung, sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế để sử dụng trong việc điều trị các bệnh tăng sinh, ví dụ như bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ống mật chủ, bệnh ung thư não, bệnh bạch cầu lymphô bào mạn tính (CLL), caxinom kết-trực tràng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tế bào gan (HCC), caxinom tế bào Merkel, u melanin, u lymphô không Hodgkin, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ (SCLC) và bệnh ung thư bàng quang.

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: 54. Được ưu tiên hơn nữa 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: 19 (xem Bảng 1), và sử dụng chúng trong liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư tử cung, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ống mật chủ, bệnh ung thư não, bệnh bạch cầu lymphô bào mạn tính (CLL), caxinom kết-trực tràng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tế bào gan (HCC), caxinom tế bào Merkel, u melanin, u lymphô không Hodgkin, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ (SCLC) và bệnh ung thư bàng quang, và tốt hơn nếu là bệnh ung thư tử cung.

Như được thể hiện trong Bảng 4A và Bảng 4B sau đây, nhiều peptit theo sáng chế cũng được tìm thấy trên nhiều loại khối u khác nhau và do đó cũng có thể được sử dụng trong liệu pháp miễn dịch của các triệu chứng khác. Xem thêm trên Fig.1 và trong ví dụ 1.

Bảng 4A: 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. Bảng này cho thấy rằng đối với các peptit được chọn mà trên các loại khối u bổ sung chúng được phát hiện và có sự biểu hiện quá mức đối với trên ít nhất 5% các mẫu khối u được xác định, hoặc có sự biểu hiện 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 biểu hiện quá mức được xác định là sự biểu hiện cao hơn ở mẫu khối u so với mẫu bình thường có sự biểu hiện cao nhất. Các mô bình thường kháng lại sự biểu hiện quá mức được thử nghiệm là: mô mỡ, tuyến thượng thận, động mạch, tủy xương, não, dây thần kinh trung ương, ruột kết, thực quản, mắt, túi mật, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, bạch cầu, tụy, tuyến cận giáp, dây thần kinh ngoại biên, màng bụng, tuyến yên, màng phổi, trực tràng, tuyến nước bọt, cơ vân, da, ruột non, lách, dạ dày, tuyến ức, tuyến giáp, khí quản, niệu quản, bàng quang, tĩnh mạch.

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
1	KLLDNLHDL	HCC, BRCA
2	VLLDIFTGV	Bệnh ung thư não, HCC, PrC, AML, OC, bệnh ung thư bàng quang
3	GLDGATYTV	SCLC, RCC, HCC, PrC, NHL, BRCA, u melanin, bệnh ung thư bàng quang
6	SLLSELVEA	NSCLC, RCC, bệnh ung thư não, PrC, NHL, AML, BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản, OC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
7	SILSLLIK	SCLC, AML, bệnh ung thư bàng quang
8	SVMELLQGV	SCLC, HCC, PrC, CLL, AML, u melanin, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
9	SLYPGTETM	AML, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
10	AILDVVVNL	SCLC, bệnh ung thư não, NHL, AML
11	ALDPPIHGL	Bệnh ung thư não, u melanin
14	FLVDSLISA	HCC
15	GLLSVELRV	AML
17	KLWEESTAQV	OC
20	ALLGFVTDL	Bệnh ung thư não, NHL, AML, bệnh ung thư bàng quang

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
21	VLGPEGQLV	BRCA
22	VLVSSVLGV	AML
23	GLGPNLVGV	SCLC, bệnh ung thư não, NHL, AML, BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang
24	ILDAQTAfV	NSCLC, RCC, NHL, AML, BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang
25	ILLELFTHV	NSCLC, CRC, CLL, bệnh ung thư bàng quang
27	VLNPETTVV	Bệnh ung thư não, AML, u melanin, bệnh ung thư bàng quang
28	GLDEAIRKV	BRCA
29	IGIGPVLNI	Bệnh ung thư não, HCC, NHL, AML, BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản, OC, bệnh ung thư bàng quang
30	TLLDRVAVI	RCC, CLL, AML, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
31	ALLTAVTNV	HCC, BRCA
32	GLIENTYQL	RCC, NHL, AML, BRCA, u melanin
34	AIAGRLLGV	U melanin, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
35	TLLPTLYEI	SCLC, bệnh ung thư não, PC, PrC, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
36	SLLSDIIAL	Bệnh ung thư não, HCC, PrC, AML, BRCA, bệnh ung thư bàng quang
37	VLLATVTEL	SCLC, NHL, BRCA, u melanin
39	ALDGKIYEL	U melanin
40	GLLGGVIMMV	NSCLC, SCLC, bệnh ung thư não, CRC, HCC, PrC, NHL, AML, MCC, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
41	YIDDIFSGV	U melanin
42	FLSGYYVTL	AML, u melanin
43	VIANEIEKV	PrC, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang
44	FLNGLEILL	CLL, NHL, AML
45	VLLHVSVLL	PC, BRCA

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
46	NMDDVIYYV	NHL, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
47	GLVEQLYDL	SCLC, CLL, NHL, AML, BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản
49	ALLELLHEL	SCLC, HCC, PrC, MCC
50	TLSTVIATV	PrC, u melanin
51	TVPPVFVSV	RCC, CRC, HCC
52	ALISEKLETL	CLL, NHL, AML, BRCA, u melanin
53	VMHDSSFSV	NSCLC, SCLC, bệnh ung thư não, AML, BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
54	TLSDVVVGL	Bệnh ung thư não, HCC, PrC, CLL, NHL, AML, BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản, OC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ

NSCLC (non-small cell lung cancer) = bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, SCLC (small cell lung cancer) = bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, RCC (kidney cancer) = bệnh ung thư thận, CRC (colon or rectum cancer) = bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, GC (stomach cancer) = bệnh ung thư dạ dày, HCC (liver cancer) = bệnh ung thư gan, PC (pancreatic cancer) = bệnh ung thư tụy, PrC (prostate cancer) = bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu, BrCa (breast cancer) = bệnh ung thư vú, MCC (Merkel cell carcinoma) = caxinom tế bào Merkel, OC (ovarian cancer) = bệnh ung thư buồng trứng, NHL (non-Hodgkin lymphoma) = u lymphô không Hodgkin, AML (acute myelogenous leukemia) = bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính

Bảng 4B: 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. Bảng này cho thấy rằng đối với các peptit được chọn mà trên các loại khối u bổ sung chúng được phát hiện và có sự biểu hiện quá mức đối với trên ít nhất 5% các mẫu khối u được xác định, hoặc có sự biểu hiện 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 biểu hiện quá mức được xác định là sự biểu hiện cao hơn ở mẫu khối u so với mẫu bình thường có sự biểu hiện cao nhất. Các mô bình thường kháng lại sự biểu hiện quá mức được thử nghiệm là: mô mỡ, tuyến thượng thận, động mạch, tủy xương, não, dây thần kinh trung ương, ruột

kết, thực quản, mắt, túi mật, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, bạch cầu, tụy, tuyến cận giáp, dây thần kinh ngoại biên, màng bụng, tuyến yên, màng phổi, trực tràng, tuyến nước bọt, cơ vân, da, ruột non, lách, dạ dày, tuyến ức, tuyến giáp, khí quản, niệu quản, bàng quang, tĩnh mạch.

SEQ ID No	Trình tự	Các thực thể bổ sung
2	VLLDIFTGV	SCLC
8	SVMELLQGV	NSCLC, HNSCC
9	SLYPGTETM	PrC, u melanin
24	ILDAQTAFV	PrC, HNSCC
27	VLNPETTVV	SCLC
29	IGIGPVLNI	PC
30	TLLDRVAVI	CRC, NHL, HNSCC
39	ALDGKIYEL	HCC
47	GLVEQLYDL	HNSCC
50	TLSTVIATV	Bệnh ung thư não
53	VMHDSSFSV	Bệnh ung thư thực quản, HNSCC
54	TLSDVVVGL	Bệnh ung thư thực quản

NSCLC= bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, SCLC= bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, CRC= bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, HCC= bệnh ung thư gan, PC= bệnh ung thư tụy, PrC= bệnh ung thư tuyến tiền liệt, HNSCC (head and neck cancer) = bệnh ung thư vùng đầu và cổ

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 1, 2, 3, 8, 14, 29, 31, 36, 39, 40, 49, 51, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh HCC.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 1, 3, 6, 21, 23, 24, 28, 29, 31, 32, 36, 37, 45, 47, 52, 53, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh BRCA.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 2, 6, 10, 11, 20, 23, 27,

29, 35, 36, 40, 50, 53, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh ung thư não.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 2, 3, 6, 8, 9, 24, 35, 36, 40, 43, 49, 50, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh PrC.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 2, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 40, 42, 44, 47, 52, 53, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh AML.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 2, 6, 17, 29, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh OC.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 2, 3, 6, 7, 20, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 36, 40, 43, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh ung thư bàng quang.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 2, 3, 7, 8, 10, 23, 27, 35, 37, 40, 47, 49, và 53 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh SCLC.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 3, 6, 24, 30, 32, và 51 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh RCC.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 3, 6, 10, 20, 23, 24, 29, 30, 32, 37, 40, 44, 46, 47, 52, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh NHL.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 3, 6, 8, 9, 11, 23, 24, 27, 29, 32, 34, 37, 39, 40, 41, 42, 47, 50, 52, 53, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị u melanin.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 6, 23, 24, 29, 43, 47, 53, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh ung thư thực quản.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 6, 8, 24, 25, 40, và 53 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh NSCLC.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 6, 8, 9, 30, 34, 35, 40, 46, 53, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 8, 25, 30, 44, 47, 52, và 54 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh CLL.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 25, 30, 40, và 51 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh CRC.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 29, 35, và 45 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh PC.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID No. 8, 24, 30, và 53 – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - để điều trị bệnh HNSCC.

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 bệnh ung thư tử cung, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ống mật chủ, bệnh ung thư não, bệnh bạch cầu lymphô bào mạn tính (CLL), caxinom kết-trực tràng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tế bào gan (HCC), caxinom tế bào Merkel, u melanin, u lymphô không Hodgkin, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ (NSCLC), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ (SCLC) và bệnh ung thư bàng quang.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến 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 - ở dạng kéo dài, như biến thể theo chiều dài- MHC nhóm -II.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế 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: 54.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế, trong đó peptit này được cải biến và/hoặc bao gồm các liên kết không peptit.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế, 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 cập đến axit nucleic mã hóa các peptit theo sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic theo sáng chế là ADN, ADN bổ trợ, APN, ARN hoặc hỗn hợp của chúng.

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

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

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

Sáng chế còn đề cập đến các thụ thể tế bào T (TCR), cụ thể là thụ thể TCR hòa tan (sTCR) và các thụ thể 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 khác của việc sử dụng liệu pháp miễn dịch của peptit theo sáng chế sau đây.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế hoặc vector biểu hiện như được mô tả trên đây. Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ theo sáng chế là tế bào trình diện kháng nguyên, và tốt hơn nếu là tế bào đuôi gai.

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

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

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp theo sáng chế trong đó tế bào trình diện kháng nguyên chứa vector biểu hiện có khả năng biểu hiện hoặc biểu hiện peptit nêu trên có các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 54, tốt hơn là có các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 19, hoặc trình tự axit amin của biến thể.

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

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

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng peptit bất kỳ như được mô tả, axit nucleic theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, tế bào lymphô T hoạt hóa, thụ thể tế bào T hoặc kháng thể hoặc các phân tử gắn kết với peptit-MHC và/hoặc peptit khác theo sáng chế làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc. 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 hoặc trên cơ sở thụ thể TCR hòa tan hoặc kháng thể.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng theo sáng chế, trong đó các tế bào ung thư nêu trên là tế bào ung thư tử cung, tế bào bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), tế bào ung thư vú, ung thư ống mật chủ, ung thư não, tế bào bạch cầu lymphô bào mạn tính (CLL), caxinom kết-trực tràng, tế bào ung thư thực quản, ung thư túi mật, ung thư dạ dày, ung thư tế bào gan (HCC), caxinom tế bào Merkel, u melanin, u lymphô không Hodgkin, ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC), ung thư buồng trứng, ung thư tụy,

ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ (SCLC) và ung thư bàng quang, và tốt hơn nếu là tế bào ung thư tử cung.

Sáng chế còn đề cập đến các dấu ấn sinh học trên cơ sở peptit theo sáng chế, được gọi ở đây là “đích” có thể được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư, tốt hơn nếu là bệnh ung thư tử cung. Dấu ấn này có thể là sự biểu hiện quá mức của chính (các) peptit, hoặc sự biểu hiện quá mức của (các) gen tương ứng. Các dấu ấn này cũng có thể được sử dụng để dự đoán xác suất thành công của việc điều trị, tốt hơn nếu là liệu pháp miễn dịch, và được ưu tiên nhất là liệu pháp miễn dịch hướng cùn đích được xác định bằng dấu ấn sinh học này. Ví dụ, kháng thể hoặc thụ thể TCR hòa tan có thể được sử dụng để nhuộm các mẫu khối u để phát hiện sự có mặt của peptit quan tâm trong phức hợp với MHC.

Tùy ý, kháng thể có chức năng hiệu ứng khác như chứa miễn kích thích miễn dịch hoặc độc tố.

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

ABCC1 được điều hòa tăng bệnh ung thư vú nguyên phát, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư thực quản, bệnh bạch cầu và u nguyên bào thần kinh ở trẻ em (Cole et al., 1992; Burger et al., 1994; Norris et al., 1996; Nooter et al., 1997). Các nhà khoa học đã xác định được ABCC1 làm đích phiên mã trực tiếp của sự truyền tín hiệu Notch1 trong các biến thể kháng etoposide của dòng tế bào ung thư vú MCF7 (Cho et al., 2011). Một số tài liệu công bố đã chứng minh được rằng sự biểu hiện ABCC1 tăng lên trong các bệnh ung thư có liên quan với sự mất gen p53 chức năng (Fukushima et al., 1999; Sullivan et al., 2000).

Sự làm bất hoạt ATP2B4 có liên quan với sự ức chế mức độ chuyển dịch nhân NF kappa B cũng như sự kích thích gây chết tế bào của ABT-263 ở bệnh ung thư vú (Curry et al., 2012). Đã chứng minh được rằng mức độ biểu hiện ATPB4 tăng lên ở một số bệnh ung thư như bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư dạ dày và bệnh ung thư vú làm hoạt hóa con đường PI3K/AKT và MAPK (Hollander et al., 2016; Ribiczey et al., 2007; Aung et al., 2009; Varga et al., 2014; Ribiczey et al., 2015).

Đã chứng minh được rằng phức hợp SCF(FBXO44) biểu hiện E3 ubiquitin ligaza gây ra sự thoái biến BRCA1, điều này có thể góp phần vào sự phát triển khối u vú đơn phát (Lu et al., 2012).

Ở các tế bào ung thư dạ dày, một mặt, FBX06 có thể kích thích sự phát triển và sự tăng sinh, nhưng mặt khác lại ảnh hưởng tiêu cực đến sự chết tế bào theo chương trình và tính xâm lấn (Zhang et al., 2009a). FBX06 được xác định là chất trung gian có tác dụng điều hòa quá trình ubiquitin hóa và sự thoái biến của Chk1, kinase kiểm soát sự sao chép quan trọng (Merry et al., 2010). Nồng độ protein của Chk1 và FBX06 cho thấy mối tương quan ngược ở cả các tế bào ung thư được nuôi cấy và các mô khối u vú của người (Zhang et al., 2009b). FBX06 có thể đóng vai trò quan trọng trong sự tạo khối u của u nguyên bào thần kinh (Janoueix-Lerosey et al., 2004).

FRG1B đã được chứng minh là được đột biến trong các loại bệnh ung thư khác nhau (Kim et al., 2013). Locus 20q11.21 là một trong số các locus gen đích giả định trong bệnh bạch cầu dạng lympho cấp tính (An et al., 2009).

Để làm gen đích của ETV1, GLYATL2 đóng vai trò quan trọng trong sự tăng sinh, sự biệt hóa, sự di trú và sự xâm lấn của tế bào trong bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Rahim et al., 2014). hGLYAT, gen liên quan gần nhất, là ứng viên tốt của gen đánh dấu mới của bệnh caxinom tế bào gan (Matsuo et al., 2012).

HOXD10 được xác định là gen đích của miR-10b, gen này được điều hòa tăng trong bệnh ung thư dạ dày (gastric cancer: GC) và có thể có vai trò quyết định trong sinh bệnh học và sự phát triển của bệnh GC (Ma et al., 2015; Wang et al., 2015). HOXD10 đã được phát hiện là được điều hòa tăng trong bệnh caxinom tế bào vảy ở cổ và bệnh ung thư đường tiết niệu để kích thích sự tăng sinh và xâm lấn của tế bào và có thể là dấu ấn sinh học mới của bệnh caxinom ống tuyến vú xâm lấn (Sharpe et al., 2014; Vardhini et al., 2014; Heubach et al., 2015). Tuy nhiên, HOXD10 cũng có chức năng ức chế khối u trong caxinom tế bào ống mật bằng cách làm bất hoạt con đường RHOC/AKT/MAPK và làm ngừng chu trình tế bào pha G1 (Yang et al., 2015a). Đối với con đường truyền tín hiệu miR-224/HOXD10/p-PAK4/MMP-9, HOXD10 được cho là điều hòa sự di trú và xâm lấn của tế bào và tạo ra đích sinh học mới cho việc điều trị caxinom tế bào gan (Li et al., 2014).

Hiện tượng đa hình nucleotit đơn trong gen LIG3 làm thay đổi nguy cơ đối với các loại bệnh ung thư khác nhau bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư thực quản và bệnh ung thư tụy (Li et al., 2009; Corral et al., 2013; Hao et al., 2004; Landi et al., 2006). c-Myc đóng vai trò trong sự hoạt hóa phiên mã của LIG3, dẫn làm gia tăng mức độ sửa chữa dễ bị sai sót trong bệnh bạch cầu

(Muvarak et al., 2015).

PGR có liên quan chặt chẽ với sự khởi mào và tiến triển của bệnh ung thư vú, trong đó nó hoạt hóa các con đường MAPK và PI3K/AKT cũng như sự biểu hiện của thụ thể yếu tố sinh trưởng (Growth Factors Receptor: GFR) (Jaiswal et al., 2014; Piasecka et al., 2015). PGR (bên cạnh HER và thụ thể estrogen) có tác dụng làm yếu tố phân loại giúp phân biệt giữa ba kiểu phụ khác nhau của bệnh ung thư vú (Safarpour and Tavassoli, 2015).

Đã chứng minh được rằng PTPRG ức chế sự truyền tín hiệu Akt cùng với sự ức chế hữu hiệu đối với sự tạo khối u và di căn trong bệnh caxinom mũi-họng, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính và bệnh ung thư kết-trục tràng (Laczmanska and Sasiadek, 2011; Cheung et al., 2015). PTPRG có thể được sử dụng làm đích chẩn đoán và điều trị tiềm năng trong bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (Della et al., 2010). PTPRG có thể điều hòa tăng các protein p21(cip) và p27(kip) qua con đường ERK1/2 ức chế sự hình thành khối u vú (Shu et al., 2010).

Gen RNF145 nằm trên vùng nhiễm sắc thể được phát hiện là bất thường ở các bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (Mehrotra et al., 2014).

RNF180 dường như có tác dụng làm gen ức chế khối u để ức chế sự di căn hạch bạch huyết trong bệnh ung thư dạ dày nhờ tác dụng như E3 ubiquitin ligaza (Deng et al., 2014; Udali et al., 2015; Deng et al., 2016). RNF180 là dấu ấn sinh học tiềm năng trong lâm sàng của bệnh ung thư dạ dày (Cheung et al., 2012).

SEMA4C đã được phát hiện là đích của miR-125b và miR-138 và có thể dùng làm liệu pháp hóa trị ngược liên quan đến đích mới kháng lại bệnh ung thư vú và bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Yang et al., 2015b; Li et al., 2015). SEMA4C lại có thể gắn kết với Plexin-B2 gây ra động lực học bộ khung tế bào trên cơ sở actin, sự di trú xâm lấn và sự di căn bạch huyết trong u nguyên bào xộp, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày và bệnh ung thư trực tràng (Ye et al., 2012; Malik et al., 2014; Le et al., 2015). Đã chứng minh được rằng dạng hòa tan của SEMA4C được biểu hiện quá mức ở các bệnh nhân mắc bệnh ung thư vú và bệnh ung thư cổ tử cung kích thích sự tạo mạch bạch huyết, sự tăng sinh và sự di trú của các tế bào khối u bằng cách hoạt hóa sự truyền tín hiệu PlexinB2-MET (Gao et al., 2016). Phát hiện được các đột biến trong protein liên kết màng ở bệnh ung thư kết-trục tràng (Donnard et al., 2014).

SLC25A36 đã được phát hiện là biểu hiện quá mức trong bệnh ung thư cổ tử

cung (Wilting et al., 2008).

SLC35E1 đã được chứng minh là có liên quan với sự đáp ứng của caxinom trực tràng với liệu pháp hóa học-xạ trị hỗ trợ mới (Rimkus et al., 2008).

SVIL được điều hòa giảm đáng kể trong mô ung thư tuyến tiền liệt chủ yếu bằng cách methyl hóa gen khởi đầu (Vanaja et al., 2006). SVIL điều hòa sự sống của tế bào bằng cách kiểm soát nồng độ p53. Sự biểu hiện SVIL là cần thiết cho mối liên quan giữa con đường truyền tín hiệu sự sống và con đường tính linh động của tế bào (Fang and Luna, 2013).

TRIM5 được methyl hóa khác biệt trong caxinom tế bào vảy ở lưỡi-miệng và có thể được sử dụng để dự đoán một số thông số (Krishnan et al., 2016). TRIM5 liên quan đến con đường truyền tín hiệu WNT/Ca²⁺/NFAT bằng cách ức chế NFAT1 (Scholz et al., 2016). TRIM5 liên quan đến sự tự tiêu và hạn chế bệnh nhiễm virus HIV bằng cách điều hòa tăng chức năng kháng virus của tế bào T CD4⁺ (Richardson et al., 2014; Mandell et al., 2014a; Pawlica et al., 2015; Mandell et al., 2014b; Jain et al., 2015). JMJD3, histon demethylaza, điều hòa sự biểu hiện của TRIM5 và sự làm giảm hoạt tính gen của JMJD3 điều hòa tăng đáng kể sự biểu hiện TRIM5 trong các tế bào THP-1. cFLIP điều hòa tăng sự biểu hiện của TRIM5 (Tan et al., 2013; Das et al., 2013). TRIM5 liên quan đến bệnh ung thư vú (Srihari and Ragan, 2013). TRIM5 có hoạt tính kháng virus nhưng virus gây bệnh bạch cầu ở chuột dị hướng liên quan đến bệnh ung thư tuyến tiền liệt kháng lại sự giới hạn của nó. TRIM5 giới hạn virus gây bệnh bạch cầu ở chuột hướng N mà không phải virus gây bệnh bạch cầu ở chuột hướng B. Thể đột biến TRIM5 có thể giới hạn B-MLV (Diaz-Griffero et al., 2008; Metzger et al., 2010).

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

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

Ngoài ra, thuật ngữ “peptit” sẽ bao gồm các muối của dãy các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của các axit amin liền kề. Tốt hơn, nếu các muối này là muối được dùng của peptit, ví dụ như 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 dãy 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 liền kề. Không có giới hạn về chiều dài của oligopeptit theo sáng chế, miễn là một hoặc nhiều epitop

đúng được giữ nguyên ở đây. Các oligopeptit thường chứa ít hơn 30 gốc axit amin trong chiều dài mạch, và chứa nhiều hơn 15 axit amin trong chiều dài mạch.

Thuật ngữ “polypeptit” để chỉ dãy các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của các 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 “sinh miễn dịch” (và do đó là “chất sinh miễn dịch” trong phạm vi của sáng chế), nếu là chất có khả năng gây đáp ứng miễn dịch. Trong trường hợp của sáng chế, tính sinh miễn dịch được xác định cụ thể hơn là có khả năng gây ra đáp ứng của tế bào T. Do đó, thuật ngữ “chất sinh miễn dịch” sẽ là phân tử có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch, và trong trường hợp của sáng chế, phân tử có khả năng gây ra đáp ứng của tế bào T. Theo khía cạnh khác, chất sinh miễn dịch có thể là peptit, phức hợp của peptit với MHC, oligopeptit, và/hoặc protein được sử dụng để tạo ra kháng thể đặc hiệu hoặc các thụ thể TCR kháng lại nó.

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

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 của 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 5: 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 et al., 1997) sử dụng công thức Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$. Tổ hợp của A*02 hoặc A*24 với một số 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 (Chanock et al., 2004).

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%
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%
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 alen A*02. Vacxin cũng có thể chứa các peptit của MHC nhóm II gắn kết-pan. Do đó, vacxin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư ở các bệnh nhân có A*02 dương tính, trong khi không cần lựa chọn đối với alotyp của MHC nhóm II do tính chất liên kết-pan của các peptit này.

Nếu các peptit A*02 theo sáng chế được kết hợp với các peptit gắn kết với alen

khác, ví dụ A*24, 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 chứa các epitop HLA-A*24 và HLA-A*02 có thể điều trị cho ít nhất 60% bệnh nhân trong 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).

Theo một phương án được ưu tiên, thuật ngữ “trình tự nucleotit” để chỉ di 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 virut.

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

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

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

Vùng mã hóa có thể có nguồn gốc từ gen không đột biến (“gen bình thường”), gen được đột biến hoặc gen được biến đổi, hoặc thậm chí có thể có nguồn gốc từ trình tự ADN, hoặc gen, được tổng hợp hoàn toàn trong phòng thí nghiệm bằng cách sử

dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tổng hợp ADN đã biết.

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

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

Thuật ngữ “đoạn ADN” để chỉ polyme ADN, ở dạng đoạn riêng biệt hoặc làm thành phần của cấu trúc ADN lớn hơn, có nguồn gốc từ ADN phân lập được ít nhất một lần ở dạng gần như tinh khiết, nghĩa là không chứa các chất nội sinh và với lượng hoặc nồng độ cho phép xác định, thao tác, và thu hồi đoạn mạch và các trình tự nucleotit thành phần của nó bằng phương pháp hóa sinh chuẩn, ví dụ, bằng cách sử dụng 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 môi” để chỉ trình tự axit nucleic ngắn có thể được ghép cặp với một sợi ADN và tạo ra đầu 3'-OH tự do mà ở đó ADN polymeraza bắt đầu quá trình tổng hợp chuỗi deoxyribonucleotit.

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

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

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

Các axit nucleic và sản phẩm biểu hiện polypeptit được bộc lộ theo sáng chế, cũng như các vectơ biểu hiện chứa các axit nucleic và/hoặc polypeptit này, có thể ở “dạng được làm giàu”. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được làm giàu” có nghĩa là nồng độ của chất này ít nhất gấp khoảng 2, 5, 10, 100, hoặc 1000 lần nồng độ tự nhiên của nó (ví dụ), có lợi nếu lượng chất này bằng 0,01% trọng lượng, tốt hơn nếu ít nhất bằng khoảng 0,1% trọng lượng. Chế phẩm được làm giàu với lượng khoảng 0,5%, 1%, 5%, 10%, và 20% trọng lượng cũng được dự định. Có lợi nếu các trình tự, cấu trúc, vectơ, dòng vô tính, và các vật liệu khác theo sáng chế có thể ở dạng được làm giàu hoặc được phân lập. Thuật ngữ “đoạn mạch có hoạt tính” để chỉ đoạn mạch, thường là của trình tự peptit, polypeptit hoặc axit nucleic, để tạo ra đáp ứng miễn dịch (nghĩa là có hoạt tính sinh miễn dịch) khi được sử dụng, một mình hoặc tùy ý với tá được thích hợp hoặc trong vectơ, cho động vật, như động vật có vú, ví dụ, thỏ hoặc chuột, 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 phân, đoạn mạch hoặc đoạn của polypeptit ban đầu. Khi được sử dụng liên quan đến polynucleotit, các thuật ngữ này để chỉ các sản phẩm được tạo ra khi điều trị bằng các polynucleotit này cùng với endonucleaza bất kỳ.

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

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

trong đó C là số lượng sự khác biệt giữa trình tự tham chiếu và trình tự so sánh theo chiều dài dóng 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 dóng 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 dóng thẳng hàng trong trình tự tham chiếu là khác với bazơ hoặc axit amin được dóng thẳng hàng trong trình tự so sánh, tạo thành sự khác biệt và

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

và R là số lượng bazơ hoặc axit amin trong trình tự tham chiếu trong chiều dài khi dóng 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 dóng thẳng hàng giữa trình tự so sánh và trình tự tham chiếu mà tỷ lệ % độ đồng nhất như tính được trên đây là bằng hoặc cao hơn tỷ lệ % độ đồng nhất tối thiểu theo lý thuyết thì trình tự so sánh có tỷ lệ % độ đồng nhất tối thiểu theo lý thuyết với trình tự tham chiếu, mặc dù có thể có sự dóng thẳng hàng trong đó tỷ lệ % độ đồng nhất tính được như trên đây là nhỏ hơn tỷ lệ % độ đồng nhất theo lý thuyết.

Do đó, như đã nêu trên đây, sáng chế đề cập đến peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54 hoặc biến thể của nó có mức độ tương đồng 88% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54, 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 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 % độ đồng nhất trên đây) giữa các trình tự của hai trình tự axit amin, nghĩa là trình tự peptit hoặc trình tự polypeptit. Thuật ngữ “độ tương đồng” nêu trên được xác định bằng cách so sánh hai trình tự được 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 (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

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 bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54. 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 gắn kết của phân tử MHC thích hợp, như HLA-A*02 hoặc -DR, và theo cách sao cho nó ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng gắn kết với thụ thể TCR của các tế bào T hoạt hóa.

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 tài liệu khoa học và các cơ sở dữ liệu (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), 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 gắn 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: 54, 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 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 khác nhau, có thể chọn lọc, trong chuỗi peptit, nếu không được chỉ rõ theo cách khác. Tốt hơn, nếu sự thay thế các gốc này nằm ở đầu của chuỗi axit amin. Sự thay thế này có thể có tính chất bảo toàn, ví dụ, khi một axit amin được thay thế bằng axit amin có cấu trúc và đặc tính tương tự, như khi axit amin kỵ nước được thay thế bằng axit amin kỵ nước khác. Thậm chí sự thay thế axit amin có kích thước hoặc tính chất hóa học và kích thước giống nhau hoặc tương tự sẽ được bảo toàn hơn, như khi leuxin được thay thế bằng isoleuxin. Trong các nghiên cứu về sự thay đổi trình tự ở họ các protein đồng dạng có trong tự nhiên, sự thay thế axit amin nhất định thường được dung nạp hơn so với các loại khác, và sự thay thế này thường có tương quan với tính tương tự về kích thước, điện tích, tính phân cực, tính kỵ nước giữa axit amin gốc và sự thay thế của nó và đây là cơ sở cho việc xác định “sự thay thế bảo toàn”.

Sự thay thế bảo toàn ở đây được xác định là sự trao đổi trong một trong năm nhóm sau: Nhóm 1-các gốc nhỏ, béo, không phân cực hoặc phân cực không đáng kể (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Nhóm 2-các gốc phân cực, có điện tích âm và các amit của chúng (Asp, Asn, Glu, Gln); Nhóm 3-các gốc phân cực, có điện tích dương (His, Arg, Lys); Nhóm 4-các gốc lớn, béo, không phân cực (Met, Leu, Ile, Val, Cys); 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, các axit amin không chuẩn (nghĩa là không phải các axit amin tạo thành protein có trong tự nhiên thông thường) cũng có thể được sử dụng cho mục đích thay thế để tạo ra chất sinh miễn dịch và polypeptit gây miễn dịch theo sáng chế.

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

Peptit 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.

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 các 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.

Bảng 6: Các biến thể và motif của peptit theo các trình tự SEQ ID NO: 1, 3, và

9

Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 1	K	L	L	D	N	L	H	D	L
Biến thể									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 3	G	L	D	G	A	T	Y	T	V
Biến thể									I
									L
									A
		M							
		M							I

		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 9	S	L	Y	P	G	T	E	T	M
Biến thể									V
									I
									L
									A
		M							V
		M							I
		M							L
		M							A
		A							V
		A							I
		A							L
		A							A
		V							V

		V						I
		V						L
		V						A
		T						V
		T						I
		T						L
		T						A
		Q						V
		Q						I
		Q						L
		Q						A

Các peptit dài hơn (được kéo dài) 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.

Các peptit theo sáng chế có thể được 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 tìm thấy trong Bảng 7.

Bảng 7: Tổ hợp của việc kéo dài peptit theo sáng chế

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
4	0
3	0 hoặc 1
2	0 hoặc 1 hoặc 2

Đầu tận cùng C	Đầu tận cùng N
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.

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.

Theo phương án khác, peptit được kéo dài trên một hoặc cả hai phía bởi nhiều hơn 4 axit amin, tốt hơn là có tổng chiều dài lên đến 30 axit amin. Peptit này có thể tạo ra các peptit gắn kết với MHC nhóm II. Sự gắn kết với MHC nhóm II có thể được thử nghiệm bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Theo đó, sáng chế đề cập đến 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 gắn 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.

Tốt hơn, nếu khi các tế bào T đặc hiệu với peptit theo sáng chế 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 1 μ M, 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 đã thể được nhận biết bởi các tế bào T từ nhiều hơn một đối tượng, ít nhất là hai, và tốt hơn nữa là ba đối

tượng.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế, peptit bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54.

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: 54 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 “li” 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) (Meziere et al., 1997), tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. 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 (Meziere et al., 1997) cho thấy rằng sự gắn kết với MHC và các đáp ứng của tế bào T hỗ trợ, các chất giả peptit này 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 amino 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 amino của peptit. Tương tự, nhóm axetyl hoặc nhóm 9-florenylmethoxy-carbonyl có thể được thay thế ở đầu tận cùng amino 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, 2004 (Lundblad, 2004), tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. 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 maleimit, carboxymetyl hóa bằng axit iodoaxetic hoặc iodoaxetamit 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) (Coligan et al., 1995) 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 vixinal dicarbonyl như phenylglyoxal, 2,3-butanedion, và 1,2-xyclohexandion 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'-etylcarbodiimit có thể được sử dụng để tạo ra các liên kết ngang nội phân tử giữa gốc lysin và gốc axit glutamic. Ví dụ, diethylpyrocacbonat 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, iodoaxetamit, bromoetylamin, và cloamin T.

Tetranitrometan và N-axetylimidazol có thể được sử dụng để cải biến các gốc tyrosyl. Sự tạo liên kết ngang bằng cách tạo ra dityrosin có thể được thực hiện với các ion hydro peroxit/đồng.

Các nghiên cứu gần đây đối với sự cải biến tryptophan đã sử dụng N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromua hoặc 3-bromo-3-methyl-2-(2-nitrophenylmercapto)-3H-indol (BPNS-skatol).

Sự cải biến thành công 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.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến peptit không có trong tự nhiên, trong đó peptit này bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo trình tự từ SEQ ID No: 1 đến SEQ ID No: 54 và được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp (ví dụ, được tổng hợp) dưới dạng muối được dụng. Các phương pháp sản xuất peptit tổng hợp là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các muối của peptit theo sáng chế khác biệt về cơ bản với peptit ở (các) trạng thái *in vivo* của chúng, như peptit được tạo ra *in vivo* không là muối. Dạng muối không có trong tự nhiên của peptit điều chỉnh độ tan của peptit này, cụ thể là trong trường hợp các dược phẩm chứa peptit, ví dụ, vắc xin peptit như được bộc lộ ở đây. Độ tan đủ và ít nhất là đáng kể của (các) peptit là cần thiết để cung cấp peptit hữu hiệu cho đối tượng cần điều trị. Tốt hơn, nếu các muối này là muối được dụng của peptit. Các muối theo sáng chế này bao gồm các muối kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ như các muối của dãy Hofmeister bao gồm các anion PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- và các cation NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} và Ba^{2+} . Các muối cụ thể được chọn từ $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$,

MgCl₂, MgBr₂, Mg(NO₃)₂, Mg(ClO₄)₂, MgI₂, Mg(SCN)₂, MnCl₂, Ca₃(PO₄)₂, Ca₂HPO₄, Ca(H₂PO₄)₂, CaSO₄, Ca(CH₃COO)₂, CaCl₂, CaBr₂, Ca(NO₃)₂, Ca(ClO₄)₂, CaI₂, Ca(SCN)₂, Ba₃(PO₄)₂, Ba₂HPO₄, Ba(H₂PO₄)₂, BaSO₄, Ba(CH₃COO)₂, BaCl₂, BaBr₂, Ba(NO₃)₂, Ba(ClO₄)₂, BaI₂, và Ba(SCN)₂. Được đặc biệt ưu tiên là các muối NH axetat, MgCl₂, KH₂PO₄, Na₂SO₄, KCl, NaCl, và CaCl₂, ví dụ như muối clorua hoặc axetat (trifloaxetat).

Nói chung, các peptit và biến thể (ít nhất 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 (Lukas et al., 1981) 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 cystein) và dẫn xuất 4-methoxy-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'-dimethoxybenzhydryl 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 acryloylsarcosin 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-dicyclohexyl-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 nhanh 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 bất kỳ, 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.

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 biểu hiện quá mức bằng cách tính giá trị p của mô hình hiệu quả hỗn hợp tuyến tính (Pinheiro et al., 2015) điều chỉnh cho nhiều thử nghiệm bằng tỷ lệ phát hiện sai (Benjamini and Hochberg, 1995) (xem Ví dụ 1, Fig.1).

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 trình tự peptit tạo thành được kiểm tra bằng cách so sánh mẫu phân mảnh của các peptit liên quan đến khối u (TUMAP) tự nhiên ghi được từ các mẫu bệnh ung thư tử cung (N = 15 mẫu dương tính với A*02) 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 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 15 bệnh nhân ung thư tử cung.

Thiết bị phát hiện XPRESIDENT® v2.1 (ví dụ, xem công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2013-0096016, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó) 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 bệnh ung thư tử cung 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 bệnh ung thư tử cung nguyên phát đều khẳng định sự trình diện của chúng trên bệnh ung thư tử cung nguyên phát.

Các peptit TUMAP được xác định trên nhiều mô bệnh ung thư tử cung và mô bình thường được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp đếm ion theo các dữ liệu LC-MS không đánh dấu. Phương pháp này giả định rằng các vùng 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 đóng thẳng hàng thời gian duy trì và chuẩn hóa.

Bên cạnh sự trình diện quá mức của peptit, sự biểu hiện mRNA của gen cơ sở được thử nghiệm. Thu được dữ liệu mRNA bằng cách phân tích RNASeq mô bình thường và mô ung thư (xem Ví dụ 2, Fig.2). Nguồn bổ sung của dữ liệu về mô bình thường là cơ sở dữ liệu dựa trên dữ liệu về sự biểu hiện ARN có sẵn công khai của khoảng 3000 mẫu mô bình thường (Lonsdale, 2013). Tốt hơn, nếu các peptit có nguồn gốc từ protein có sự mã hóa mRNA được biểu hiện ở mức cao trong mô ung thư, nhưng biểu hiện ở mức thấp hoặc không biểu hiện trong mô bình thường quan trọng, được đưa vào theo sáng chế.

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

Nhiều 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 đã được chứng minh là biểu hiện ở mức quá cao ở bệnh ung thư so với các mô bình thường – thuật ngữ “mô bình thường” liên quan đến sáng chế này sẽ có nghĩa là các tế bào tử cung khỏe mạnh hoặc các tế bào của 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 quá mức trên mô khối u – thuật ngữ “mô khối u” liên quan đến sáng chế này sẽ có nghĩa là mẫu lấy từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư tử cung mà không biểu hiện 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 ung thư tử cung 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, như thụ thể TCR hòa tan theo sáng chế (xem Ví dụ 3, Ví dụ 4). 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 mà 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 này) 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.

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

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

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

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp trong đó kháng nguyên được tải lên các phân tử của MHC nhóm I hoặc II được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp hoặc tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo

bằng cách cho kháng nguyên với lượng đủ tiếp xúc với tế bào trình diện kháng nguyên hoặc kháng nguyên này được tải lên của MHC nhóm I hoặc II bằng cách tetrame hóa các monome phức hợp kháng nguyên/MHC nhóm I hoặc II này.

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

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

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

Khi được sử dụng ở đây liên quan đến các thụ thể TCR theo sáng chế, thuật ngữ "sự gắn kết đặc hiệu" và các biến thể ngữ pháp của chúng được sử dụng để chỉ thụ thể TCR có ái lực gắn kết (KD) đối với phức hợp peptit - phân tử HLA bằng

100 μ M hoặc nhỏ hơn.

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

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

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

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

Theo một phương án, thụ thể TCR chứa ít nhất một đột biến trong chuỗi alpha của thụ thể TCR và/hoặc chuỗi beta của thụ thể TCR có ái lực gắn kết với, và/hoặc chu kỳ bán hủy của sự gắn kết với, phức hợp peptit - phân tử HLA, ít nhất là gấp đôi so với thụ thể TCR chứa chuỗi alpha của thụ thể TCR không được đột biến và/hoặc chuỗi beta của thụ thể TCR không được đột biến. Việc làm tăng ái lực của các thụ thể TCR đặc hiệu khối u, và sự khai thác nó, dựa vào sự tồn tại của khung ái lực của TCR tối ưu. Sự tồn tại của khung này dựa trên việc quan sát được rằng các thụ thể TCR đặc hiệu với tác nhân gây bệnh giới hạn bởi HLA-A2 có giá trị KD thường thấp hơn khoảng 10 lần so với các thụ thể TCR đặc hiệu với kháng nguyên bản thân liên quan đến khối u được giới hạn bởi HLA-A2. Hiện nay, đã biết rằng mặc dù các kháng nguyên khối u có khả năng gây miễn dịch, do các khối u sinh ra các tế bào của chính

đối tượng chỉ đột biến một hoặc nhiều protein bằng cách xử lý dịch mã biến đổi sẽ được hệ miễn dịch coi là kháng nguyên ngoại lai. Các kháng nguyên được điều hòa tăng hoặc được biểu hiện quá mức (còn được gọi là kháng nguyên bản thân) sẽ không nhất thiết gây ra đáp ứng miễn dịch chức năng kháng u: các tế bào T biểu hiện thụ thể TCR có khả năng phản ứng ở mức cao với các kháng nguyên này sẽ không được chọn trong tuyển ức trong quá trình được gọi là dung nạp trung tâm, nghĩa là chỉ còn lại các tế bào T với thụ thể TCR có ái lực thấp đối với kháng nguyên bản thân. Do đó, ái lực của các thụ thể TCR hoặc các biến thể của phân tử này với peptit có thể được tăng lên bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này.

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

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

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

Theo khía cạnh khác, để thu được các tế bào T biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế, ARN của thụ thể TCR được phân tích bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, các hệ phiên mã *in vitro*. Sau đó, ARN của thụ thể TCR tổng hợp được *in*

vitro này được đưa vào các tế bào T CD8+ sơ cấp được lấy từ người cho khỏe mạnh bằng cách gây xung điện để biểu hiện lại chuỗi alpha-TCR và/hoặc chuỗi beta-TCR đặc hiệu khối u.

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

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

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

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

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

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

Để làm giảm mức độ bắt cặp sai, vùng đầu tận cùng C của các chuỗi TCR theo sáng chế được đưa vào có thể được cải biến để kích thích ái lực giữa các chuỗi, trong khi làm giảm khả năng bắt cặp với TCR nội sinh của các chuỗi được đưa vào. Chiến lược này có thể tạo ra sự thay thế các vùng ở đầu tận cùng C của chuỗi TCR-alpha và TCR-beta của người bằng các vùng tương ứng của chuột của chúng (vùng ở đầu tận cùng C của chuột); tạo ra liên kết disulfua thứ hai giữa các chuỗi trong vùng ở đầu tận cùng C bằng cách đưa gốc xystein thứ hai vào cả chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR của thụ thể TCR được đưa vào (sự cải biến xystein); trao đổi các gốc tương tác trong các vùng ở đầu tận cùng C của chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR (phương pháp “chỗ phình vào chỗ lõm” “knob-in-hole”); và dung hợp các vùng biến đổi của chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR trực tiếp với CD3ζ (thể dung hợp CD3ζ) (Schmitt et al., 2009).

Theo một phương án, tế bào chủ được thiết kế để biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế. Theo các phương án được ưu tiên, tế bào chủ là tế bào T hoặc tổ tiên của tế bào T của người. Theo một số phương án, tế bào T hoặc tổ tiên của tế bào T thu được từ bệnh nhân ung thư. Theo các phương án khác, tế bào T hoặc tổ tiên của tế bào T thu được từ người cho khỏe mạnh. Tế bào chủ theo sáng chế có thể là tế bào khác loại hoặc tế bào tự thân đối với bệnh nhân cần điều trị. Theo một phương án, vật chủ là tế

bào T gama/delta được biến nạp để biểu hiện thụ thể TCR alpha/beta.

“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 etan 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).

Tốt hơn, nếu thuốc theo sáng chế là liệu pháp miễn dịch như 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 interleukin-2. Peptit có thể gần như tinh khiết, hoặc được kết hợp với tá dược 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 hemocyanin hà (keyhole limpet haemocyanin: KLH) hoặc manan (ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO 95/18145 và tài liệu: Longenecker et al., 1993). Peptit cũng có thể được hưởng 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, vacxin 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. 54, 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 TAA đặc hiệu và có thể gắn kết với các phân tử của MHC nhóm I.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến 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 cập đến vector biểu hiện có khả năng biểu hiện polypeptit theo sáng chế.

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

Các nhóm liên kết tổng hợp chứa một hoặc nhiều vị trí giới hạn tạo ra phương pháp thay thế để nối đoạn ADN với các vector. Các nhóm liên kết tổng hợp chứa nhiều

vị trí endonucleaza giới hạn được bán trên thị trường từ nhiều nguồn bao gồm cả từ công ty International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, Mỹ.

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

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 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 nucleotit đối chứng điều hòa phiên mã và dịch mã thích hợp được nhận biết bởi vật chủ mong muốn, mặc dù các đối chứng này thường có mặt trong vector biểu hiện. Sau đó, vector được đưa vào vật chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Nói chung, không phải tất cả các chủ sẽ được biến nạp bởi vector. Do đó, sẽ cần chọn lọc các tế bào chủ được biến nạp. Một kỹ thuật chọn lọc bao gồm bước đưa trình tự ADN vào vector biểu hiện, với các thành phần đối chứng cần thiết bất kỳ, để mã hóa tính trạng có thể chọn lọc ở tế bào được biến nạp, như sự kháng thuốc kháng sinh.

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

Sau đó, các tế bào chủ đã được biến nạp 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 buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO), có thể mua được từ Bảo tàng ATCC Cell Biology Collection.

Vector plasmit của tế bào động vật có vú điển hình để biểu hiện cấu trúc chứa gen khởi đầu CMV hoặc SV40 có đuôi poly A thích hợp và gen đánh dấu sự kháng thuốc như neomycin. Một ví dụ là pSVL có thể mua được từ công ty Pharmacia, Piscataway, NJ, Mỹ. Một ví dụ về vector biểu hiện của động vật có vú chịu cảm ứng là pMSG, cũng có thể mua được từ Pharmacia. Các vector plasmit của nấm men hữu ích là pRS403-406 và pRS413-416 và thường có thể mua được từ công ty Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, Mỹ. Các plasmit pRS403, pRS404, pRS405 và pRS406 là plasmit hợp nhất của nấm men (Yeast Integrating plasmid: YIp) và kết hợp vào các gen đánh dấu có thể chọn lọc của nấm men HIS3, TRP1, LEU2 và URA3. Các plasmit pRS413-416 là plasmit đoạn trung tâm của nấm men (Yeast Centromere plasmid: Ycp). Các vector trên cơ sở gen khởi đầu CMV (ví dụ, sản phẩm của Sigma-Aldrich) tạo ra sự biểu hiện ổn định hoặc chuyển tiếp, sự biểu hiện hoặc sự tiết trong bào chất, sự hướng đích ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C ở các hỗn hợp khác nhau của FLAG, 3xFLAG, c-myc hoặc MAT. Các protein dung hợp này cho phép phát hiện, tinh chế và phân tích protein tái tổ hợp. Các sản phẩm dung hợp hướng đích kép tạo ra tính linh hoạt khi phát hiện.

Vùng điều hòa gen khởi đầu của virus cự bào ở người (human cytomegalovirus: CMV) có hoạt tính mạnh điều chỉnh mức độ biểu hiện của protein cơ định cao tới 1 mg/lít ở các tế bào COS. Đối với các dòng tế bào có hoạt tính kém hơn, mức protein thường là ~0,1 mg/l. Sự có mặt của nguồn gốc sao chép SV40 sẽ làm cho mức độ sao

chép ADN vào các tế bào COS cho phép sao chép SV40. Ví dụ, các vector CMV có thể chứa nguồn gốc để sao chép pMB1 (dẫn xuất của pBR322) ở các tế bào vi khuẩn, gen b-lactamaza để chọn sự kháng ampicilin ở vi khuẩn, polyA của hGH, và nguồn gốc fl. Các vector chứa trình tự dẫn đầu pre-pro-trypsin (PPT) có thể định hướng sự tiết ra của protein dung hợp FLAG vào môi trường nuôi cấy để tinh chế bằng cách sử dụng kháng thể ANTI-FLAG, nhựa và bản kính. Các vector và hệ biểu hiện khác là đã được biết rõ trong lĩnh vực này để sử dụng với nhiều loại tế bào chủ khác nhau.

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

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ được biến nạp với cấu trúc của vector polynucleotit theo sáng chế. Tế bào chủ này có thể là tế bào không nhân hoặc 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 được ưu tiên bao gồm tế bào nấm men, tế bào côn trùng và tế bào động vật có vú, tốt hơn nếu là các tế bào của động vật có xương sống như các tế bào từ chuột nhắt, chuột, khỉ hoặc người và các dòng tế bào nguyên bào sợi và tế bào ruột kết. Các tế bào chủ của nấm men bao gồm YPH499, YPH500 và YPH501, thường 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 khỉ có thể mua được từ Bảo tàng ATCC dưới dạng CRL 1650 và các tế bào 293 là tế bào phôi thận của người. Các tế bào côn trùng được ưu tiên là tế bào Sf9 mà có thể được chuyển nhiễm với vector biểu hiện baculovirus. Tổng

quan về sự lựa chọn các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện có thể được tìm thấy trong các tài liệu, ví dụ, the textbook of Paulina Balbás and Argelia Lorence “Methods in Molecular Biology Recombinant Expression, Reviews and Protocols,” Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, và tài liệu khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Sự biến nạp của các tế bào chủ thích hợp với cấu trúc ADN của sáng chế được thực hiện bằng các phương pháp đã được biết rõ, các phương pháp này thường phụ thuộc vào loại vectơ được sử dụng. Liên quan đến sự biến nạp của tế bào chủ không nhân, ví dụ, xem tài liệu của Cohen và các đồng tác giả (Cohen et al., 1972) và (Green and Sambrook, 2012). Sự biến nạp của các tế bào nấm men được mô tả trong tài liệu của Sherman và các đồng tác giả (Sherman et al., 1986). Các phương pháp trong tài liệu của Beggs (Beggs, 1978) cũng hữu ích. Liên quan đến các tế bào của động vật có xương sống, các chất phản ứng hữu ích trong việc chuyển nhiễm các tế bào này, ví dụ, sản phẩm canxi phosphat và DEAE-dextran hoặc liposom, có thể mua được từ công ty Stratagene Cloning Systems, hoặc Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, Mỹ. Phương pháp 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 một phương án được ưu tiên, tế bào chủ là tế bào trình diện kháng nguyên, cụ thể là tế bào đuôi gai hoặc tế bào trình diện kháng nguyên. APC được tải protein dung hợp tái tổ hợp chứa phosphatase axit tuyến tiền liệt (prostatic acid

phosphatase: PAP) đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (FDA) phê chuẩn ngày 29 tháng 4 năm 2010, để điều trị HRPC di căn không có triệu chứng hoặc có triệu chứng không đáng kể (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

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

Theo phương án khác, 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 nằm trong khoảng từ 50µg đến 1,5mg, tốt hơn là từ 125µg đến 500µg có thể được cho trước và sẽ phụ thuộc vào peptit hoặc ADN tương ứng. Các liều dùng nằm trong khoảng này đã được sử dụng thành công trong các thử nghiệm trước đó (Walter et al., 2012).

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

Thuốc theo sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều chất phụ trợ. Các

chất phụ trợ là chất làm gia tăng hoặc có khả năng gây đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (ví dụ, các đáp ứng miễn dịch trung gian bởi các tế bào T dương tính với CD8 và tế bào T hỗ trợ (TH) với kháng nguyên, và do đó sẽ được cho là hữu ích trong thuốc theo sáng chế. Các chất phụ trợ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1018 ISS, các muối nhôm, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelin hoặc các phối tử TLR5 có nguồn gốc từ flagelin, phối tử FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, các intolokin như IL-2, IL-13, IL-21, interferon-alpha hoặc -beta, hoặc các dẫn xuất được pegyl hóa của chúng, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, monophosphoryl lipid A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, nhũ tương nước trong dầu và nhũ tương dầu trong nước, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, hệ vector PepTel®, các vi hạt trên cơ sở poly(lactit co-glycolit) [PLG] và dextran, talactoferin SRL172, Virosom và các hạt tương tự virus khác, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucan, Pam3Cys, Aquila's QS21 stimulon, sản phẩm này có nguồn gốc từ saponin, chất chiết từ vi khuẩn *mycobacterium* và chất tương tự thành tế bào của vi khuẩn tổng hợp, và các chất phụ trợ độc quyền khác như Ribi's Detox, Quil, hoặc Superfos. Các chất phụ trợ như tá dược Freund hoặc GM-CSF là được ưu tiên. Một vài chất phụ trợ miễn dịch (ví dụ, MF59) đặc hiệu với tế bào đuôi gai và phương pháp điều chế chúng đã được mô tả trước đây (Allison and Krummel, 1995). Các xytokin cũng có thể được sử dụng. Một vài xytokin đã được liên kết trực tiếp để tác động đến sự di trú của tế bào đuôi gai đến các mô bạch huyết (ví dụ, TNF-), thúc đẩy sự trưởng thành của tế bào đuôi gai thành tế bào trình diện kháng nguyên hữu hiệu đối với các tế bào lympho T (ví dụ, GM-CSF, IL-1 và IL-4) (Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.849.589, tài liệu này được viện dẫn cụ thể ở đây toàn bộ nội dung của nó) và có tác dụng làm chất phụ trợ miễn dịch (ví dụ, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alpha, IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

Các oligonucleotit kích thích miễn dịch CpG cũng đã được thông báo là làm gia tăng hiệu của chất phụ trợ trong lĩnh vực vacxin. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, các oligonucleotit CpG có tác dụng bằng cách hoạt hóa hệ miễn dịch bẩm sinh (không thích ứng) nhờ các thụ thể giống Toll (Toll-like receptor: TLR), chủ yếu là TLR9. Sự hoạt hóa TLR9 được khơi mào bởi CpG làm gia tăng mức độ đáp ứng thể

dịch và trong tế bào đặc hiệu kháng nguyên với khoảng rộng các kháng nguyên, bao gồm các kháng nguyên peptit hoặc protein, virus còn sống hoặc đã chết, vaccin chứa tế bào đuôi gai, vaccin chứa tế bào tự thân và các thể liên hợp polysacarit trong cả vaccin phòng bệnh và vaccin điều trị bệnh. Quan trọng hơn là nó làm gia tăng sự trưởng thành và biệt hóa của tế bào đuôi gai, điều này dẫn đến sự hoạt hóa tế bào TH1 gia tăng và sự tạo ra tế bào lymphô T (CTL) gây độc tế bào mạnh, ngay cả khi không có mặt tế bào T hỗ trợ CD4. Khuynh hướng TH1 được tạo bởi sự kích thích TLR9 được duy trì ngay cả khi có mặt các chất phụ trợ của vaccin như phèn hoặc tá dược Freund không toàn vẹn (incomplete Freund's adjuvant: IFA) thường kích thích khuynh hướng TH2. Các oligonucleotit CpG có hoạt tính của chất phụ trợ lớn hơn rất nhiều khi được bào chế hoặc sử dụng đồng thời với các chất phụ trợ khác hoặc trong các dạng sản phẩm như vi hạt, hạt nano, nhũ tương lipid hoặc dạng tương tự, chúng đặc biệt cần thiết để gây đáp ứng mạnh khi kháng nguyên có hoạt tính tương đối yếu. Chúng còn kích thích đáp ứng miễn dịch và cho phép các liều kháng nguyên được giảm đi khoảng hai lần, với mức độ đáp ứng của kháng thể tương đương với vaccin đủ liều mà không chứa CpG trong một số thử nghiệm (Krieg, 2006). Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.406.705 B1 mô tả việc sử dụng kết hợp các oligonucleotit CpG, chất phụ trợ không phải axit nucleic và kháng nguyên để gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên. Chất đối kháng TLR9 của CpG là chất điều biến miễn dịch vòng thân kép (double Stem Loop Immunomodulator: dSLIM), sản phẩm của Mologen (Berlin, Đức) là thành phần được ưu tiên của dược phẩm theo sáng chế. Các phân tử gắn kết thụ thể TLR khác như TLR 7, TLR 8 và/hoặc TLR 9 gắn kết với ARN cũng có thể được sử dụng.

Ví dụ khác về các chất phụ trợ hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CpG được cải biến bằng phương pháp hóa học (ví dụ, CpR, Idera), chất tương tự ARN sợi kép như Poly(I:C) và dẫn xuất của nó (ví dụ AmpliGen®, Hiltonol®, poly-(ICLC), poly(IC-R), poly(I:C12U), ADN hoặc ARN của vi khuẩn không chứa CpG cũng như các phân tử nhỏ và kháng thể có hoạt tính miễn dịch như xyclophosphamit, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomide, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, chất kháng CTLA4, các cấu trúc quan trọng hướng đích kháng thể khác của hệ miễn dịch (ví dụ, thụ thể kháng CD40, kháng TGF beta, kháng TNF alpha) và

SC58175, chúng có thể có tác dụng khi điều trị và/hoặc làm chất phụ trợ. Lượng và nồng độ của các chất phụ trợ và chất phụ gia hữu ích trong ngữ cảnh của sáng chế có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này xác định dễ dàng mà không cần thử nghiệm quá mức.

Các chất phụ trợ được ưu tiên là chất kháng CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, xyclophosphamit, 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), xyclophosphamit, 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), xyclophosphamit, 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 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 (Kibbe, 2000). Dược phẩm này có thể được sử dụng để ngăn ngừa, phòng và/hoặc điều trị các bệnh u tuyến hoặc bệnh ung thư. Các dạng dược phẩm làm ví dụ có thể được tìm thấy, ví dụ, trong Bảng độc quyền sáng chế

châu Âu số EP2112253.

Điều quan trọng cần thực hiện là đáp ứng miễn dịch được kích thích bằng vaccin 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 vaccin 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 theo cách sao cho mỗi khối u 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. Do đó, vaccin “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 vaccin 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).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khung" để chỉ phân tử gắn kết đặc hiệu với yếu tố xác định (ví dụ, kháng nguyên). Theo một phương án, khung có thể định hướng thực thể mà nó được gắn kết với (ví dụ, gốc gắn kết kháng nguyên (thứ hai)) với vị trí đích, ví dụ, với loại tế bào khối u hoặc mô đỡ khối u đặc hiệu mang yếu tố xác định kháng nguyên (ví dụ, phức hợp của peptit với MHC, theo ứng dụng này). Theo phương án khác, khung có thể hoạt hóa sự truyền hiệu qua kháng nguyên đích của nó, ví dụ, kháng nguyên của phức hợp thụ thể tế bào T. Khung bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể và đoạn kháng thể, vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, gắn kết các protein chứa ít nhất một motif lặp lại ankyrin và các phân tử gắn kết kháng nguyên vùng đơn (single domain antigen binding: SDAB), aptame, thụ thể TCR (hòa tan) và các tế bào (được cải biến) như tế bào T khác alen cùng loài hoặc tế bào T tự thân. Để đánh giá xem phân tử có là khung gắn kết với đích hay không, các thử nghiệm gắn kết được thực hiện.

Thuật ngữ gắn kết “đặc hiệu” có nghĩa là khung gắn kết với phức hợp peptit-

MHC quan tâm là tốt hơn các phức hợp peptit-MHC có trong tự nhiên khác đến mức sao cho khung được gắn kết với phân tử có hoạt tính có thể tiêu diệt tế bào mang đích cụ thể mà không thể tiêu diệt tế bào khác mà không có đích cụ thể nhưng trình diện (các) phức hợp peptit-MHC khác. Sự gắn kết với các phức hợp peptit-MHC khác là không thích hợp nếu peptit của peptit-MHC có khả năng phản ứng chéo này là loại không có trong tự nhiên, nghĩa là không có nguồn gốc từ HLA-peptit- hệ gen của người. Các thử nghiệm để đánh giá sự tiêu diệt tế bào đích là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm này cần được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào đích (các tế bào sơ cấp hoặc dòng tế bào) với sự trình diện peptit-MHC không thay đổi, hoặc các tế bào tải peptit sao cho mức peptit-MHC có trong tự nhiên đạt được.

Mỗi khung có thể có sự đánh dấu để tạo ra khung gắn kết có thể được phát hiện bằng cách xác định sự có mặt hoặc không có mặt của tín hiệu được tạo ra bởi nguyên tử đánh dấu. Ví dụ, khung này có thể được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc phân tử gen đánh dấu tế bào thích hợp khác bất kỳ. Các phân tử gen đánh dấu này là được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, nguyên tử đánh dấu huỳnh quang, ví dụ, được tạo ra bởi thuốc nhuộm phát huỳnh quang, có thể tạo ra hình ảnh của aptame đã gắn kết nhờ sự phát huỳnh quang hoặc phương pháp hiển vi quét bằng laze hoặc đếm tế bào theo dòng chảy.

Mỗi khung có thể được liên hợp với phân tử có hoạt tính thứ hai, ví dụ như phân tử IL-21, phân tử kháng CD3, và phân tử kháng CD28.

Thông tin thêm về các khung polypeptit xem trong, ví dụ, phần mô tả của công bố đơn quốc tế số WO 2014/071978A1, và các tài liệu tham khảo được nêu ở đây.

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

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

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

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

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

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

Aptame có thể được lựa chọn đối với các đích phức hợp như các tế bào và mô và phức hợp peptit chứa, tốt hơn là bao gồm, trình tự theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54, theo sáng chế sau đây với phân tử MHC, bằng cách sử dụng kỹ thuật tiến hóa theo hệ thống của phối tử bằng cách làm giàu lũy tiến (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment: SELEX)-tế bào.

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) nhóm I hoặc II của người 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 của 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 của người nêu trên được tạo phức với kháng nguyên giới hạn bởi HLA nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc II của 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.

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 tài liệu công bố (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003), nhằm mục đích của sáng chế, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Tốt hơn, nếu kháng thể này gắn kết với phức hợp, 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.

Sáng chế đề cập đến peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54, hoặc biến thể của nó có độ tương đồng (tốt hơn là mức độ giống) về trình tự ít nhất là 88% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54 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 sở có chiều dài đầy đủ.

Sáng chế còn đề cập đến peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54 hoặc biến thể của nó có độ tương đồng (tốt hơn là mức độ giống) về trình tự ít nhất là 88% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1

đến SEQ ID NO: 54, 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 cập đến các peptit theo sáng chế có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm-I hoặc nhóm -II của người.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế 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: 54.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế, 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 cập đến các peptit theo sáng chế, 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 cập đến axit nucleic mã hóa các peptit theo sáng chế, với điều kiện là peptit này không là protein hoàn toàn (đầy đủ) của người.

Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic theo sáng chế, axit này là ADN, ADN bổ trợ, APN, ARN hoặc hỗn hợp của chúng.

Sáng chế còn đề cập đến vector biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến peptit theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế hoặc vector biểu hiện theo sáng chế để dùng làm thuốc, cụ thể là để điều trị bệnh ung thư tử cung.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế hoặc vector biểu hiện theo sáng chế.

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

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

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp theo sáng chế, 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 cập đến phương pháp theo sáng chế, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên chứa vector 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: 54 hoặc trình tự axit amin của biến thể của nó.

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

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

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

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng theo sáng chế, trong đó thuốc này là vaccin. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng theo sáng chế, trong đó thuốc này có hoạt tính chống ung thư.

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

Sáng chế còn đề cập đến các protein của gen đánh dấu và dấu ấn sinh học cụ thể trên cơ sở các peptit theo sáng chế, được gọi ở đây là “đích” có thể được sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc tiên lượng bệnh ung thư tử cung. 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”, các đoạn kháng thể (ví dụ, các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR), đoạn Fv, đoạn Fab và đoạn Fc) hoặc các polyme của các phân tử globulin miễn dịch này và các dạng được làm cho giống kháng thể của người của phân tử globulin miễn dịch cũng được bao gồm trong thuật ngữ “kháng thể”, miễn là chúng có đặc tính bất kỳ trong số các đặc tính mong muốn (ví dụ, sự gắn kết đặc hiệu của (poly)peptit của gen đánh dấu bệnh ung thư tử cung, cung cấp độc tố đến tế bào ung thư tử cung biểu hiện gen đánh dấu bệnh ung thư ở mức cao, và/hoặc ức chế hoạt tính của polypeptit của gen đánh dấu bệnh ung thư tử cung) theo sáng chế.

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 bệnh ung thư bằng quang 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 theo sáng chế, như peptit theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 54, 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 bệnh ung thư tử cung được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sự tạo ra hai 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: Greenfield,

2014 (Greenfield, 2014)). Ví dụ, các kháng thể có thể được thử nghiệm trong thử nghiệm ELISA hoặc, 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 chuỗi 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, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó).

Các 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 khác 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 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 hỗ 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 mảng 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 dùng 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 bệnh ung thư từ cung, 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.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thụ thể tế bào T hòa tan (sTCR) nhận biết (theo cách đặc hiệu) 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 vùng dime hóa (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Thụ thể tế bào T có thể được liên kết với độc tố, được chất, xytokin (ví dụ, xem công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2013/0115191), và các vùng tập hợp các tế bào hiệu ứng như vùng kháng CD3, v.v., để thực hiện chức năng cụ thể trên các tế bào đích. Ngoài ra, nó có thể được biểu hiện ở các tế bào T dùng để chuyển mụn. 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.

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

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.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến 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 của 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 TAP giảm. Các tế bào thích hợp không có chất vận chuyển peptit 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 T2 thiếu sự tải peptit của người 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: 54, 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 (Plebanski et al., 1995) sử dụng các tế bào lymphô trong máu ngoại vi (peripheral blood tế bào lymphô: PLBs) 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. Tài liệu của S. Walter và các đồng tác giả (Walter et al., 2003) mô tả phương pháp tạo môi trường của các tế bào T *in vitro* bằng cách sử dụng 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, aAPCs 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 mật độ MHC trên aAPCs, 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, 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 interleukin-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, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. 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 baculovirus, tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, và tế bào đích được gây nhiễm bằng virus vaccinia. Ngoài ra, các virus ở thực vật có thể được sử dụng (ví dụ, xem tài liệu của Porta và các đồng tác giả (Porta et al. 1994), tài liệu này mô tả việc phát triển virus 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 hướng vào peptit theo sáng chế là hữu ích trong liệu pháp. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến 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: 54.

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 mà 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 trong các mô 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 của Gattinoni và các đồng tác giả và của Morgan và các đồng tác giả (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả việc sử dụng peptit được tạo phức với MHC để tạo ra thụ thể tế bào T có axit nucleic được tách dòng và được đưa vào tế bào chủ, tốt hơn nếu là tế bào T. Sau đó, tế bào T thiết kế được có thể được cấy vào bệnh nhân của liệu pháp điều trị bệnh ung thư.

Phân tử bất kỳ theo sáng chế, nghĩa là peptit, axit nucleic, kháng thể, vectơ 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.

Sáng chế còn đề cập đến kit bao gồm:

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

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

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

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 được phẩm ở dạng được đông khô nhanh.

Tốt hơn, nếu kit theo sáng chế chứa sản phẩm dạng đông khô nhanh 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 là 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 nhanh, 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 đệm, 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 được phẩm theo sáng chế cùng với hoặc không cùng với các thành phần khác (ví dụ, các hợp chất khác hoặc được 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

chelate) hoặc được 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 bệnh ung thư tử cung, tốt hơn nếu thuốc theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh ung thư tử cung.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp bào chế dược phẩm được cá nhân hóa cho từng bệnh nhân bao gồm bước sản xuất dược phẩm chứa ít nhất một peptit được chọn từ kho chứa các peptit TUMAP đã sàng lọc sơ bộ, trong đó ít nhất một peptit được sử dụng trong dược phẩm được chọn về tính thích hợp ở từng đối tượng. Theo một phương án, dược phẩm là vaccin. Phương pháp này cũng có thể được làm thích ứng để tạo ra các dòng vô tính của tế bào T để sử dụng sau đó, như tách TCR, hoặc kháng thể hòa tan và các lựa chọn điều trị khác.

Thuật ngữ “dược phẩm được cá nhân hóa” sẽ có nghĩa là liệu pháp được làm thích ứng đặc hiệu cho một đối tượng bệnh nhân mà sẽ chỉ được sử dụng cho liệu pháp ở mỗi đối tượng này, bao gồm vaccin bệnh ung thư được cá nhân hóa về mặt hoạt tính và các phép trị liệu bằng tế bào mượn sử dụng mô tự thân của bệnh nhân.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kho chứa” sẽ đề chỉ nhóm các peptit đã được sàng lọc sơ bộ về tính sinh miễn dịch và/hoặc trình diện quá mức ở một loại mô cụ thể. Thuật ngữ “kho chứa” không dự định ngụ ý rằng các peptit cụ thể được đưa vào vacxin đã được sản xuất từ trước và bảo quản trong phương tiện vật lý, mặc dù khả năng này được dự định. Có dự định rõ ràng rằng các peptit có thể được sản xuất *de novo* đối với mỗi vacxin riêng biệt được tạo ra, hoặc có thể được sản xuất từ trước và bảo quản. Kho chứa (ví dụ, ở dạng cơ sở dữ liệu) gồm các peptit liên quan đến khối u được biểu hiện quá mức ở mô khối u của bệnh nhân ung thư tử cung với các loại alen HLA-A HLA-B và HLA-C khác nhau. Nó có thể chứa các peptit của MHC nhóm I và MHC nhóm II hoặc peptit của MHC nhóm I kéo dài. Ngoài các peptit liên quan đến khối u được lấy từ vài mô ung thư tử cung, kho chứa có thể chứa các peptit của gen đánh dấu HLA-A*02 và HLA-A*24. Các peptit này cho phép so sánh mức độ miễn dịch tế bào T được gây ra bởi các peptit TUMAP theo cách định lượng và do đó cho phép rút ra kết luận quan trọng về khả năng tạo ra đáp ứng kháng khối u của vacxin. Điều thứ hai là chức năng của chúng làm peptit đối chứng dương tính quan trọng có nguồn gốc từ “không phải chính” kháng nguyên trong trường hợp các đáp ứng của tế bào T1 là đáp ứng của tế bào do vacxin bất kỳ gây ra với các peptit TUMAP có nguồn gốc từ “chính” các kháng nguyên ở bệnh nhân không được quan sát. Và điều thứ ba là nó có thể cho phép rút ra kết luận liên quan đến tình trạng khả năng miễn dịch của bệnh nhân.

Các peptit TUMAP dùng cho kho chứa được xác định bằng cách sử dụng phương pháp hệ gen tích hợp kết hợp phương pháp phân tích sự biểu hiện của gen, phương pháp phổ khối lượng, và phương pháp miễn dịch tế bào T (XPresident®). Phương pháp này đảm bảo rằng chỉ các peptit TUMAP có mặt thật sự trên khối u với tỷ lệ cao nhưng không được biểu hiện hoặc chỉ được biểu hiện ở mức tối thiểu trên mô bình thường, được chọn để phân tích thêm. Đối với sự lựa chọn peptit ban đầu, các mẫu bệnh ung thư tử cung được lấy từ các bệnh nhân và máu được lấy từ người cho khỏe mạnh được phân tích theo phương pháp từng bước:

1. Các phối tử HLA từ vật liệu ác tính được xác định bằng phương pháp phổ khối lượng
2. Phương pháp phân tích sự biểu hiện của axit ribonucleic thông tin (mRNA) có hệ gen rộng được dùng để xác định các gen được biểu hiện quá mức ở mô ác tính

(bệnh ung thư tử cung) so với khoảng của mô và cơ quan bình thường.

3. Các phối tử HLA đã xác định được so sánh với số liệu biểu hiện gen. Các peptit được trình diện quá mức hoặc được trình diện chọn lọc trên mô khối u, tốt hơn là được mã hóa bởi các gen được biểu hiện chọn lọc hoặc biểu hiện quá mức như được phát hiện trong bước 2 được cho là các ứng viên peptit TUMAP thích hợp cho vacxin đa peptit.

4. Việc tra cứu tài liệu được thực hiện để xác định bằng chứng bổ sung chứng minh mối liên quan của peptit được xác định làm peptit TUMAP

5. Mối liên quan của sự biểu hiện quá mức với mức ARN thông tin được khẳng định bằng cách phát hiện lại các peptit TUMAP đã chọn từ bước 3 trên mô khối u và không (hoặc hiếm khi) phát hiện thấy trên các mô khỏe mạnh.

6. Để đánh giá xem việc gây ra đáp ứng của tế bào T *in vivo* bằng các peptit đã chọn có khả thi hay không, các thử nghiệm tính sinh miễn dịch *in vitro* được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào T được lấy từ người cho khỏe mạnh cũng như lấy từ các bệnh nhân ung thư tử cung.

Theo một khía cạnh, các peptit được sàng lọc sơ bộ về tính sinh miễn dịch trước khi được đưa vào kho chứa. Bằng cách ví dụ và không làm giới hạn, tính sinh miễn dịch của các peptit được đưa vào kho chứa được xác định bằng phương pháp bao gồm bước gắn mỗi tế bào T *in vitro* bằng cách kích thích lặp lại các tế bào T CD8+ được lấy từ người cho khỏe mạnh bằng các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo được tải lên phức hợp peptit/MHC và kháng thể kháng CD28.

Phương pháp này được ưu tiên với một số ít bệnh ung thư và các bệnh nhân có profin biểu hiện ở mức hiếm. Trái với phức hợp đa peptit có thành phần cố định như được phát triển hiện nay, kho chứa cho phép sự phù hợp ở mức cao hơn đáng kể của sự biểu hiện thực tế của các kháng nguyên trong khối u với vacxin. Một hoặc tổ hợp của vài peptit “có sẵn” đã chọn sẽ được sử dụng cho mỗi bệnh nhân theo phương pháp đa đích. Về mặt lý thuyết, phương pháp dựa trên sự chọn lọc, ví dụ, 5 peptit của kháng nguyên khác nhau từ thư viện của 50 peptit sẽ dẫn đến có khoảng 17 triệu thành phần của sản phẩm được chất (drug product: DP).

Theo một khía cạnh, các peptit được chọn để đưa vào vacxin trên cơ sở tính ổn định của chúng đối với mỗi bệnh nhân trên cơ sở phương pháp theo sáng chế như được mô tả ở đây, hoặc như dưới đây.

Kiểu hình của HLA, số liệu về sản phẩm bắt chước sản phẩm phiên mã và bắt chước peptit được thu thập từ các vật liệu khối u của bệnh nhân, và các mẫu máu để xác định các peptit thích hợp nhất cho mỗi peptit TUMAP với bệnh nhân có “kho chứa” và bệnh nhân đặc biệt (nghĩa là được đột biến). Các peptit sẽ được chọn là peptit được biểu hiện chọn lọc hoặc được biểu hiện quá mức ở khối u của các bệnh nhân và, nếu có thể, có tính sinh miễn dịch mạnh *in vitro* khi được thử nghiệm với các tế bào PBMC riêng biệt của bệnh nhân.

Tốt hơn, nếu các peptit đưa vào vacxin được xác định bằng phương pháp bao gồm các bước: (a) xác định các peptit liên quan đến khối u (TUMAP) được biểu hiện bởi mẫu khối u được lấy từ bệnh nhân riêng biệt; (b) so sánh các peptit xác định được trong bước (a) với kho chứa (cơ sở dữ liệu) của các peptit như được mô tả trên đây; và (c) chọn lọc ít nhất một peptit từ kho chứa (cơ sở dữ liệu) có tương quan với peptit liên quan đến khối u được xác định ở bệnh nhân. Ví dụ, các peptit TUMAP được biểu hiện bởi mẫu khối u được xác định bằng cách: (a1) so sánh dữ liệu biểu hiện từ mẫu khối u với dữ liệu biểu hiện từ mẫu mô bình thường tương ứng với loại mô của mẫu khối u để xác định các protein được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường ở mẫu khối u; và (a2) tương quan dữ liệu biểu hiện với trình tự của các phối tử MHC gắn kết với các phân tử MHC nhóm I và/hoặc nhóm II trong mẫu khối u để xác định các phối tử MHC có nguồn gốc từ protein được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường bởi khối u này. Tốt hơn, nếu các trình tự của phối tử MHC được xác định bằng cách rửa giải các peptit đã gắn kết ra khỏi phân tử MHC được phân lập ra khỏi mẫu khối u, và giải trình tự của các phối tử được rửa giải. Tốt hơn, nếu mẫu khối u và mô bình thường được lấy từ cùng bệnh nhân.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, bước chọn lọc peptit bằng cách sử dụng mô hình lập kho chứa (cơ sở dữ liệu), peptit TUMAP có thể được xác định ở bệnh nhân *de novo*, và sau đó được đưa vào vacxin. Theo một ví dụ, các peptit TUMAP ứng viên có thể được xác định ở bệnh nhân theo các bước (a1) so sánh dữ liệu biểu hiện từ mẫu khối u với dữ liệu biểu hiện từ mẫu mô bình thường tương ứng với loại mô của mẫu khối u để xác định các protein được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường trong mẫu khối u; và (a2) tương quan dữ liệu biểu hiện với trình tự của phối tử MHC gắn kết với các phân tử MHC nhóm I và/hoặc nhóm II trong mẫu khối u để xác định các phối tử MHC có nguồn gốc từ các protein được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện

bất thường bởi khối u này. Theo ví dụ khác, các protein có thể được xác định là có các đột biến khác biệt với mẫu khối u so với mô tương ứng bình thường được lấy từ bệnh nhân riêng biệt, và các peptit TUMAP có thể được xác định là đích đặc hiệu của sự đột biến. Ví dụ, hệ gen của khối u và của mô bình thường tương ứng có thể được giải trình tự bằng cách giải trình tự toàn bộ hệ gen: để phát hiện các đột biến không cùng nghĩa ở các vùng mã hóa protein của gen, ADN và ARN hệ gen được chiết từ các mô khối u và ADN dòng mầm của hệ gen bình thường không được đột biến được chiết ra khỏi các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell: PBMC). Phương pháp NGS đã áp dụng bị giới hạn với việc xác định lại trình tự của các vùng mã hóa protein (xác định lại trình tự exom). Nhằm mục đích này, ADN exon từ các mẫu lấy từ người bị bắt giữ bằng cách sử dụng kit giàu đích được cung cấp bởi nhà cung cấp, sau đó giải trình tự, ví dụ, bằng HiSeq2000 (Illumina). Ngoài ra, ARN thông tin của khối u được giải trình tự để định lượng trực tiếp sự biểu hiện gen và xác nhận các gen đột biến được biểu hiện ở khối u của bệnh nhân. Hàng triệu kết quả trình tự thu được được xử lý bằng các thuật toán phần mềm. Danh sách kết quả có sự đột biến và sự biểu hiện gen. Sự đột biến thực thể đặc hiệu khối u được xác định bằng cách so sánh với các thay đổi về dòng phôi có nguồn gốc từ PBMC và được ưu tiên. Sau đó, các peptit đã xác định *de novo* có thể được thử nghiệm về tính sinh miễn dịch như đã mô tả trên đây đối với kho chứa, và các peptit TUMAP ứng viên có tính sinh miễn dịch thích hợp được chọn để đưa vào vacxin.

Theo một phương án làm ví dụ, các peptit được đưa vào vacxin được xác định bằng các bước sau: (a) xác định các peptit liên quan đến khối u (TUMAP) được biểu hiện bởi mẫu khối u được lấy từ bệnh nhân riêng biệt bằng phương pháp như đã mô tả trên đây; (b) so sánh các peptit đã xác định trong bước a) với kho chứa peptit đã được sàng lọc sơ bộ về tính sinh miễn dịch và sự biểu hiện quá mức ở khối u so với mô bình thường tương ứng; (c) chọn lọc ít nhất một peptit từ kho chứa có tương quan với peptit liên quan đến khối u được xác định ở bệnh nhân; và (d) tùy ý, chọn lọc ít nhất một peptit được xác định *de novo* trong bước (a) để khẳng định tính sinh miễn dịch của nó.

Theo một phương án làm ví dụ, các peptit được đưa vào vacxin được xác định bằng các bước: (a) nhận biết các peptit liên quan đến khối u (TUMAP) được biểu hiện bởi mẫu khối u được lấy từ bệnh nhân riêng biệt; và (b) chọn lọc ít nhất một peptit đã

xác định *de novo* trong bước (a) và khẳng định tính sinh miễn dịch của nó.

Khi các peptit dùng cho vacxin trên cơ sở peptit được cá nhân hóa được chọn, vacxin này được tạo ra. Tốt hơn, nếu vacxin này ở dạng lỏng gồm các peptit riêng biệt được hoà tan trong DMSO 20-40%, tốt hơn nếu là DMSO khoảng 30-35%, như DMSO khoảng 33%.

Mỗi peptit cần được đưa vào sản phẩm được hòa tan trong DMSO. Nồng độ của các dung dịch một peptit cần được chọn phụ thuộc vào số lượng peptit cần được đưa vào sản phẩm. Các dung dịch DMSO-một peptit được trộn lẫn theo các phần bằng nhau để đạt được dung dịch chứa tất cả các peptit cần được đưa vào sản phẩm với nồng độ mỗi peptit ~2,5 mg/ml. Sau đó, dung dịch hỗn hợp được pha loãng với nước dùng để tiêm theo tỷ lệ 1:3 để thu được nồng độ mỗi peptit bằng 0,826 mg/ml trong DMSO 33%. Dung dịch đã pha loãng được lọc qua bộ lọc vô khuẩn cỡ 0,22µm để thu được dung dịch đậm cuối.

Dung dịch đậm cuối được nạp vào các lọ và bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng. Một lọ chứa 700µl dung dịch, chứa 0,578mg mỗi peptit. Trong số này, 500µl (khoảng 400µg mỗi peptit) sẽ được sử dụng để tiêm qua đường trong da.

Ngoài tác dụng hữu ích để điều trị bệnh ung thư, các peptit theo sáng chế cũng hữu ích làm chất chẩn đoán. Do các peptit được tạo ra từ các tế bào ung thư tử cung và do đã xác định được rằng các peptit này không có mặt hoặc có mặt ở mức thấp trong các mô bình thường, các peptit này có thể được sử dụng để chẩn đoán sự có mặt của bệnh ung thư.

Sự có mặt của các peptit theo sáng chế khi sinh thiết mô trong các mẫu máu có thể trợ giúp chuyên gia bệnh học trong việc chẩn đoán bệnh ung thư. Sự phát hiện một số peptit bằng phương pháp kháng thể, phương pháp phổ khối lượng hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này có thể cung cấp cho chuyên gia bệnh học biết rằng mẫu mô này là ác tính hoặc bị viêm hoặc thường là bị bệnh, hoặc có thể được sử dụng làm dấu ấn sinh học cho bệnh ung thư tử cung. Sự có mặt của các nhóm peptit có thể cho phép phân loại hoặc phân nhóm các mô bị bệnh.

Sự phát hiện các peptit trên mẫu mô bệnh có thể cho phép quyết định về lợi ích của các liệu pháp liên quan đến hệ miễn dịch, đặc biệt là khi các tế bào lymphô T là đã biết hoặc được dự đoán là có liên quan đến cơ chế tác dụng. Sự không biểu hiện MHC là cơ chế đã được mô tả rõ mà nhờ đó các tế bào ác tính đã nhiễm bệnh thoát khỏi sự

giám sát miễn dịch. Do đó, sự có mặt của các peptit cho thấy rằng cơ chế này không được khai thác bởi các tế bào phân tích.

Các peptit theo sáng chế có thể được sử dụng để phân tích đáp ứng của tế bào lymphô với các peptit này như đáp ứng của tế bào T hoặc đáp ứng của kháng thể với peptit hoặc peptit được tạo phức với các phân tử MHC. Các đáp ứng của tế bào lymphô này có thể được sử dụng làm dấu hiệu tiên lượng để quyết định các bước trị liệu tiếp theo. Các đáp ứng này cũng có thể được sử dụng làm dấu ấn của đáp ứng thay thế trong phương pháp của liệu pháp miễn dịch nhằm tạo ra đáp ứng của tế bào lymphô bằng các biện pháp khác nhau, ví dụ, tiêm phòng vacxin chứa protein, axit nucleic, chất tự thân, sự chuyển mượn của các tế bào lymphô. Trong lĩnh vực liệu pháp gen, các đáp ứng của tế bào lymphô với peptit có thể được xem xét để đánh giá các tác dụng phụ. Việc theo dõi các đáp ứng của tế bào lymphô cũng có thể là công cụ có giá trị để tiếp tục đánh giá các liệu pháp ghép, ví dụ, để phát hiện bệnh mô ghép chống túc chủ và bệnh túc chủ chống lại mô ghép.

Sáng chế sẽ được mô tả trong các ví dụ sau đây, các ví dụ này mô tả các phương án được ưu tiên của sáng chế cùng với các hình vẽ kèm theo nhưng không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Theo mục đích của sáng chế, tất cả các tài liệu viện dẫn được nêu ở đây được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Xác định và định lượng 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: Asterand (Detroit, MI, Mỹ & Royston, Herts, Vương Quốc Anh); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); và Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Vương Quốc Anh). Các mô bình thường được lấy từ Asterand (Detroit, MI, Mỹ & Royston, Herts, Vương Quốc Anh); Bio-Options Inc. (Brea, CA, Mỹ); BioServe (Beltsville, MD, Mỹ); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, Mỹ); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); Đại học y Kyoto Prefectural (Kyoto Prefectural University of Medicine: KPUM) (Kyoto, Nhật Bản); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, Mỹ); Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Vương Quốc Anh); Bệnh viện đại học Geneva (Geneva, Thụy Sĩ); Bệnh viện đại học Heidelberg (Heidelberg, Đức);

Bệnh viện đại học Munich (Munich, Đức); và Bệnh viện đại học Tübingen (Tübingen, Đức).

Sự đồng ý tham gia bằng văn bản của tất cả các bệnh nhân được cung cấp trước khi phẫu thuật hoặc mổ. Các mô được đông lạnh sốc ngay sau khi phẫu thuật và được bảo quản cho đến khi phân lập peptit 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 đông lạnh sốc thu được bằng cách kết tủa miễn dịch ra khỏi các mô rắn theo quy trình được cải biến không đáng kể (Falk et al., 1991; Seeger et al., 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 thể lai dung hợp 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 theo 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 trung tâm 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 bệnh ung thư từ cung cạnh đường gốc của các mẫu mô bình thường. Profin biểu hiện của các peptit biểu hiện quá mức làm ví dụ được thể hiện trên Fig.1. Điểm số biểu hiện của các peptit làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8: Điểm số biểu hiện. Bảng này liệt kê các peptit được biểu hiện ở mức rất cao trên khối u so với nhóm các mô bình thường (+++), được biểu hiện ở mức quá cao trên khối u so với nhóm các mô bình thường (++) hoặc được biểu hiện quá mức trên khối u so với nhóm các mô bình thường (+). Nhóm các mô bình thường được cho là có liên quan để so sánh với các khối u bao gồm mô mỡ, tuyến thượng thận, động mạch, tủy xương, não, dây thần kinh trung ương, ruột kết, thực quản, mắt, túi mật, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, bạch cầu, tụy, tuyến cận giáp, dây thần kinh ngoại biên, màng bụng, tuyến yên, màng phổi, trực tràng, tuyến nước bọt, cơ vân, da, ruột non, lách, dạ dày, tuyến ức, tuyến giáp, khí quản, niệu quản, bàng quang, tĩnh mạch.

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện peptit
1	KLLDNLHDL	+++
2	VLLDIFTGV	+++
3	GLDGATYTV	+++
4	RLDIQGTGQLL	+++
5	SLFDEVRI	+++
6	SLLSELVEA	++
7	SILSLLIK	++
8	SVMELLQGV	++
9	SLYPGTETM	+
10	AILDVVVNL	+
12	ALAPSEGVQAA	+++
13	ALQNKVVAL	+++
14	FLVDSLISA	+++
15	GLLSVELRV	+++
16	KLNSSIQYV	+++
17	KLWEESTAQV	+++
18	SLLRCPAKA	+++
19	YLETMNITL	+++
20	ALLGFVTDL	+++
22	VLVSSVLGV	+++
24	ILDAQTAHV	+
25	ILLELFTHV	++
26	SVLAGVVG	++
27	VLNPETTV	+
34	AIAGRLLGV	+++
35	TLLPTLYEI	++
36	SLLSDIHAL	+
37	VLLATVTEL	+
39	ALDGKIYEL	+
41	YIDDIFSGV	+++
42	FLSGYYVTL	+
46	NMDDVIYYV	+

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện peptit
48	ILAETQPEL	+
49	ALLELLHEL	++
50	TLSTVIATV	+
52	ALISEKLETL	+
53	VMHDSSFSV	+
54	TLSDVVVGL	++

Ví dụ 2

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

Sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện 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. Hơn nữa, 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 cung cấp 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 Reagent (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 dùng cho thử nghiệm RNASeq thu được từ:

Asterand (Detroit, MI, Mỹ & Royston, Herts, Vương Quốc Anh); BioCat GmbH (Heidelberg, Đức); BioServe (Beltsville, MD, Mỹ); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, Mỹ); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Naples, Ý); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, Mỹ); và Bệnh viện đại học

Heidelberg (Heidelberg, Đức). ARN tổng số từ các mô khối u dùng cho thử nghiệm RNASeq thu được từ: Asterand (Detroit, MI, Mỹ & Royston, Herts, Vương Quốc Anh); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); và Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Vương Quốc Anh). 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 ARNseq

Phép phân tích sự biểu hiện gen của – các mẫu ARN của mô khối u và mô bình thường được thực hiện bằng cách giải trình tự thế hệ mới (RNAseq) bởi trung tâm CeGaT (Tübingen, Đức). Tóm lại, thư viện giải trình tự được tạo ra bằng cách sử dụng kit chất phản ứng Illumina HiSeq v4 theo hướng dẫn của nhà cung cấp (Illumina Inc., San Diego, CA, Mỹ), bao gồm phân mảnh ARN, chuyển đổi ADN bổ trợ và bổ sung phân tử gá lắp giải trình tự. Các thư viện có nguồn gốc từ nhiều mẫu được trộn lẫn về mặt đẳng mol và được giải trình tự trên thiết bị giải trình tự Illumina HiSeq 2500 theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tạo ra các số đọc ở một đầu ứng với 50 cặp bazơ (base pair: bp). Các số đọc đã xử lý được vẽ bản đồ với hệ gen của người (GRCh38) bằng cách sử dụng chương trình phần mềm STAR. Dữ liệu biểu hiện được cung cấp ở cấp độ phiên mã dưới dạng RPKM (số đọc cho một kilo bazơ cho một triệu lần đọc đã vẽ bản đồ), được tạo ra bằng chương trình phần mềm Cufflinks) và ở cấp độ exon (tổng số lần đọc, được tạo ra bằng chương trình phần mềm Bedtools), dựa trên sự chú giải của cơ sở dữ liệu trình tự ensembl (Ensembl77).

Các số đọc exon được chuẩn hóa về chiều dài exon và kích thước khi thẳng hàng để thu được giá trị RPKM. Profin biểu hiện làm ví dụ của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện cao quá mức hoặc chỉ được biểu hiện trong bệnh ung thư tử cung được thể hiện trên Fig.2. Điểm số biểu hiện cho các gen làm ví dụ khác được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9: 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 (+). Giá trị ban đầu của điểm số này được tính từ kết quả thu được từ các mô bình thường liên quan sau đây: mô mỡ, tuyến thượng thận, động mạch, tế bào máu, tủy xương, não, sụn, ruột kết, thực

quản, mắt, túi mật, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, tụy, dây thần kinh ngoại biên, tuyến yên, trực tràng, tuyến nước bọt, cơ vân, da, ruột non, lách, dạ dày, tuyến giáp, khí quản, bàng quang, và tĩnh mạch. Trong trường hợp số liệu biểu hiện của một vài mẫu của cùng loại mô được sử dụng, giá trị trung bình số học của tất cả các mẫu được sử dụng để tính toán.

SEQ ID No	Trình tự	Sự biểu hiện gen
1	KLLDNLHDL	+++
4	RLDIQGTGQLL	+++
5	SLFDEVQRQI	+++
12	ALAPSEGVQAA	+++
13	ALQNKVVAL	+++
14	FLVDSLISA	++
15	GLLSVELRV	+
21	VLGPEGQLV	+++
28	GLDEAIRKV	+++
42	FLSGYYVTL	+++
43	VIANEIEKV	++
48	ILAETQPEL	+++
52	ALISEKLETL	++

Ví dụ 3

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

Để thu được thông tin liên quan đến tính sinh miễn dịch của peptit TUMAP theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã tiến hành đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm tạo môi 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 các peptit TUMAP được giới hạn bởi HLA-A*02:01 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 (Bảng 10).

Tạo môi 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 gan 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.

Các tế bào PBMC và 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 hóa bằng phương pháp hóa học bằng cách sử dụng Sulfo-N-hydroxysuccinimidobiotin theo khuyến cáo của nhà sản xuất (Perbio, Bonn, Đức). 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 đối chứng âm tính là A*0201/MLA-001 (peptit ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 72) từ Melan-A/MART-1 được cải biến) và A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI từ DDX5, SEQ ID NO. 73), tương ứng.

800.000 hạt/200µl được phủ trong đĩa có 96 lỗ với sự có mặt của 4 x 12,5ng biotin-pMHC khác nhau, được rửa và 600 ng biotin kháng CD28 được cho thêm sau đó với thể tích 200µl. 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 200µl TCM được bổ sung 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) trong 3 ngày ở nhiệt độ 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+ tổng số. 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. Tính sinh miễn dịch đối với một kháng nguyên cho trước được phát hiện nếu ít nhất một lỗ được kích thích *in vitro* của một người cho khỏe mạnh có thể được đánh giá 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).

Tính sinh miễn dịch *in vitro* của các peptit bệnh ung thư tử cung

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 làm ví dụ sau khi nhuộm multime đặc hiệu peptit TUMAP đối với hai peptit theo sáng chế được thể hiện trên Fig.3 cùng với các đối chứng âm tính tương ứng. Kết quả đếm tế bào theo dòng làm ví dụ bổ sung sau khi nhuộm multime đặc hiệu peptit TUMAP đối với ba peptit theo sáng chế được thể hiện trên Fig.4 cùng với các đối chứng âm tính tương ứng. Kết quả của 7 peptit theo sáng chế được tóm tắt trong Bảng 10A. Kết quả bổ sung của 10 peptit theo sáng chế được tóm tắt trong Bảng 10B.

Bảng 10A: tính sinh miễn dịch *in vitro* của các peptit HLA nhóm I theo sáng chế

Kết quả làm ví dụ của các thử nghiệm tính sinh miễn dịch *in vitro* được tiến

hành bởi tác giả sáng chế đối với các peptit theo sáng chế. <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70% = ++++

Seq ID-No	Trình tự	Các lỗ
57	ALADLTGTVV	+
64	ALYDSVILL	+
58	GVLENIFGV	+
56	LLLEILHEI	+
59	QLLAGVFLA	+
62	SLWGGDVVL	++
69	VLTEFTREV	+

Bảng 10B: Tính sinh miễn dịch *in vitro* của các peptit HLA nhóm I theo sáng chế

Kết quả làm ví dụ của thử nghiệm tính sinh miễn dịch *in vitro* được tiến hành bởi tác giả sáng chế đối với các peptit được giới hạn bởi HLA-A*02 theo sáng chế. Kết quả của các thử nghiệm tính sinh miễn dịch *in vitro* được thể hiện. Tỷ lệ % các lỗ dương tính và người cho (trong số các mẫu có thể đánh giá) được tóm tắt như được thể hiện <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70% = ++++

SEQ ID No	Trình tự	Các lỗ dương tính [%]
1	KLLDNLHDL	+
2	VLLDIFTGV	+++
3	GLDGATYTV	++++
6	SLLSELVEA	+
7	SILSLLIKL	++
9	SLYPGTETM	+
10	AILDVVVNL	+
14	FLVDSLISA	++
20	ALLGFVTDL	++
23	GLGPNLVGV	++++

Ví dụ 4

Tổng hợp peptit

Tất cả các peptit được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn chuẩn và đã biết rõ 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 đông khô nhanh 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.

Ví dụ 5

Thử nghiệm gắn kết MHC

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*02:01/MLA-001 cuộn gấp 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 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 hợp MHC này.

Bảng 11: Điểm số gắn kết với MHC nhóm I. Sự gắn kết của các peptit được giới hạn bởi HLA-nhóm I với HLA-A*02:01 được phân loại theo hiệu suất trao đổi peptit: $\geq 10\% = +$; $\geq 20\% = ++$; $\geq 50 = +++$; $\geq 75\% = ++++$

SEQ ID No	Trình tự	Sự trao đổi peptit
1	KLLDNLHDL	++++
2	VLLDIFTGV	++++
3	GLDGATYTV	+++
4	RLDIQGTGQLL	+++
5	SLFDEV RQI	++++
6	SLLSELVEA	++++
7	SILSLLIKL	++
8	SVMELLQGV	++++
9	SLYPGTETM	+++
10	AILDVVVNL	++++
11	ALDPIIHGL	++++
12	ALAPSEGVQAA	++++
13	ALQNKVVAL	+++
14	FLVDSLISA	++++
15	GLLSVELRV	++++
16	KLNSSIQYV	+++
17	KLWEESTAQV	+++
19	YLETMNITL	+++
20	ALLGFVTDL	++++
21	VLGPEGQLV	+++
22	VLVSSVLGV	+++
23	GLGPNLVGV	++++
24	ILDAQTAFV	+++
25	ILLELFTHV	++++
26	SVLAGVVG V	++++
27	VLNPETTVV	+++
28	GLDEAIRKV	+++
29	IGIGPVLNI	+
30	TLLDRVAVI	+++

SEQ ID No	Trình tự	Sự trao đổi peptit
31	ALLTAVTNV	+++
32	GLIENTYQL	+++
33	SMTTNLDLKV	++
34	AIAGRLLGV	++++
35	TLLPTLYEI	+++
36	SLLSDIAL	+++
37	VLLATVTEL	+++
38	RILDIDIPLSV	+++
39	ALDGKIYEL	+++
40	GLLGGVIMMV	++++
41	YIDDIFSGV	++++
42	FLSGYYVTL	++++
43	VIANEIEKV	+++
44	FLNGLEILL	++++
45	VLLHVSVLL	++
46	NMDDVIYYV	+++
47	GLVEQLYDL	+++
48	ILAETQPEL	+++
49	ALLELLHEL	++++
50	TLSTVIATV	++++
51	TVPPVFVSV	+++
52	ALISEKLETL	+++
53	VMHDSSFVS	++++
54	TLSDVVVGL	+++

Tài liệu tham khảo

- Accardi, L. et al., *Int.J Cancer* **134** (2014): 2742-2747
- Allison, J. P. et al., *Science* **270** (1995): 932-933
- American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
- An, Q. et al., *Haematologica* **94** (2009): 1164-1169
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012): 891-902
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006): 1805-1814
- Aung, C. S. et al., *Carcinogenesis* **30** (2009): 1962-1969
- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, **Vol.57** (1995): 289-300
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Burger, H. et al., *Leukemia* **8** (1994): 990-997
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- Cheung, A. K. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 13434-13447
- Cheung, K. F. et al., *Cancer* **118** (2012): 947-959
- Cho, S. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **108** (2011): 20778-20783
- Cohen, C. J. et al., *J Mol.Recognit.* **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol.* **170** (2003b): 4349-4361

- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114
- Cole, S. P. et al., Science **258** (1992): 1650-1654
- Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
- Coosemans, A. et al., Anticancer Res **33** (2013): 5495-5500
- Corral, R. et al., PLoS.One. **8** (2013): e71211
- Curry, M. C. et al., J Biol Chem **287** (2012): 28598-28608
- Das, A. et al., Mol.Immunol. **56** (2013): 113-122
- Dedes, K. J. et al., Sci.Transl.Med. **2** (2010): 53ra75
- Della, Peruta M. et al., Cancer Res **70** (2010): 8896-8906
- Deng, J. et al., Oncotarget. **5** (2014): 3173-3183
- Deng, J. et al., Br.J Surg. **103** (2016): 407-416
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003): 2197-2207
- Diaz-Griffero, F. et al., Virology **378** (2008): 233-242
- Donnard, E. et al., Oncotarget. **5** (2014): 9199-9213
- Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296
- Fang, Z. et al., J Biol Chem **288** (2013): 7918-7929
- Follenzi, A. et al., Nat Genet. **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- Fukushima, Y. et al., Eur.J Cancer **35** (1999): 935-938
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat.Med **2** (1996): 1096-1103
- Gao, Q. et al., Clin Cancer Res (2016)
- Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. **6** (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867

- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
- Green, J. et al., *Cochrane.Database.Syst.Rev* (2005): CD002225
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Gustafsson, C. et al., *Trends Biotechnol.* **22** (2004): 346-353
- Hao, B. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 4378-4384
- Heubach, J. et al., *Mol.Cancer* **14** (2015): 108
- Hollander, L. et al., *Cancer Res* **76** (2016): 3884-3894
- Hung, C. F. et al., *Immunol.Rev* **222** (2008): 43-69
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Jain, S. et al., *J Virol.* **89** (2015): 4449-4456
- Jaiswal, A. S. et al., *Bioorg.Med.Chem Lett.* **24** (2014): 4850-4853
- Janoueix-Lerosey, I. et al., *Oncogene* **23** (2004): 5912-5922
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* **rd** (2000)
- Kim, N. et al., *Genomics Inform.* **11** (2013): 239-244
- Krieg, A. M., *Nat.Rev.Drug Discov.* **5** (2006): 471-484
- Krishnan, N. M. et al., *Mol.Cancer Res* **14** (2016): 805-819
- Kuball, J. et al., *Blood* **109** (2007): 2331-2338
- Laczmanska, I. et al., *Acta Biochim.Pol.* **58** (2011): 467-470
- Landi, S. et al., *Cancer Res* **66** (2006): 11062-11069
- Le, A. P. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 7293-7304
- Leitlinie Endometriumkarzinom, **032/034**, (2008)
- Li, D. et al., *Clin Cancer Res* **15** (2009): 740-746
- Li, J. et al., *J Cell Mol.Med* **19** (2015): 2793-2805

- Li, Q. et al., J Gastroenterol.Hepatol. **29** (2014): 835-842
- Liddy, N. et al., Nat.Med. **18** (2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585
- Lu, Y. et al., J Biol Chem **287** (2012): 41014-41022
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
- Lukka, H. et al., Clin Oncol (R Coll.Radiol.) **14** (2002): 203-212
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
- Ma, Z. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **8** (2015): 5071-5079
- Malik, M. F. et al., Histol.Histopathol. **29** (2014): 151-165
- Mandell, M. A. et al., Dev.Cell **30** (2014a): 394-409
- Mandell, M. A. et al., Autophagy. **10** (2014b): 2387-2388
- Matsuo, M. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **420** (2012): 901-906
- Mehrotra, M. et al., Leuk.Lymphoma **55** (2014): 2538-2548
- Merry, C. et al., Cell Cycle **9** (2010): 279-283
- Metzger, M. J. et al., J Virol. **84** (2010): 1874-1880
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res. **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638
- Muvarak, N. et al., Mol.Cancer Res **13** (2015): 699-712

National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov

Nooter, K. et al., Br.J Cancer **76** (1997): 486-493

Norris, M. D. et al., N.Engl.J Med. **334** (1996): 231-238

Pawlica, P. et al., J Gen.Virol. **96** (2015): 874-886

Piasecka, D. et al., Postepy Biochem. **61** (2015): 198-206

Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)

Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787

Porta, C. et al., Virology **202** (1994): 949-955

Rahim, S. et al., PLoS.One. **9** (2014): e114260

Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219

RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>

Ribiczey, P. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **464** (2015): 189-194

Ribiczey, P. et al., Cell Calcium **42** (2007): 590-605

Richardson, M. W. et al., Mol.Ther. **22** (2014): 1084-1095

Rimkus, C. et al., Clin Gastroenterol.Hepatol. **6** (2008): 53-61

Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006): 67-74

Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921

Rodenko, B. et al., Nat.Protoc. **1** (2006): 1120-1132

S3-Leitlinie Zervixkarzinom, **032/033OL**, (2014)

Safarpour, D. et al., Arch.Pathol.Lab Med. **139** (2015): 612-617

Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491

Schmitt, T. M. et al., Hum.Gene Ther. **20** (2009): 1240-1248

Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. **119** (2006): 135-145

Scholz, B. et al., Dev.Cell **36** (2016): 79-93

- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- SEER Stat facts, (2014), <http://seer.cancer.gov/>
- Sharpe, D. J. et al., Oncotarget. **5** (2014): 8803-8815
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Shu, S. T. et al., Anticancer Res **30** (2010): 1937-1946
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Srihari, S. et al., Bioinformatics. **29** (2013): 1553-1561
- Stevanovic, S. et al., J Clin Oncol **33** (2015): 1543-1550
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Sullivan, G. F. et al., J Clin Invest **105** (2000): 1261-1267
- Tan, J. et al., J Cell Physiol **228** (2013): 2305-2313
- Teufel, R. et al., Cell Mol.Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., Science **344** (2014): 641-645
- Udali, S. et al., Clin Epigenetics. **7** (2015): 43
- Vanaja, D. K. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 1128-1136
- Vardhini, N. V. et al., Tumour.Biol **35** (2014): 10855-10860
- Varga, K. et al., Cell Calcium **55** (2014): 78-92
- Vici, P. et al., J Exp.Clin Cancer Res **33** (2014): 29
- Walter, S. et al., J.Immunol. **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261
- Wang, N. et al., Arch.Gynecol.Obstet. **283** (2011): 103-108
- Wang, Y. Y. et al., World J Surg.Oncol **13** (2015): 259
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423
- Wilting, S. M. et al., Genes Chromosomes.Cancer **47** (2008): 890-905

World Cancer Report, (2014)

Yang, H. et al., Oncol Rep. **34** (2015a): 1681-1691

Yang, Q. et al., Oncotarget. **6** (2015b): 3268-3279

Ye, S. M. et al., Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi. **92** (2012): 1954-1958

Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577

Zhang, L. et al., J Exp.Clin Cancer Res **28** (2009a): 78

Zhang, Y. W. et al., Mol.Cell **35** (2009b): 442-453

Zufferey, R. et al., J Virol. **73**-(1999): 2886-2892

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit được phân lập chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 12, và các trình tự biến thể của nó có mức độ tương đồng ít nhất 88% với trình tự SEQ ID No: 12, và trong đó biến thể này gắn kết với (các) phân tử của phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex: MHC); hoặc muối được dụng của nó, trong đó peptit này hoặc biến thể của nó có tối đa 12 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch.
2. Peptit được phân lập theo điểm 1, trong đó peptit này có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm -I hoặc nhóm -II, và trong đó khi được gắn kết với MHC, peptit này có khả năng được nhận biết bởi các tế bào T CD4 và/hoặc CD8.
3. Peptit được phân lập hoặc biến thể của nó theo điểm 1 đến 2, trong đó trình tự axit amin của nó chứa đoạn liên tục của các axit amin theo trình tự SEQ ID No: 12.
4. Peptit được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó peptit này bao gồm trình tự axit amin theo trình tự SEQ ID No: 12.
5. Peptit được phân lập hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó peptit này được cải biến và/hoặc bao gồm các liên kết không peptit.
6. Peptit được phân lập hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó peptit này là một phần của protein dung hợp, cụ thể là chứa các axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii).
7. Kháng thể được phân lập, cụ thể là kháng thể hòa tan hoặc liên kết màng, tốt hơn nếu là kháng thể đơn dòng hoặc đoạn của nó, trong đó kháng thể này nhận biết đặc hiệu peptit hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, tốt hơn nếu là peptit hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến

5 khi được gắn kết với phân tử của MHC.

8. Thụ thể tế bào T được phân lập, tốt hơn nếu là thụ thể hòa tan hoặc liên kết màng, hoặc đoạn của nó, có khả năng phản ứng với phối tử HLA, trong đó phối tử này là peptit hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, tốt hơn nếu là peptit hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 khi được gắn kết với phân tử của MHC.
9. Thụ thể tế bào T được phân lập theo điểm 8, trong đó trình tự axit amin của phối tử nêu trên có mức độ giống ít nhất 88% với trình tự SEQ ID No: 12, hoặc trong đó phối tử nêu trên là peptit có trình tự axit amin gồm SEQ ID No: 12.
10. Thụ thể tế bào T được phân lập theo điểm 8 hoặc 9, trong đó thụ thể tế bào T này được tạo ra dưới dạng phân tử hòa tan và tùy ý mang chức năng hiệu ứng khác như miễn kích thích miễn dịch hoặc độc tố.
11. Aptame nhận biết đặc hiệu peptit hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, tốt hơn nếu là peptit hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 được gắn kết với phân tử của MHC.
12. Axit nucleic mã hóa peptit hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 7, thụ thể tế bào T hoặc đoạn của nó theo điểm 8 hoặc 9, trong đó axit nucleic này được liên kết với trình tự gen khởi đầu khác loại.
13. Vector biểu hiện biểu hiện axit nucleic theo điểm 12.
14. Tế bào chủ tái tổ hợp chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 7, thụ thể tế bào T hoặc đoạn của nó theo điểm 8 hoặc 9 hoặc axit nucleic theo điểm 12 hoặc vector biểu hiện theo điểm 13, trong đó tốt hơn nếu tế bào chủ này được chọn từ tế bào trình diện kháng nguyên, như tế bào đuôi gai, tế bào T hoặc tế bào NK.

15. Phương pháp tạo ra các 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 hoặc nhóm II của người được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp hoặc cấu trúc nhân tạo bắt 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 bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
16. Tế bào lymphô T hoạt hóa được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 15, trong đó tế bào này nhận biết chọn lọc tế bào chứa polypeptit có trình tự axit amin được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
17. Dược phẩm chứa ít nhất một hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm peptit được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, kháng thể được phân lập hoặc đoạn của nó theo điểm 7, thụ thể tế bào T được phân lập hoặc đoạn của nó theo điểm 8 hoặc 9, aptame theo điểm 11, axit nucleic theo điểm 12 hoặc vector biểu hiện theo điểm 13, tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 14, hoặc tế bào lymphô T hoạt hóa theo điểm 16, và chất mang được dụng, và tùy ý, tá dược và/hoặc chất ổn định được dụng.
18. Phương pháp tạo ra peptit hoặc biến thể của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 14, và phân lập peptit hoặc biến thể của nó ra khỏi tế bào chủ nêu trên và/hoặc môi trường nuôi cấy của nó.
19. Phương pháp tạo ra kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 7, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 14, và phân lập kháng thể hoặc đoạn của nó ra khỏi tế bào chủ nêu trên và/hoặc môi trường nuôi cấy của nó.
20. Phương pháp tạo ra thụ thể tế bào T hoặc đoạn của nó theo điểm 8 hoặc 9, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 14, và phân lập

thụ thể tế bào T hoặc đoạn của nó ra khỏi tế bào chủ nêu trên và/hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

21. Kit bao gồm:

- a) đồ chứa để đựng được phẩm chứa (các) peptit hoặc biến thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 7, thụ thể tế bào T hoặc đoạn của nó theo điểm 8 hoặc 9, aptame theo điểm 11, axit nucleic theo điểm 12 hoặc vector biểu hiện theo điểm 13, tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 14, hoặc tế bào lymphô T hoạt hóa theo điểm 16, ở dạng dung dịch hoặc dạng đông khô nhanh;
- b) tùy ý, đồ chứa thứ hai để đựng chất pha loãng hoặc dung dịch hoàn nguyên dùng cho chế phẩm dạng đông khô nhanh;
- c) tùy ý, ít nhất một peptit nữa được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID No: 1 đến SEQ ID No. 71, và
- d) tùy ý, hướng dẫn để (i) sử dụng dung dịch hoặc (ii) hoàn nguyên và/hoặc sử dụng chế phẩm dạng đông khô nhanh.

22. Kit theo điểm 21, trong đó kit này còn chứa một hoặc nhiều 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.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Peptit để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch, tế bào chứa peptit này, được phẩm và phương pháp sản xuất vacxin kháng bệnh ung thư

<130> I32947W0

<150> GB 1603987.7

<151> 2016-03-08

<150> US 62/305,222

<151> 2016-03-08

<160> 73

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Lys Leu Leu Asp Asn Leu His Asp Leu
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 2

Val Leu Leu Asp Ile Phe Thr Gly Val
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 3

Gly Leu Asp Gly Ala Thr Tyr Thr Val
1 5

<210> 4

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

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 5

Ser Leu Phe Asp Glu Val Arg Gln Ile
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 6

Ser Leu Leu Ser Glu Leu Val Glu Ala
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 7

Ser Ile Leu Ser Leu Leu Ile Lys Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 8

Ser Val Met Glu Leu Leu Gln Gly Val
 1 5

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

<400> 9

Ser Leu Tyr Pro Gly Thr Glu Thr Met
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 10

Ala Ile Leu Asp Val Val Val Asn Leu
 1 5

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

<400> 11

Ala Leu Asp Pro Ile Ile His Gly Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 13

Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu

1

5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 14

Phe Leu Val Asp Ser Leu Ile Ser Ala
 1 5

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

<400> 15

Gly Leu Leu Ser Val Glu Leu Arg Val
 1 5

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

<400> 16

Lys Leu Asn Ser Ser Ile Gln Tyr Val
 1 5

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 17

Lys Leu Trp Glu Glu Ser Thr Ala Gln Val
 1 5 10

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

<400> 18

Ser Leu Leu Arg Cys Pro Ala Lys Ala
1 5

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

<400> 19

Tyr Leu Glu Thr Met Asn Ile Thr Leu
1 5

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

<400> 20

Ala Leu Leu Gly Phe Val Thr Asp Leu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 21

Val Leu Gly Pro Glu Gly Gln Leu Val
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 22

Val Leu Val Ser Ser Val Leu Gly Val
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 23

Gly Leu Gly Pro Asn Leu Val Gly Val
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 24

Ile Leu Asp Ala Gln Thr Ala Phe Val
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 25

Ile Leu Leu Glu Leu Phe Thr His Val
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 26

Ser Val Leu Ala Gly Val Val Gly Val
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 27

Val Leu Asn Pro Glu Thr Thr Val Val
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 28

Gly Leu Asp Glu Ala Ile Arg Lys Val
 1 5

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

<400> 29

Ile Gly Ile Gly Pro Val Leu Asn Ile
 1 5

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

<400> 30

Thr Leu Leu Asp Arg Val Ala Val Ile
 1 5

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

<400> 31

Ala Leu Leu Thr Ala Val Thr Asn Val
 1 5

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

<400> 32

Gly Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Gln Leu
 1 5

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 33

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

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 34

Ala Ile Ala Gly Arg Leu Leu Gly Val
 1 5

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 35

Thr Leu Leu Pro Thr Leu Tyr Glu Ile
 1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 36

Ser Leu Leu Ser Asp Ile Ile Ala Leu
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 37

Val Leu Leu Ala Thr Val Thr Glu Leu
 1 5

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 39

Ala Leu Asp Gly Lys Ile Tyr Glu Leu
 1 5

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

<400> 40

Gly Leu Leu Gly Gly Val Ile Met Met Val
 1 5 10

<210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 41

Tyr Ile Asp Asp Ile Phe Ser Gly Val
 1 5

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

<400> 42

Phe Leu Ser Gly Tyr Tyr Val Thr Leu
1 5

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

<400> 43

Val Ile Ala Asn Glu Ile Glu Lys Val
1 5

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

<400> 44

Phe Leu Asn Gly Leu Glu Ile Leu Leu
1 5

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

<400> 45

Val Leu Leu His Val Ser Val Leu Leu
1 5

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

<400> 46

Asn Met Asp Asp Val Ile Tyr Tyr Val
1 5

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

<400> 47

Gly Leu Val Glu Gln Leu Tyr Asp Leu
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 48

Ile Leu Ala Glu Thr Gln Pro Glu Leu
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 49

Ala Leu Leu Glu Leu Leu His Glu Leu
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 50

Thr Leu Ser Thr Val Ile Ala Thr Val
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 51

Thr Val Pro Pro Val Phe Val Ser Val
1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 52

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

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 53

Val Met His Asp Ser Ser Phe Ser Val
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 54

Thr Leu Ser Asp Val Val Val Gly Leu
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 55

Lys Ile Asp Glu Lys Asn Phe Val Val
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 56

Leu Leu Leu Glu Ile Leu His Glu Ile
1 5

<210> 57

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

<400> 57

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

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

<400> 58

Gly Val Leu Glu Asn Ile Phe Gly Val
 1 5

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

<400> 59

Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala
 1 5

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

<400> 60

Lys Leu Phe Asn Glu Phe Ile Gln Leu
 1 5

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

<400> 61

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

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

<400> 62

Ser Leu Trp Gly Gly Asp Val Val Leu
 1 5

<210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 63

Arg Leu Leu Ser Ala Ala Glu Asn Phe Leu
 1 5 10

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 64

Ala Leu Tyr Asp Ser Val Ile Leu Leu
 1 5

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 65

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

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 66

Ser Leu Phe Ser Ser Pro Pro Glu Ile

1

5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 67

Ala Leu Gln Pro Leu Leu His Thr Val
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 68

Ser Leu Ala Glu Val Asn Thr Gln Leu
 1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 69

Val Leu Thr Glu Phe Thr Arg Glu Val
 1 5

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 70

Lys Leu Gly Ala Val Phe Asn Gln Val
 1 5

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

<400> 71

Ser Leu His Asn Gly Val Ile Gln Leu
1 5

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 72

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

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

<400> 73

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5

- 1 -

Fig.1A

Peptit: RLDIQGTGQLL (A*02)
SEQ ID NO: 4

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

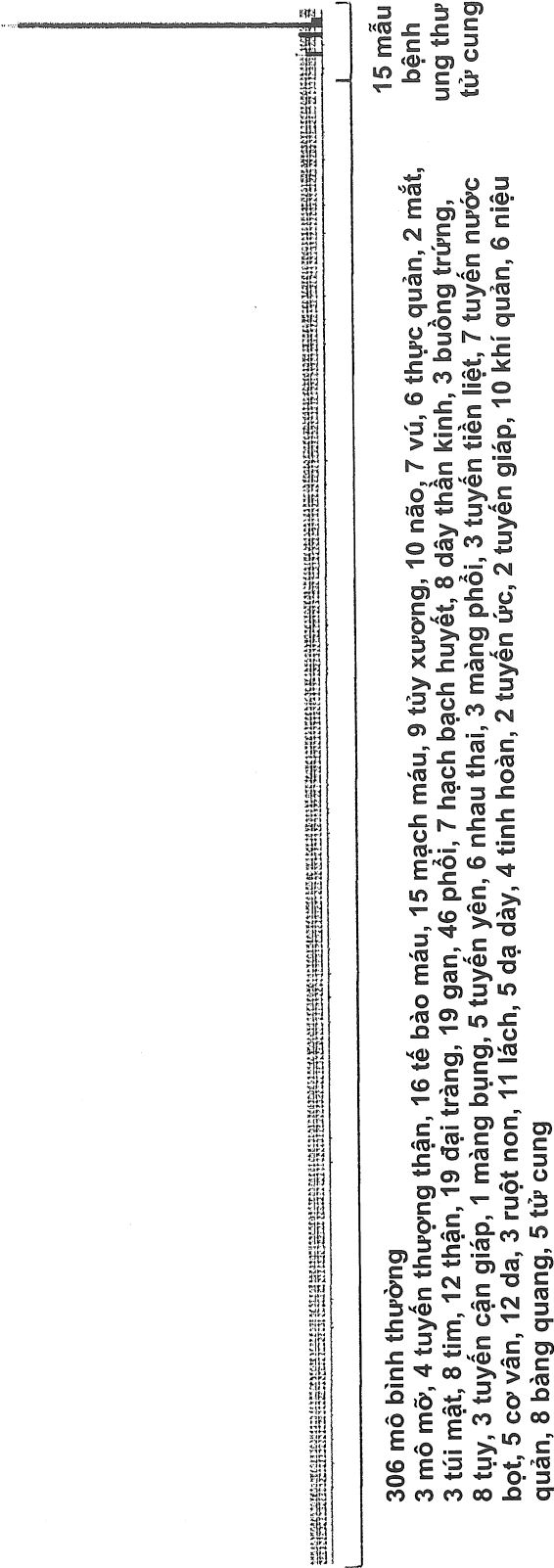
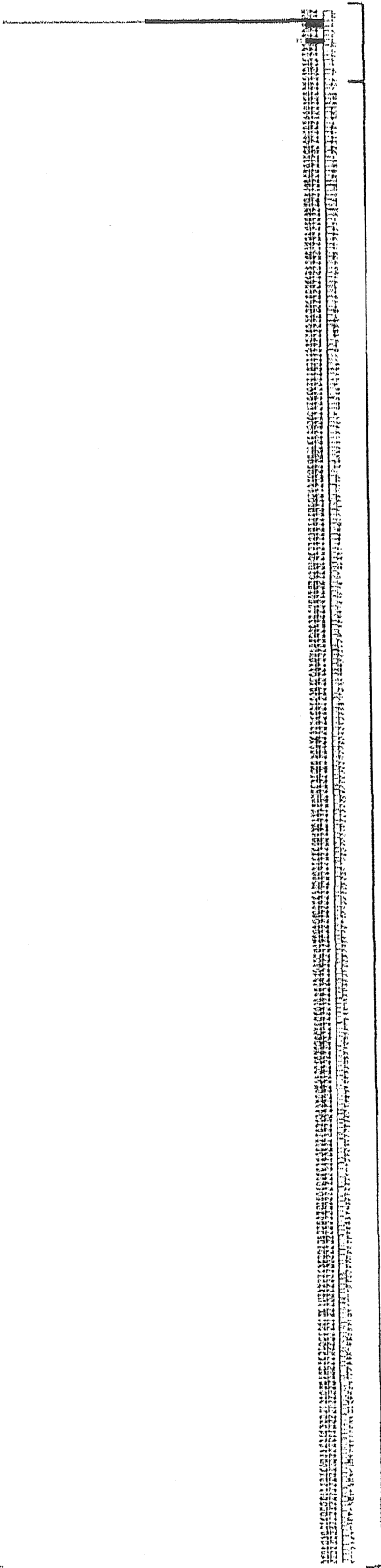


Fig.1B
Peptit: SLFDEVQRQI (A*02)
SEQ ID NO: 5

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]



15 mẫu
bệnh
ung thư
từ cung

306 mô bình thường
3 mô mỡ, 4 tuyến thượng thận, 16 tế bào máu, 15 mạch máu, 9 tủy xương, 10 não, 7 vú, 6 thực quản, 2 mắt,
3 túi mật, 8 tim, 12 thận, 19 đại tràng, 19 gan, 46 phổi, 7 hạch bạch huyết, 8 dây thần kinh, 3 buồng trứng,
8 tụy, 3 tuyến cận giáp, 1 màng bụng, 5 tuyến yên, 6 nhau thai, 3 màng phổi, 3 tuyến tiền liệt, 7 tuyến nước
bọt, 5 cơ vân, 12 da, 3 ruột non, 11 lách, 5 dạ dày, 4 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 10 khí quản, 6 niệu
quản, 8 bàng quang, 5 tử cung

Sự biến hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

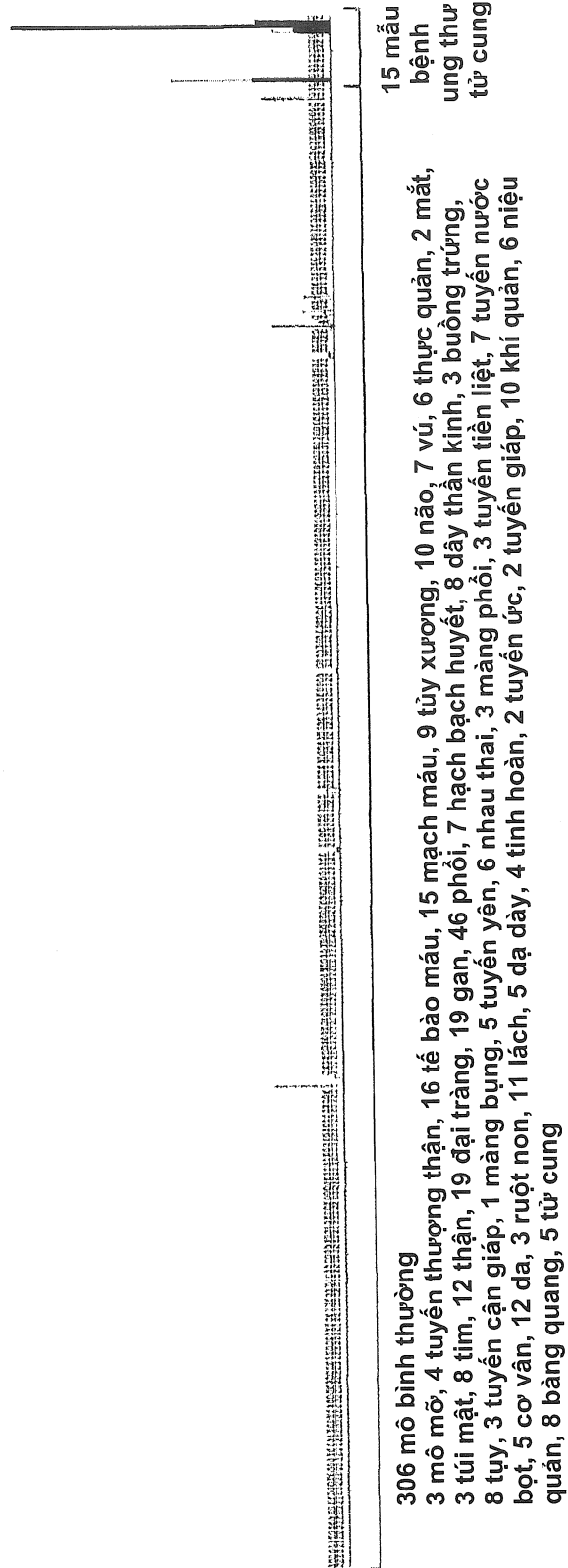
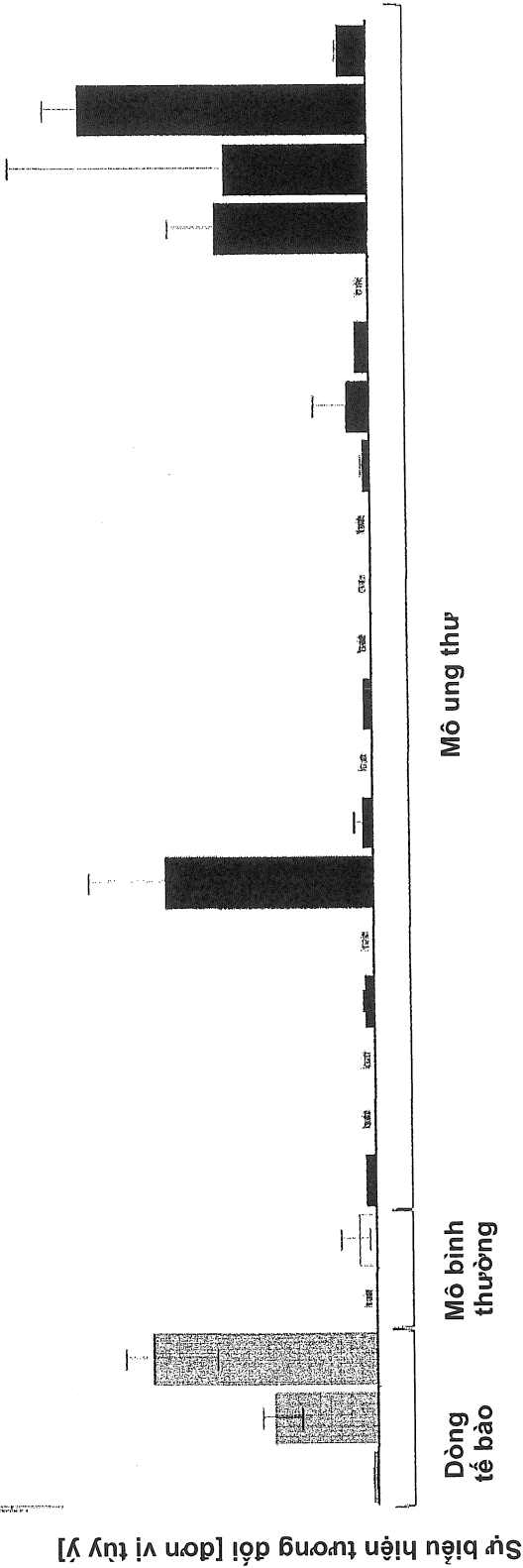


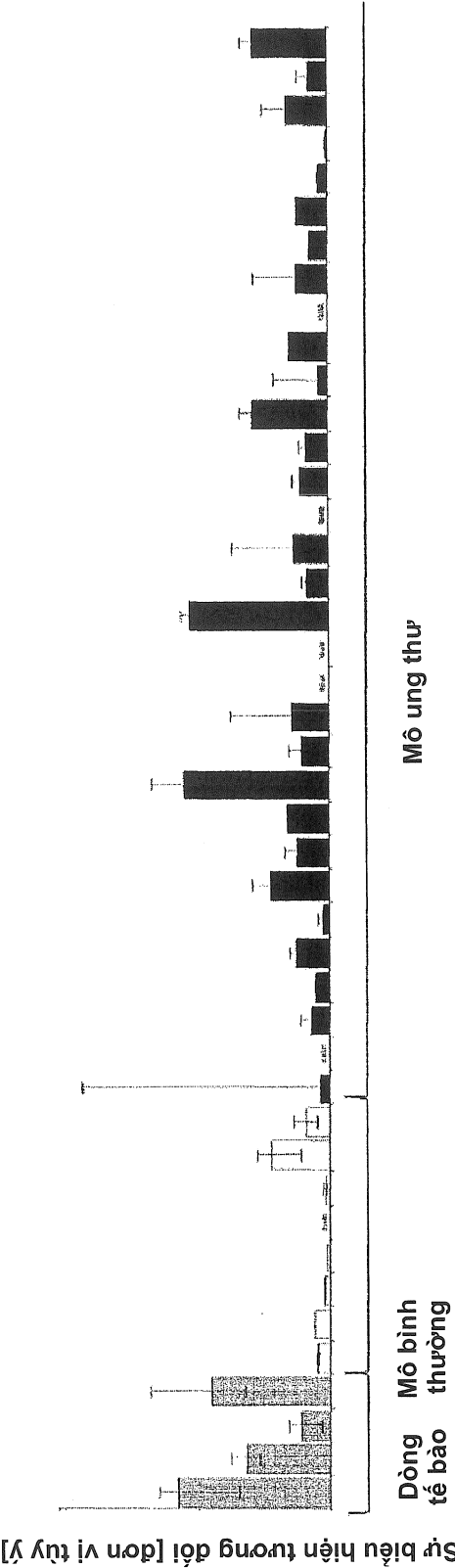
Fig.1D

Petit: GLDGATYTV (A*02)
SEQ ID NO: 3



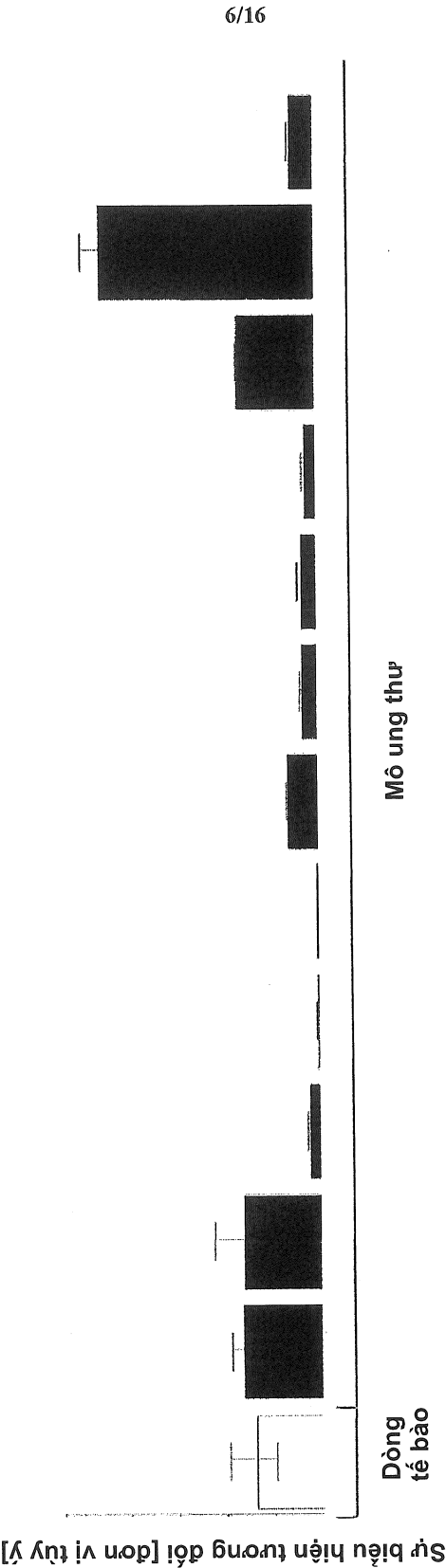
Peptit được phát hiện trên
3 dòng tế bào (1 tế bào máu, 1 tủy, 1 da), 2 mô bình thường (1 nhau thai, 1 tử cung), 20 mô ung thư (1 bệnh ung thư
não, 1 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư thận, 1 bệnh ung thư gan, 5 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch
huyết, 2 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 3 u melanin, 1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang, 3 bệnh ung
thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.1E
Peptit: SVMELLQGV (A*02)
SEQ ID NO: 8



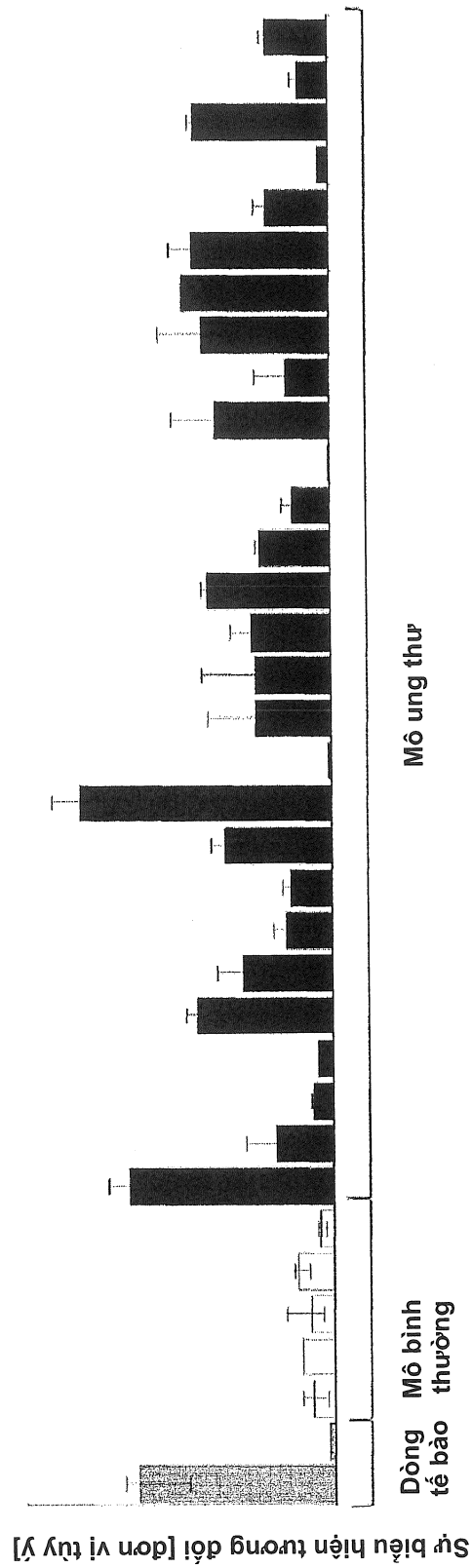
Peptit được phát hiện trên
4 dòng tế bào (4 tế bào lymphô), 8 mô bình thường (1 thận, 1 gan, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 ruột non, 1 tuyến giáp, 2 tử cung), 32 mô ung thư (3 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 3 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư tế bào tủy, 1 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 1 bệnh ung thư túi mật, 3 bệnh ung thư gan, 5 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 3 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư dạ dày, 6 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư bàng quang, 3 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.1F
Peptit: VLGPEGQLV (A*02)
SEQ ID NO: 21



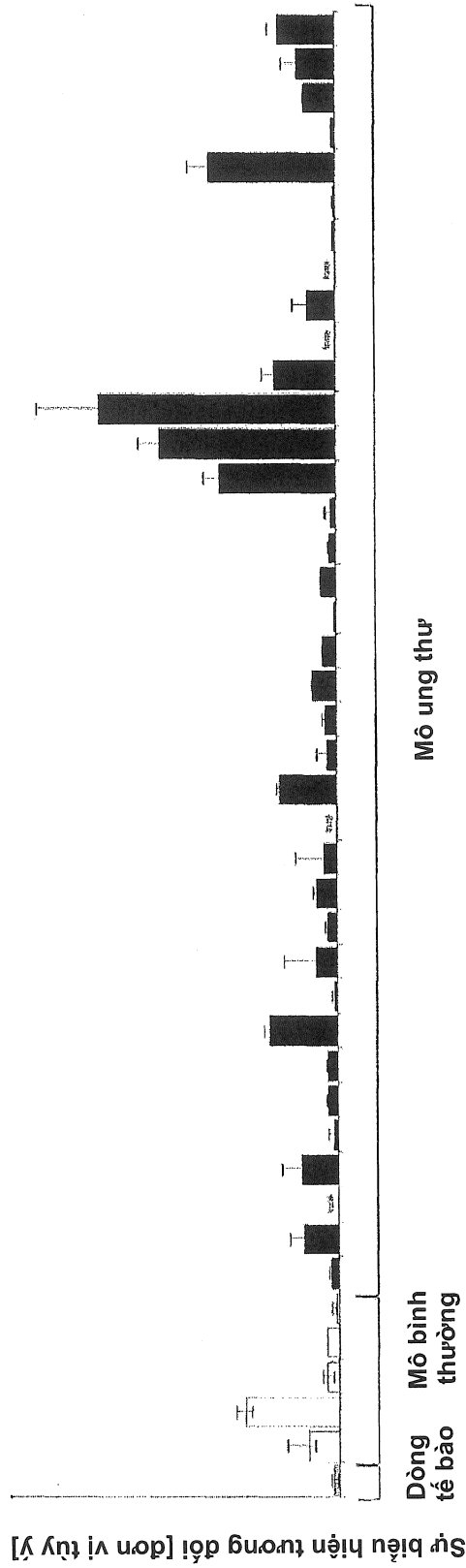
Peptit được phát hiện trên
1 mô bình thường (1 khí quản), 12 mô ung thư (1 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 2 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư hạch
bạch huyết, 1 bệnh ung thư phổi, 6 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.1G
 Peptit: TLIDRVAVI (A*02)
 SEQ ID NO: 30



Peptit được phát hiện trên 2 dòng tế bào (1 bạch cầu, 1 thận), 5 mô bình thường (1 ruột kết, 1 gan, 1 hạch bạch huyết, 1 ruột non, 1 lách), 27 mô ung thư (1 bệnh ung thư tế bào cầu, 2 bệnh ung thư vú, 3 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 1 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư trực tràng, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 1 bệnh ung thư túi mật, 2 bệnh ung thư gan, 1 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 4 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 2 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư não, 3 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư thận, 1 bệnh ung thư bàng quang, 2 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

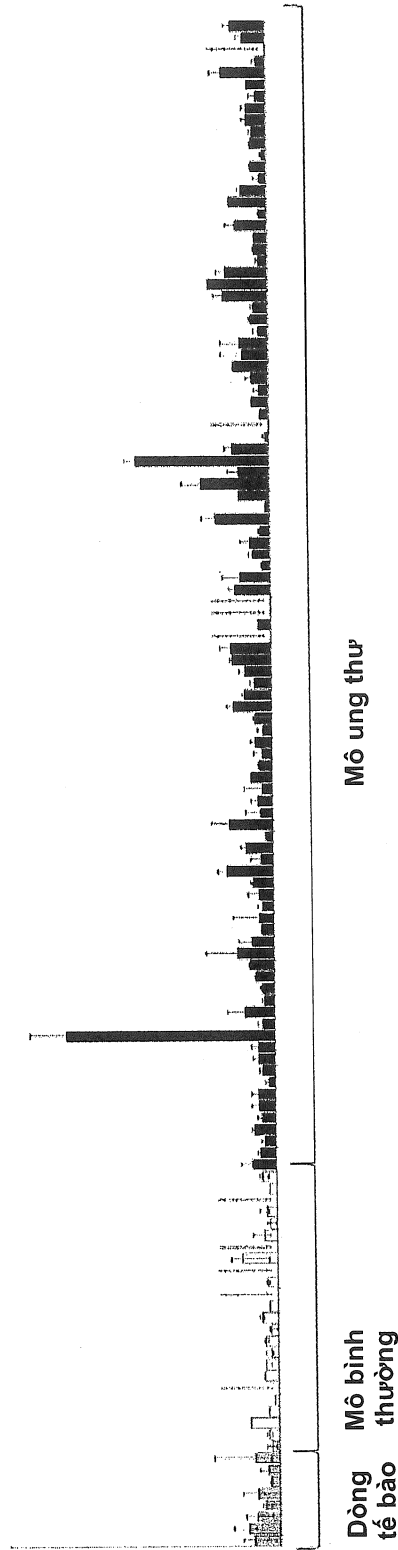
Fig.1H
 Peptit: NMDDVIYV (A*02)
 SEQ ID NO: 46



Peptit được phát hiện trên
 1 dòng tế bào (1 tủy), 5 mô bình thường (2 tuyến thượng thận, 1 lách, 2 khí quản), 37 mô ung thư (3 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 3 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 1 bệnh ung thư túi mật, 1 bệnh ung thư gan, 3 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 4 bệnh ung thư da, 4 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 2 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư tụy, 2 bệnh ung thư dạ dày, 5 bệnh ung thư phổi, 2 bệnh ung thư bàng quang, 4 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.11

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]



Peptit được phát hiện trên

8 dòng tế bào (1 bàng quang, 1 tế bào lymphô, 1 bạch cầu, 1 da, 2 tuyến tiền liệt, 2 tụy), 24 mô bình thường (2 tuyến thượng thận, 1 thực quản, 1 mắt, 1 vùng đầu và cổ, 1 thận, 1 trực tràng, 2 phổi, 2 hạch bạch huyết, 1 tụy, 1 màng bụng, 4 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 2 ruột non, 2 tuyến giáp, 2 tử cung), 98 mô ung thư (3 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 6 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 4 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư kết-trực tràng, 1 bệnh ung thư ruột kết, 3 bệnh ung thư trực tràng, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 2 bệnh ung thư túi mật, 3 bệnh ung thư gan, 4 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 5 bệnh ung thư da, 5 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 4 bệnh ung thư buồng trứng, 5 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư tụy, 11 bệnh ung thư não, 25 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư thận, 7 bệnh ung thư bàng quang, 5 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.2A

Gen: MSX1
Peptit: ALAPSEGVQAA
SEQ ID NO: 12

Nhóm sản phẩm phiên mã có FPKM tương đối

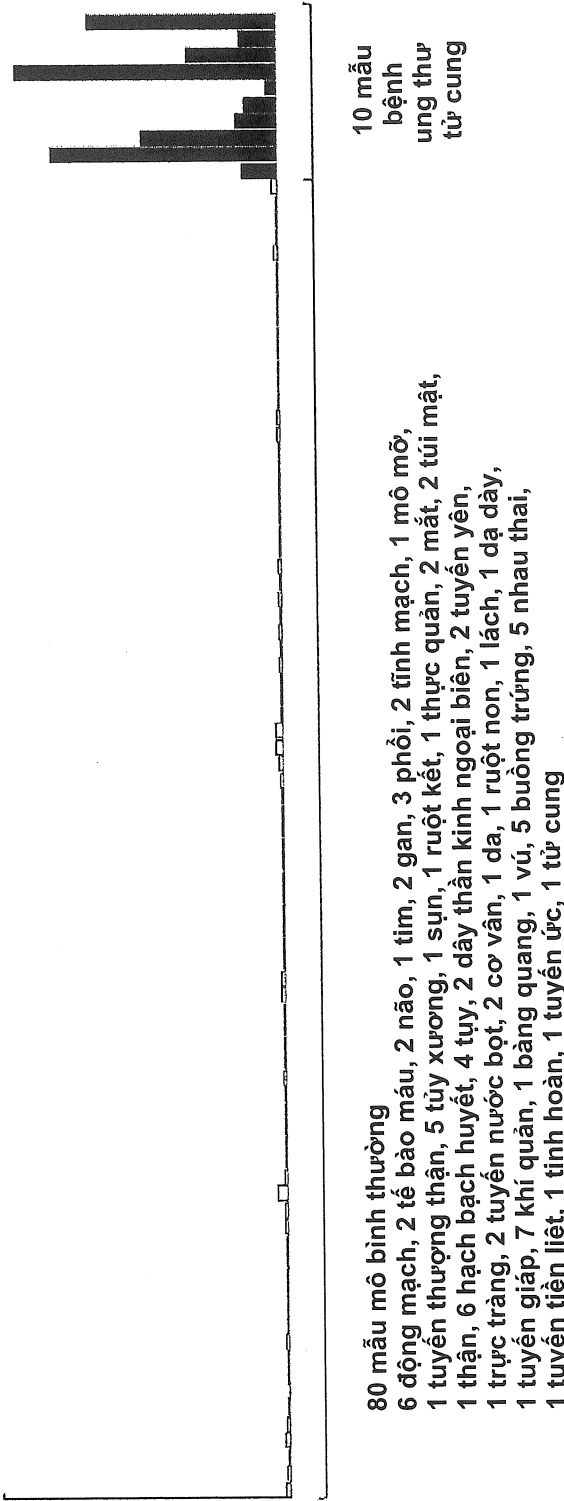


Fig.2B

Gen: NXNL2
Peptit: ALQNKVVAL
SEQ ID NO: 13

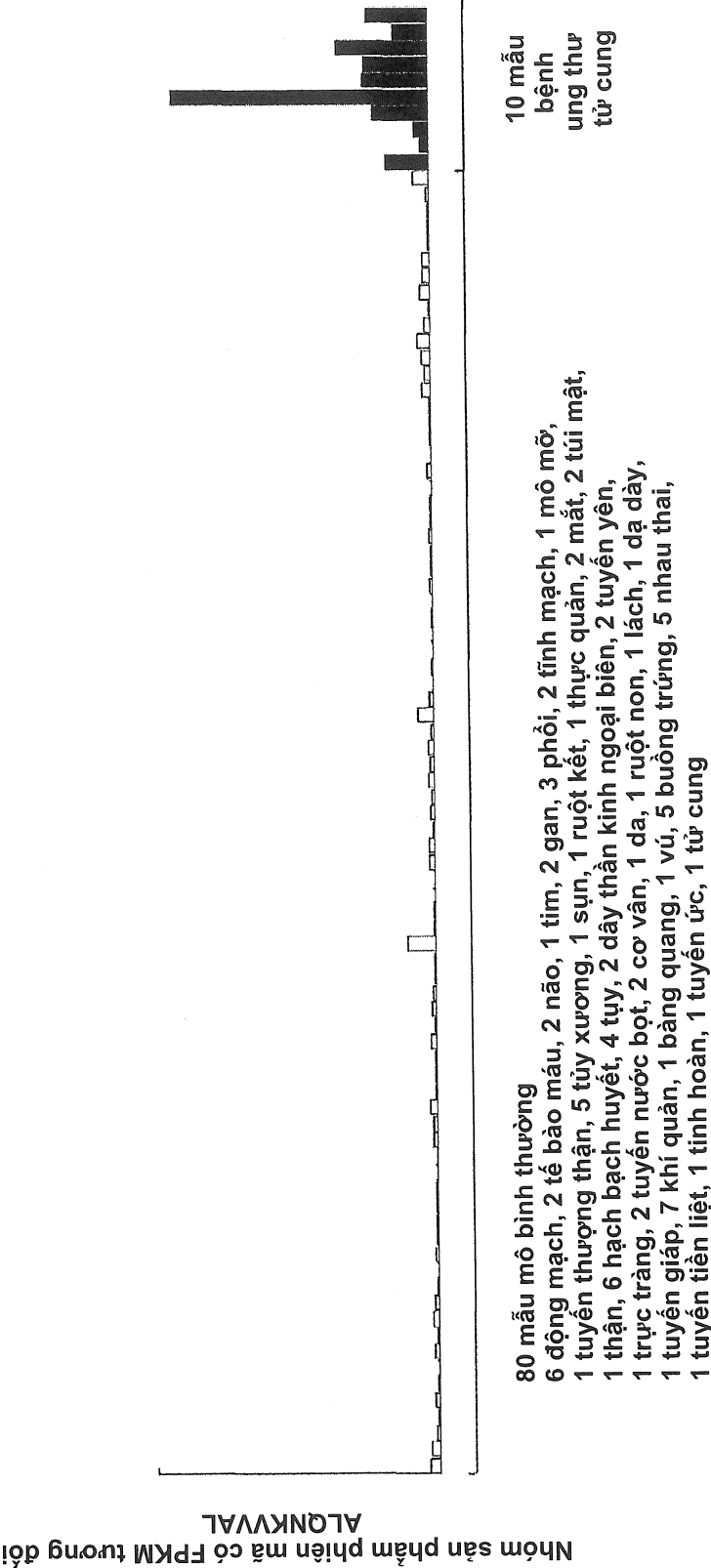


Fig.2C

Gen: TMEM101
Peptit: FLSGYVTL
SEQ ID NO: 42

Nhóm sản phẩm phiên mã có FPKM tương đối

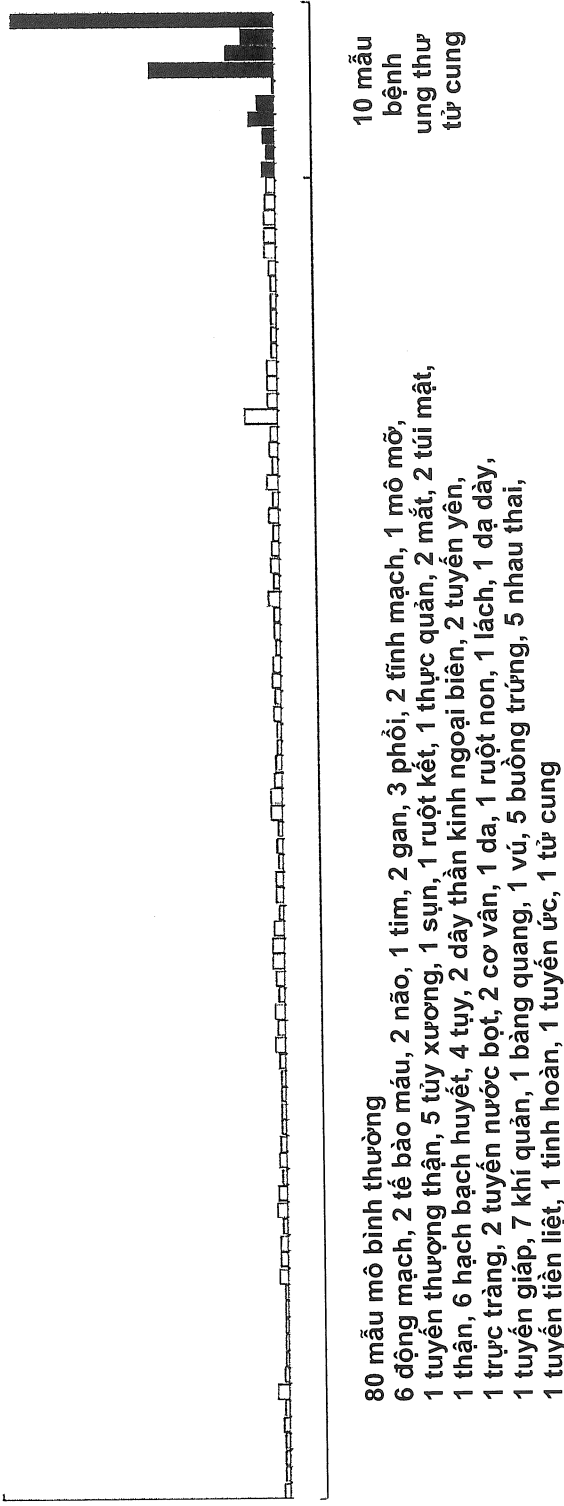


Fig.2D
Gen: STX18
Peptit: ILAETQPEL
SEQ ID NO: 48

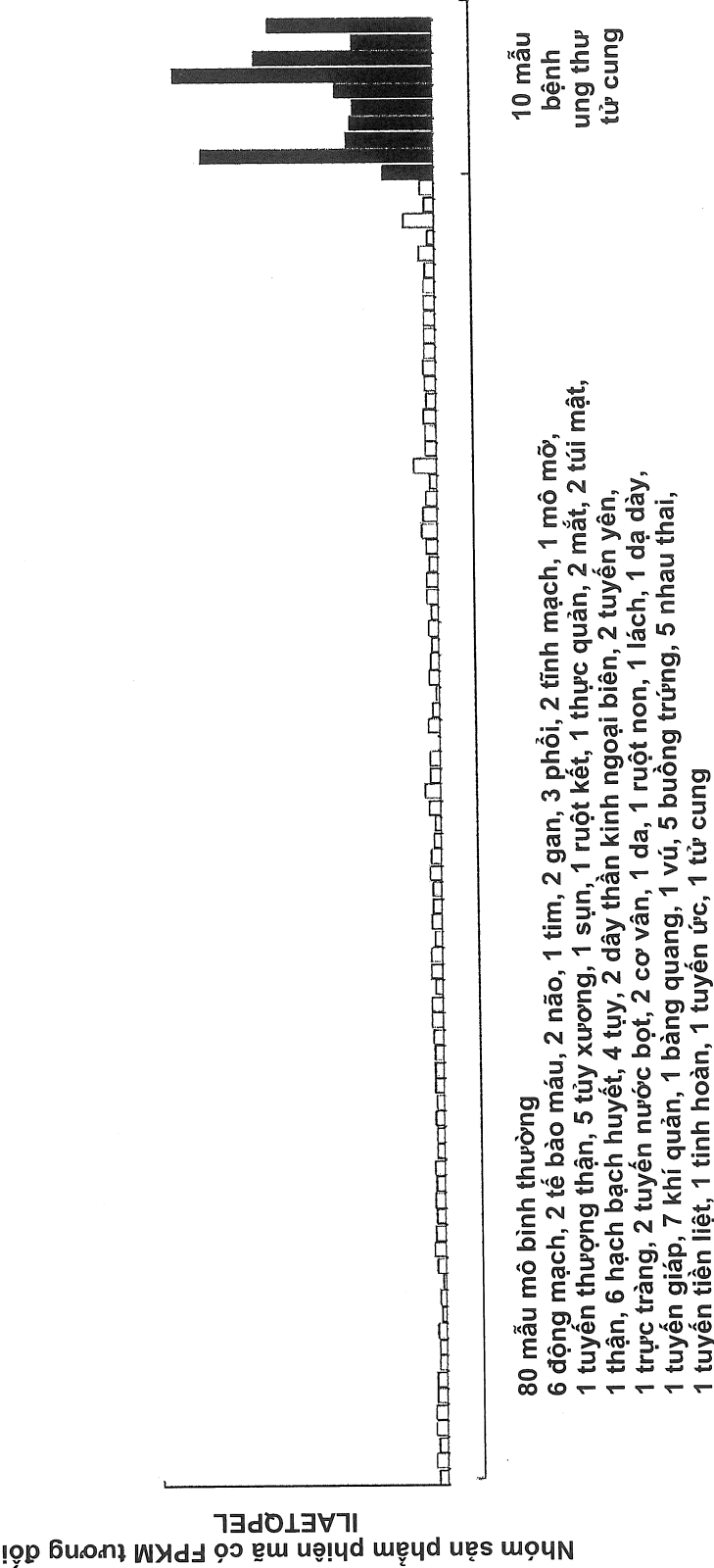


Fig.3

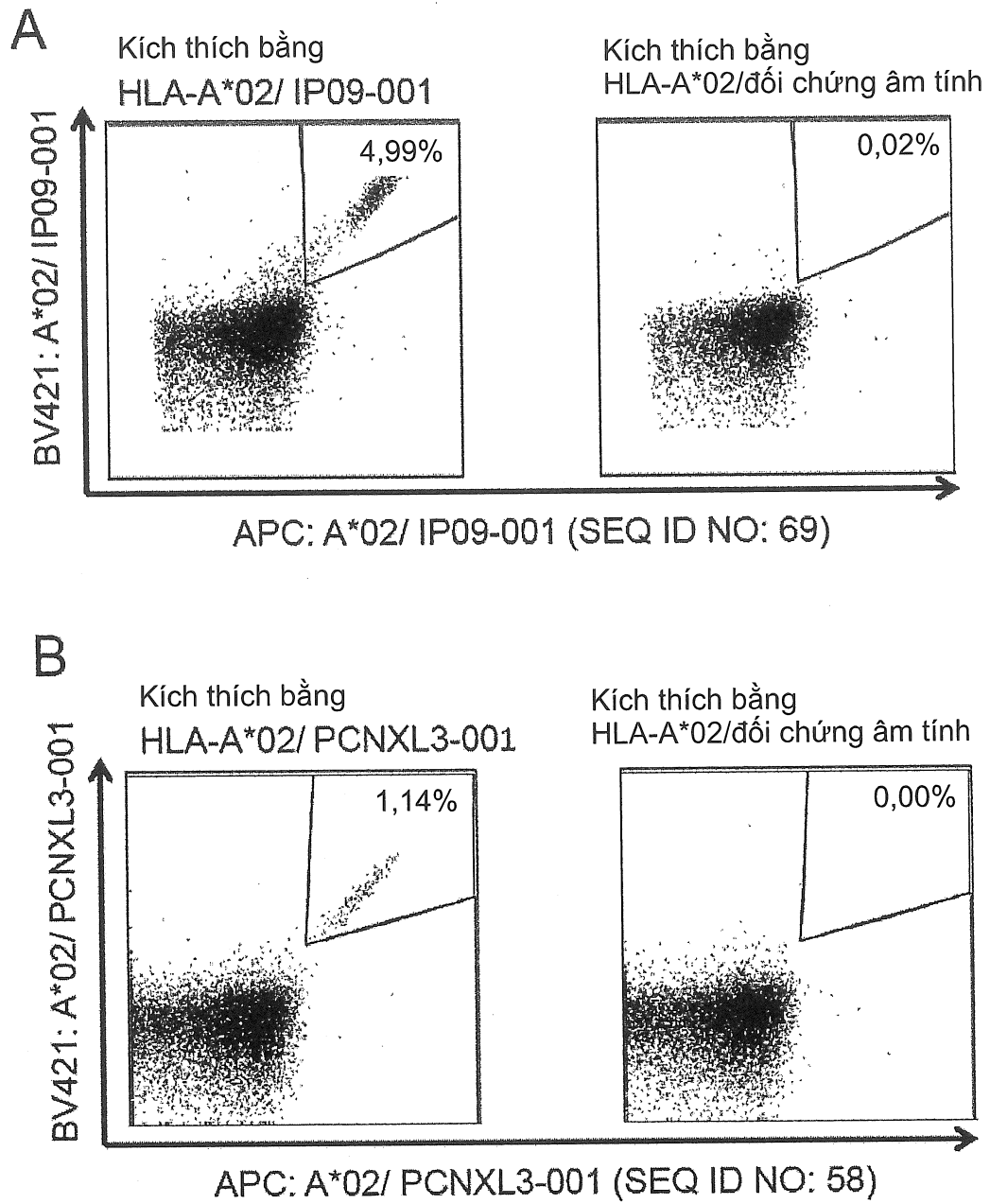


Fig.4

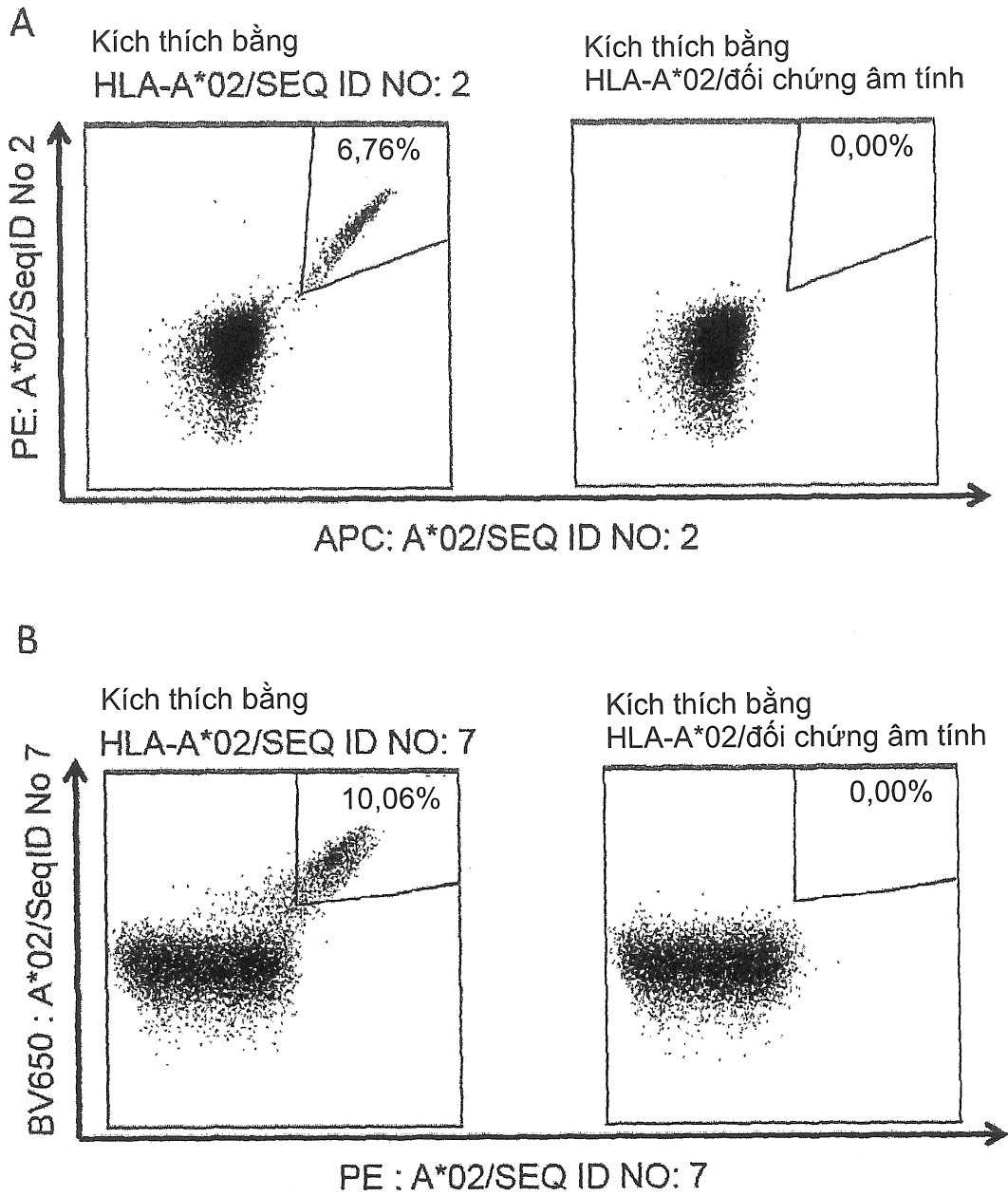


Fig.4 (tiếp theo)

